

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“ESTUDIO TERMODINÁMICO DE LA FORMACIÓN DE
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE ARILOXAZINONAS Y
ARILOXAZOLES CON CICLODEXTRINAS Y EVALUACIÓN DE
APLICACIONES FOTOFÍSICAS”.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química**

Por:

SILVANA ABISAG CONSTANZA VALDEBENITO SILVA

Directores de Tesis

DR. ANTONIO LUIS ZANOCCO LOYOLA.

DR. GERALD AMILCAR ZAPATA TORRES.

**SANTIAGO- CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

SILVANA ABISAG CONSTANZA VALDEBENITO SILVA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día **15** de **Junio** de 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Antonio Zanocco L. _____

Dr. Gerald Zapata T. _____

Comisión Informante:

Dr. Víctor Vargas C. (Presidente) _____

Dra. Carolina Jullian M. _____

Dr. Denis Fuentealba P. _____

Dr. Renato Contreras R. _____

*A mis padres Silvana y Samuel, por su amor
A mis hermanos (Giovanna, Jessica y Samuel)
A mamá Silvia, Elda y Mari*

***Porque Jehová da la sabiduría;
y de su boca viene el conocimiento
y la inteligencia.
Proverbios 2:6***

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a los profesores Antonio Zanocco y Gerald Zapata, quienes depositaron su confianza en este trabajo y siempre me motivaron a mejorar como científica. Al profesor Antonio Zanocco por darme la oportunidad de trabajar con él y por su apoyo en mi desarrollo académico y personal. Al profesor Gerald Zapata, en quien no sólo encontré un director de tesis sino que también un buen amigo.

También quiero agradecer a la comisión de doctorado que evaluó este trabajo, a la profesora Carolina Jullian y a los profesores Víctor Vargas, Renato Contreras y Denis Fuentealba, por la disponibilidad en atenderme y responder a mis dudas, por todos los consejos, críticas y discusiones que siempre fueron edificantes y aportaron a mejorar este trabajo. En especial a la profesora Carolina J., quien además, me permitió trabajar en su laboratorio.

A cada integrante el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, a Renzo Z., Ignacio C., Catalina S., Franco A., Natali R. y Cintia V., con quienes compartimos el interés por la fotoquímica. En particular a Renzo e Ignacio, quienes son buenos amigos y aportaron al desarrollo de esta tesis alentándome a continuar cuando las cosas no resultaban. A la profesora Else Lemp y al profesor German Günther, quienes fueron generosos al momento de compartir materiales de laboratorio o instrumentos y discutir resultados. En el caso de la profesora quiero destacar la disponibilidad que tuvo al escuchar los numerosos ensayos para las distintas presentaciones de este trabajo.

A la Unidad Gráfica Molecular donde no sólo encontré un espacio donde trabajar sino que también muy buenos amigos, con quienes compartimos el mismo amor por la química y por el café. A Montserrat P., Martin F. y Cristian C., por su ayuda incondicional cuando los resultados eran adversos y por su paciencia al momento de enseñarme a ocupar los distintos programas. A German B., por su ayuda con los cálculos de NBO.

A CONICYT por otorgarme la beca de doctorado nacional N° 21110237, la cual me dio la oportunidad de realizar esta tesis y a los proyectos FONDECYT (N° 1150210 y 1120280).

Finalmente y no por eso menos importante quiero agradecer a Dios por darme la vida y su infinito amor. También a mi familia, quienes han celebrado mis éxitos y me han apoyado en las derrotas. A los amigos que me han acompañado siempre, Viviana Ide, Niko L., Fabián L, Jesús M., Daniela H., Juan Pablo U. y Natalia J. y a mis compañeros de doctorado en especial a Christopher C., Braulio A. y Claudio B.

Tabla de Contenido

	Página
Resumen	1
Summary	3
CAPITULO 1	
1.1 Introducción	5
1.2 Hipótesis	25
1.3 Objetivos	26
1.3.1 Objetivos Generales	26
1.3.2 Objetivos Específicos	26
CAPITULO 2: Materiales, instrumentación y metodologías	
2.1 Materiales	28
2.2 Instrumentación	29
2.2.1 Espectroscopia de Absorción	29
2.2.2 Espectroscopia de Emisión	29
2.2.3 Equipo para Agitación	29
2.3 Metodologías	30
2.3.1 Formación de los Complejos de Inclusión	30
2.3.2 Determinación de las Constantes de Inclusión	30
2.3.3 Método Gráfico de Job	36

2.3.4	Determinación de los Parámetros Termodinámicos	37
2.3.5	Síntesis	37
2.3.6	Rendimientos Cuánticos de Fluorescencia	40
2.3.7	Determinación de tiempos de vida de fluorescencia	40
2.3.8	Determinación de oxígeno molecular singulete	41
2.3.9	Generación de luz blanca	41
2.3.10	Cinéticas de consumo del complejo de inclusión naftoxazol <u>15</u> /β-ciclodextrina en presencia de oxígeno molecular singulete	42
2.3.11	Determinación de la constante de desactivación de oxígeno molecular singulete	42
2.3.11	Estudios Computacionales	44

CAPITULO 3: Resultados y Discusión

Estudio de las propiedades fotofísicas de las ariloxazinonas y ariloxazoles

3.1	Ariloxazinonas	53
3.2	Ariloxazoles	65

CAPITULO 4: Caracterización termodinámica de los complejos de inclusión y comparación entre los resultados experimentales con estudios teórico-computacionales

4.1	Ariloxazinonas	75
4.2	Ariloxazoles	88

4.3	Compensación entálpica-entrópica para ariloxazinonas y ariloxazoles	97
4.4	Caracterización termodinámica y efecto del pH en la formación del complejo de inclusión entre la oxazinona <u>2</u> y β -ciclodextrina.	99
CAPITULO 5: Aplicaciones		
5.1	Generación de luz Blanca en Fase Sólida	103
5.2	Detección de Oxígeno Molecular Singulete	112
CAPITULO 6: Conclusiones		118
Bibliografía		120

Índice de Tablas

	Página
Tabla 3.1. Longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc}/nm) y longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{máx}^{emis}/nm$), de las oxazinonas 1-10 en solventes con distinta constante dieléctrica, ϵ (benceno, acetonitrilo y agua) y en β -ciclodextrina.	55
Tabla 3.2. Longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc}/nm) y longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{máx}^{emis}/nm$), de los naftoxazoles 11-15 en solventes con distinta constante dieléctrica, ϵ (benceno, acetonitrilo y agua) y en β -ciclodextrina y/o γ -ciclodextrina.	66
Tabla 4.1. Constantes de inclusión (K) y parámetros termodinámicos en condiciones estándar, para las oxazinonas 1 a la 10 incluidas en β -ciclodextrina.	77
Tabla 4.2. Constantes de inclusión y parámetros termodinámicos para los naftoxazoles 11 al 15 en β -ciclodextrina y los naftoxazoles 12 y 13 en γ -ciclodextrina.	90
Tabla 4.3. Longitud máxima de emisión de fluorescencia ($\lambda_{máx}^{emis}$) en nanómetros (nm), para la oxazinona 2 libre y para el complejo de inclusión (oxazinona 2/ β -CD) a pH 3, pH 5 y pH 6,8.	99
Tabla 4.4. Constante de Inclusión para complejos oxazinona 2 / β -ciclodextrina, con estequiometría 1:1 y parámetros termodinámicos en condiciones estándar determinados a distintos pHs.	101
Tabla 5.1. Longitud máxima de emisión ($\lambda_{máx}^{emis}$) en nanómetros y constantes de inclusión para el complejo de inclusión entre el naftoxazol 13 en β -, γ - y β SO ₃ H-ciclodextrina, en medio acuoso con estequiometría 1:1 y condiciones estándar (T=298K).	106

Tabla 5.2. Rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F), en medio acuoso a 467 nm y tiempos de vida en nanosegundos (ns) para el estado localmente excitado (τ_1) y para el estado excitado de transferencia de protones (τ_2), para el naftoxazol **13** incluido en β SO₃H-ciclodextrina. 111

Tabla 5.3. Tiempos de vida, χ^2 y constante de desactivación del oxígeno excitado a distintas concentraciones de naftoxazol **15**, incluido en 10 mM de β -ciclodextrina, en agua deuterada. 116

Índice de Figuras

	Página
Figura 1.1. Representación gráfica de la ubicación de los grupos hidroxilos primarios y secundarios en la estructura de una ciclodextrina.	5
Figura 1.2. Representación esquemática de la α -, β - y γ -ciclodextrina y sus respectivos radios de cavidad.	6
Figura 1.3. Representación gráfica de la β -ciclodextrina y derivados.	7
Figura 1.4. Estructura química de la benzoxazinona, naftoxazinona y naftoxazol.	8
Figura 1.5: Relajación del solvente alrededor de una molécula fluorescente.	9
Figura 1.6. Esquema de reacciones de descomposición fotoquímica de naftoxazinonas.	12
Figura 1.7. En la figura de la izquierda se muestran los espectros de emisión de fluorescencia normalizada, para los compuestos: 2-quinolin-2-il-nafto[1,2-d][1,3]oxazol (rojo) y 2-[(E)-2-quinolin-2-il-vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol (negro). En la figura de la derecha se observa la emisión de luz blanca del compuesto 2-quinolin-2-il-nafto[1,2-d][1,3]oxazol con distintas mezclas de TFE-DMSO.	14
Figura 1.8. La imagen de la izquierda muestra la evolución de los espectros de absorción y fluorescencia del compuesto furilvinilnafotoxazol luego de irradiar azul de metileno en acetona con una lámpara halógena de 50 W, a través de un filtro de 500 nm. A la derecha, se muestra el esquema de reacción del furilvinilnafotoxazol con oxígeno singulete.	16

Figura 1.9. Estructura química de los derivados de ariloxazinonas y ariloxazoles.	18
Figura 1.10. Estructura molecular de las cumarinas C153, C480, OST, C460, HCD-1, HCD-2 y HCD-3.	20
Figura 2.1. Diagrama solubilidad de fases para ciclodextrina.	34
Figura 2.2. Ciclo termodinámico empleado para evaluar las diferencias de energía libre. Donde $\Delta G^{\circ}_{\text{solv,lig}}$, $\Delta G^{\circ}_{\text{solv,rec}}$ y $\Delta G^{\circ}_{\text{solv,com}}$, corresponden a las energías libres de solvatación del ligando, receptor y complejo, respectivamente y $\Delta G^{\circ}_{\text{bind,solv}}$ y $\Delta G^{\circ}_{\text{bind,vac}}$ son las energías libres de la unión en presencia de solvente y en el vacío, para complejo de inclusión ligando y receptor respectivamente.	49
Figura 3.1. Estructura molecular de las distintas ariloxazinonas incluidas en β -ciclodextrina.	54
Figura 3.2. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas <u>1</u> , <u>2</u> y <u>3</u> en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).	56
Figura 3.3. Espectros de emisión normalizada en medio acuoso para las oxazinonas <u>4</u> , <u>5</u> y <u>6</u> en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).	58
Figura 3.4. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas <u>7</u> y <u>8</u> , en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).	59
Figura 3.5. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas <u>4</u> , <u>9</u> y <u>10</u> , en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).	60
Figura 3.6. Espectros de emisión de fluorescencia (I_F) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de β -CD, de 0-10mM para	62

los complejos de inclusión entre las oxazinonas **1**, **4** y **9** en β -CD, a temperatura 298K.

Figura 3.7. Estructura molecular de los naftoxazoles incluidos en ciclodextrina. 65

Figura 3.8. Espectros de emisión normalizada para las naftoxazoles **11**, **12** y **13**, en agua (línea punteada) e incluidos en 5 mM de β -CD, (línea continua). 68

Figura 3.9. Espectros de emisión normalizada para las naftoxazoles **14** y **15**, en agua (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD (línea continua). 70

Figura 3.10. Espectros de emisión de fluorescencia (I_F) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de ciclodextrina, de 0 a 10mM para los complejos de inclusión entre los naftoxazoles **11** y **12** en β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, según corresponda, a temperatura 298K. 74

Figura 4.1. 1) Gráfico de $1/[\beta\text{-CD}]$ versus $1/[I_F - I_F^0]$, para el complejo de inclusión entre la oxazinona **6** y β -ciclodextrina, con estequiometría 1:1. 2) Gráfico de $[\beta\text{-CD}]$ versus [oxazinona en solución], para el complejo de inclusión formado entre la oxazinona **5** y β -ciclodextrina, con estequiometría 1:1. 76

Figura 4.2. Representación gráfica de la constante de inclusión, K/M^{-1} , para las oxazinonas **1** a la **10** y **21** a la **26**, incluidas en β -ciclodextrina. 78

Figura 4.3. Representación gráfica de la entalpía ($\Delta H^\circ/\text{kcal/mol}$) y factor entrópico ($T\Delta S^\circ/\text{kcal/mol}$), para las oxazinonas **1** a la **10** y **21** a la **26**, incluidas en β -ciclodextrina. 81

Figura 4.4. Gráfico de $[\beta\text{-CD}]$ versus [naftoxazol en solución], para el complejo de inclusión formado entre la naftoxazol **11** y β -ciclodextrina, con estequiometría 1:1. 88

Figura 4.5. Representación gráfica de la constante de inclusión, K/M^{-1} , para los oxazoles 11 al 20 , incluidos en β -ciclodextrina.	89
Figura 4.6. Representación gráfica de la entalpia ($\Delta H^\circ/kcal/mol$) y factor entrópico ($T\Delta S^\circ/kcal/mol$), para los naftoxazoles 11 al 20 , incluidos en β -ciclodextrina.	93
Figura 4.7: Gráfico de factor entálpico-entrópico, para las oxazinonas y ariloxazoles 1-26 incluidas en β -ciclodextrina.	98
Figura 4.8. a) Gráfico de Benessi-Hildebrand para complejos de inclusión entre la oxazinona 2 y β -CD con estequiometría 1:1, a pH 3, 5 y 6,8 a 298 K. b) Gráfico de Job, para la oxazinona 2 a pH 5 Y 298 K, $r=0,5$.	100
Figura 5.1. Espectros de emisión de fluorescencia normalizada, para el naftoxazol 13 , donde el color negro corresponde al espectro en dimetilsulfóxido (DMSO) y el color rojo corresponde a una mezcla entre trifluoroetanol (TFE) y DMSO al 16%. En la figura de la derecha se muestra la emisión de luz blanca.	104
Figura 5.2. Estructura química de la β -ciclodextrina modificada con un grupo ácido sulfónico (izquierda) y del naftoxazol 13 (derecha).	105
Figura 5.3. Espectros de absorción en medio acuoso a distintas concentraciones de βSO_3H -ciclodextrina, para el naftoxazol 13 .	107
Figura 5.4. Espectros de emisión a distintas concentraciones de βSO_3H -ciclodextrina, en medio acuoso (izquierda) y en fase sólida (derecha), para el naftoxazol 13 .	108
Figura 5.5. Espectros de absorción y emisión del naftoxazol 13 , en soluciones con βSO_3HCD neutras y en soluciones de ácido sulfúrico 0,3 M en a) acetonitrilo y b) trifluoroetanol.	110

- Figura 5.6.** Esquema de reacción del complejo de inclusión, formado entre el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina, cuando el furano reacciona con oxígeno molecular singulete. 113
- Figura 5.7.** Evolución de los espectros de absorción y fluorescencia del complejo de inclusión formado entre el naftoxazol **15** y 10 mM β -ciclodextrina. Luego de irradiar el azul de metileno en agua con una lámpara halógena de 50 W, a través de un filtro de 500 nm. Tabla de rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) en el tiempo (min). 114
- Figura 5.8:** Gráfico de Stern-Volmer para la reacción entre el complejo de inclusión formado por el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina (10 mM) con el oxígeno molecular singulete, en agua deuterada. 117

Glosario de Términos y Abreviaciones Usadas

β -CD: β -ciclodextrina

K: constante de inclusión

$K_{1:1}$: constante de inclusión con estequiometría 1:1

M^{-1} : inverso de la concentración Molar

τ : tiempo de vida de fluorescencia

ϕ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia

ns: nanosegundos

nm: nanómetros

$O_2(^1\Delta_g)$: oxígeno molecular singulete

Resumen

En esta tesis se estudiaron tanto las características fisicoquímicas de los complejos de inclusión de derivados de ariloxazinonas y arilnaftoxazoles en ciclodextrinas y se determinaron los parámetros termodinámicos que controlan el proceso de inclusión. Para ello se emplearon técnicas y metodologías que involucran medición de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo.

Las constantes de inclusión (K) fueron obtenidas empleando dos metodologías: Benesi-Hildebrand y de solubilidad de fases. Los experimentos demostraron que ambas familias de moléculas forman complejos de inclusión con ciclodextrinas con una estequiometría 1:1 y tienen constantes de inclusión $K > 100 \text{ M}^{-1}$. Se encontró que las oxazinonas que tienen sustituyentes dadores de electrones como amino y N,N-dimetilamino, son las que presentan mayor constante de inclusión ($K = 486 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$ (6-amino-2-fenil-3H-nafto[2,1-b][1,4]oxazin-3-ona) y $K = 604 \pm 0,4 \text{ M}^{-1}$ (6-(dimetilamino)-2-fenil-3H-nafto[2,1-b][1,4]oxazin-3-ona)). También se determinó que los arilnaftoxazoles que presentan puentes vinílicos en su estructura, tienen constantes de inclusión mayores que los unidos directamente al anillo oxazol, por ejemplo el 2-(quinolin-2-il)nafto[2,1-d]oxazol, tiene una $K = 326 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ y el 2-(2-(quinolin-2-il)vinil)nafto[2,1-d]oxazol, tiene una $K = 515 \pm 6 \text{ M}^{-1}$.

Los parámetros termodinámicos que controlan el proceso de inclusión, se obtuvieron utilizando ecuaciones termodinámicas conocidas como la ecuación de van't Hoff. Además los valores de ΔG° son negativos y se encuentran entre -1 y -5 kcal/mol, indicando que el proceso de inclusión es favorecido termodinámicamente, siendo más afines los arilnaftoxazoles que las ariloxazinonas por la cavidad de la β -ciclodextrina. También, se analizó la dependencia de la energía libre, la entalpía y la entropía de inclusión con la estructura del huésped. A partir de los valores de entalpía y entropía se

estableció si las interacciones ciclodextrina/molécula huésped son aquellas que predominantemente controlan la inclusión o bien si es el efecto hidrofóbico, encontrándose que para las ariloxazinonas el control es principalmente entálpico, mientras que en los ariloxazoles en general es la entropía la que controla la inclusión.

Además, se realizaron estudios de modelamiento molecular empleando metodologías de *docking* y de dinámica molecular, junto con un análisis de orbitales naturales de enlace (NBO), con el propósito de optimizar la geometría del complejo heterociclo-ciclodextrina y estimar las contribuciones de las interacciones más importantes para la formación del complejo de asociación entre la molécula anfitrión y la molécula huésped. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos experimentales, encontrándose una buena correlación entre ellos.

Se desarrolló un sistema para producir luz blanca en fase sólida, empleando una β -ciclodextrina modificada por un grupo ácido sulfónico. Para esto se seleccionó el compuesto 2-(2-(quinolin-2-il)vinil)nafto[1,2-d]oxazol.

Adicionalmente se evaluó si el naftoxazol (E)-2-(2-(furan-2-il)vinil)nafto[1,2-d]oxazol cambia su comportamiento fotofísico/fotoquímico relativo al observarlo para la molécula no incluida, con el propósito de desarrollar una sonda fluorescente que permita la detección de oxígeno excitado en medio acuoso que opere como un sensor de tipo apagado-encendido.

Summary

In this thesis, the physicochemical characteristics of the inclusion complexes of aryloxazinones and aryl naphthoxazoles derivatives in cyclodextrins were studied. In addition, the thermodynamic parameters that control the inclusion process were determined. To accomplish these purposes, techniques and methodologies that involve measurement of steady-state and time resolved fluorescence were used.

The inclusion constants (K) were obtained using both, the Benesi-Hildebrand and the phase solubility methodologies. The experiments showed that both families of molecules form inclusion complexes with cyclodextrins with a 1:1 stoichiometry, and they present a great affinity for the β -cyclodextrin cavity ($K > 100 \text{ M}^{-1}$). The oxazinones who have electrodonating substituents, like amine or N,N -dimethylamine, have the largest inclusion constants ($K = 486 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}$ (6-amino-2-phenyl-3H-naphtho[2,1-b][1,4]oxazin-3-one) and $K = 604 \pm 0,4 \text{ M}^{-1}$ (6-(dimethylamino)-2-phenyl-3H-naphtho[2,1-b][1,4]oxazin-3-one)). Also, the aryl naphthoxazoles who have a vinyl bridge have higher inclusion constants than those which are directly linked to the oxazole ring, for example 2-(quinolin-2-yl)naphtho[2,1-d]oxazole, $K = 326 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ and 2-(2-(quinolin-2-yl)vynil)naphtho[2,1-d]oxazole, $K = 515 \pm 6 \text{ M}^{-1}$.

Thermodynamic parameters that control the inclusion process were determined using classic thermodynamic equations such as the van't Hoff equation. Furthermore, the ΔG° are negative and they are in the range of -1 to -5 kcal/mol, indicating that the inclusion process is thermodynamically favored. Values of ΔG° shows that aryl naphthoxazoles are more compatible with the β -cyclodextrin cavity than the aryloxazinones. Using the analysis of the dependence of the free energy, enthalpy and entropy of inclusion process with the guest structure, it was possible to determinate if the cyclodextrin/guest

interactions are the ones that control the inclusion or if the predominant driven force is the hydrophobic effect. It was found that for aryloxazinones the thermodynamic control is primarily enthalpic, whereas for aryloxazoles the entropy controls the inclusion process.

In addition, studies of molecular modeling were performed using both, *docking* and molecular dynamics methodologies, in addition to analysis of natural bond orbitals (NBO) in order to optimize the geometry of the guest-cyclodextrin complex and estimate the more important interactions contributing to the formation of the association complex. The results obtained were compared with the experimental data, finding a good fit between them.

Furthermore, a system to produce white light in solid phase using a β -cyclodextrin modified with a sulfonic acid group was developed. The compound (E)-2-(2-(quinolin-2-yl)vinyl)naphtho[1,2-d]oxazole, included in the modified cyclodextrin cavity, shows an emission spectra comprising with the visible range with characteristic similar to white light.

Additionally, the (E)-2-(2-(furan-2-yl)vinyl)naphtho[1,2-d]oxazole included in the β -cyclodextrin cavity, change its photophysical/photochemical behavior relative to that the observed for the uncomplexed molecule. This behavior allows to propose this system as a new fluorescent probe capable to detect excited singlet oxygen in aqueous media operating as an "switch" on-off.

CAPITULO 1

1.1. Introducción

El estudio de las ciclodextrinas comenzó a finales del siglo IXX cuando el científico francés Villiers observó cristales de alcohol obtenidos como residuos en la producción de dextrinas de un cultivo bacterial. Villiers¹ fue el primero en caracterizar y estudiar las propiedades de los cristales de ciclodextrina. En la actualidad, el estudio y aplicación de las ciclodextrinas ha adquirido una gran importancia, debido a que son utilizadas permanentemente en la industria alimenticia,² farmacéutica,³ cosmética,⁴ protección del medio ambiente,⁵ bioconversión⁶ e industria textil.⁷

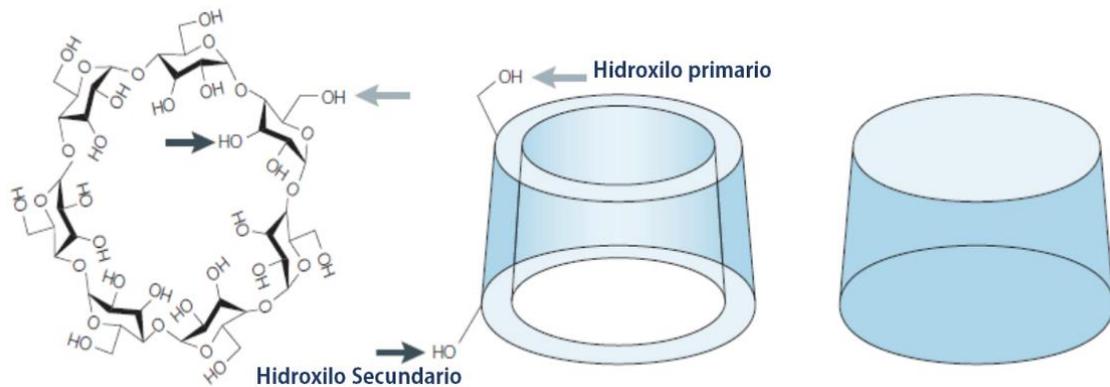


Figura 1.1. Representación gráfica de la ubicación de los grupos hidroxilos primarios y secundarios en la estructura de una ciclodextrina.

Las ciclodextrinas, son oligosacáridos compuestos por subunidades de D-glucopiranosas unidas a través de enlaces α -1,4-glicosídicos, formando así una estructura cíclica, similar a un cono truncado (Figura 1.1). Dependiendo de las subunidades de glucopiranosas, 6, 7 y 8 unidades, las ciclodextrinas son designadas como α -, β - y γ -ciclodextrina, respectivamente (Figura 1.2). El diámetro de la cavidad, está dado por los grupos hidroxilos primarios y secundarios ubicados en extremos opuestos de la molécula, los cuales le

confieren un microambiente hidrofílico o polar (Figura 1.1). Por otra parte, la cavidad de las ciclodextrinas posee cadenas de carbonos lineales, las que le otorgan un microambiente lipofílico o apolar.

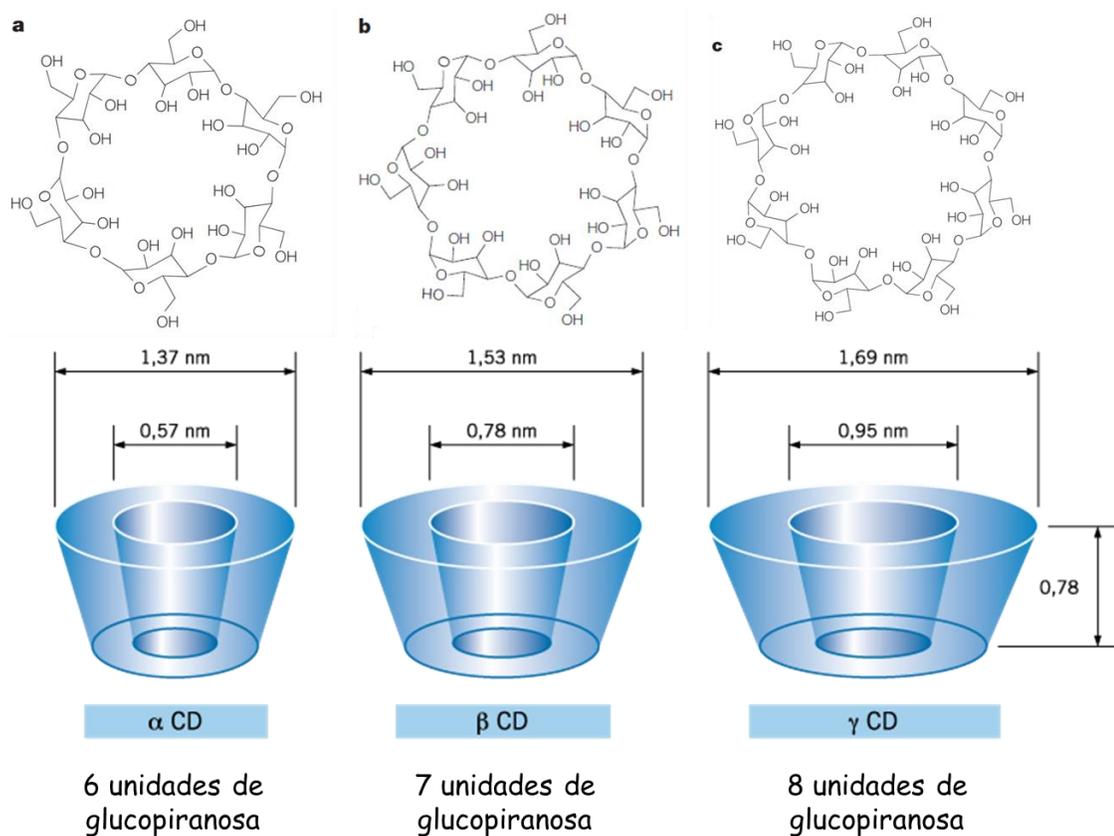


Figura 1.2. Representación esquemática de la α-, β- y γ-ciclodextrina y sus respectivos radios de cavidad.

Los grupos hidroxilos de la ciclodextrina, le otorgan una de sus principales características, que es la solubilidad en agua. La solubilidad de la α-, β- y γ-ciclodextrinas es 13, 2 y 16% p/p, respectivamente. A pesar de la baja solubilidad en agua de la β-ciclodextrina (16,6 mM),⁸ es la más utilizada debido a que el tamaño de su cavidad permite la incorporación de moléculas orgánicas con pesos moleculares del orden de 300 g/mol. Con el propósito de aumentar la solubilidad de la β-ciclodextrina se han sintetizado diversos derivados sustituyendo los grupos hidroxilos primarios por grupos lipofílicos o polares,

algunos ejemplos son: la metil- β -ciclodextrina,⁹ sulfobutiléter- β -ciclodextrina¹⁰ y la hidroxipropil- β -ciclodextrina,¹¹ entre otras (Figura 1.3).

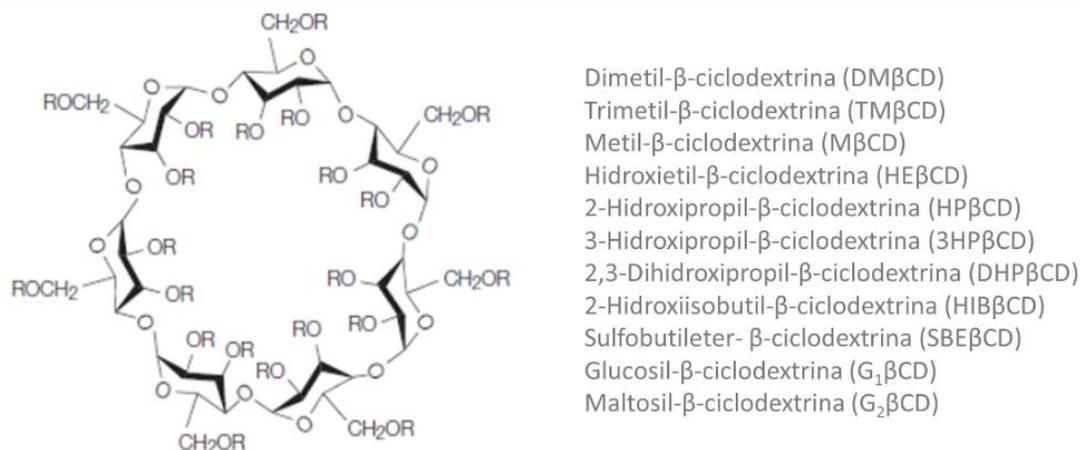


Figura 1.3. Representación gráfica de la β -ciclodextrina y derivados.

Los complejos de inclusión, representan un ejemplo simple de un sistema supramolecular, en el que una molécula actúa como “anfitrión” y la otra como “huésped”. Las ciclodextrinas son comúnmente utilizadas como moléculas anfitrión, debido a sus propiedades físicas, elevada solubilidad en agua y su escasa toxicidad para el ser humano. Estas características, permiten su aplicación en un sinnúmero de estudios, los cuales tienen como propósito el desarrollo de la química supramolecular y la nanotecnología empleando materiales orgánicos.

La inclusión de una molécula en otra, puede tener efectos significativos en las propiedades químicas, físicas y espectroscópicas del huésped, consecuentemente, a los complejos formados se les ha utilizado en múltiples aplicaciones industriales, biológicas y químicas. Las ciclodextrinas, producen un cambio en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped, cuando éstas se incorporan a la cavidad, como aumento en la solubilidad,¹² intervención en procesos catalíticos,¹³ estabilización frente a radiación ultravioleta visible¹⁴ y temperatura,¹⁵ control de la volatilidad,¹⁶ permiten

separaciones cromatográficas,¹⁷ modificación del gusto y de aromas¹⁸ y encapsulación y transporte de fármacos.⁸

En la naturaleza existe un gran número de moléculas que presentan propiedades emisivas de interés en solventes orgánicos, como es el estudio de los derivados de los heterociclos aromáticos tales como las Benzoxazinonas, Naftoxazinonas y Naftoxazoles (Figura 1.4). En general, estos compuestos son poco solubles en agua y su solubilidad se ve afectada significativamente por su estructura y por las propiedades fisicoquímicas del medio en que se encuentran, por ejemplo, la polaridad, la viscosidad y la temperatura.

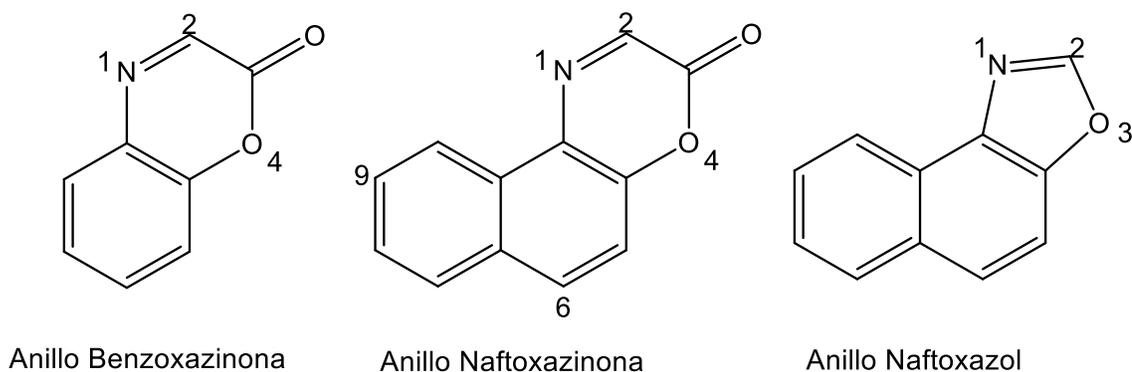


Figura 1.4. Estructura química de la benzoxazinona, naftoxazinona y naftoxazol.

Para estudiar el comportamiento fotofísico de las ariloxazinonas y ariloxazoles en solución es importante evaluar el efecto solvente sobre el espectro de emisión de éstas moléculas. Los efectos de la polaridad del solvente, son el origen de los cambios en la magnitud del corrimiento de los máximos de longitud de onda que presenta la molécula. La emisión de fluorescencia es un proceso de desactivación física del estado excitado de una molécula, que involucra la emisión de un fotón de energía igual a la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado basal. Cuando una molécula fluorescente es solubilizada en un solvente determinado, tanto las moléculas que se encuentran en el estado fundamental, como aquellas que están en un

estado electrónicamente excitado son solvatadas. Las moléculas de solvente que solvatan el estado excitado del fluoróforo, se ordenan de diferente forma respecto a las que solvatan al estado basal. Este comportamiento es producido porque tanto la geometría, como el momento dipolar de la molécula excitada cambian.

La absorción de radiación ocurre en escala de tiempo 10^{-16} s, tiempo suficientemente corto para que los microalrededores del fluoróforo cambien antes de que ocurra la emisión (10^{-8} s). El solvente se reorganiza alrededor del fluoróforo y consiguientemente, la emisión ocurre desde este nuevo estado excitado estabilizado por las moléculas de solvente. De acuerdo a los parámetros generales del solvente (índice de refracción (n) y la constante dieléctrica (ϵ)), los cuales reflejan el movimiento libre de los electrones en las moléculas de solvente, el estado excitado podrá ser mayormente estabilizado, como sucede en solventes de elevada polaridad y consecuentemente el proceso de emisión ocurre a menor energía, observándose un corrimiento batocrómico de los máximos de emisión (Figura 1.5).

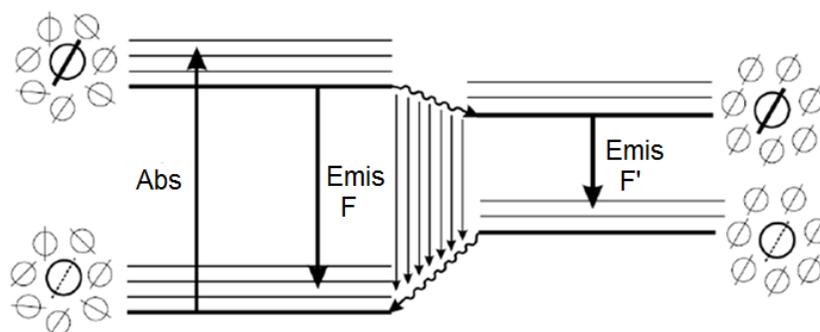


Figura 1.5: Relajación del solvente alrededor de una molécula fluorescente.

El tiempo de vida de la emisión (τ) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F), son parámetros fotofísicos que ayudan a caracterizar el comportamiento emisor de las ariloxazinonas y ariloxazoles. El tiempo de vida determina la disponibilidad de tiempo que posee el fluoróforo en el

estado excitado para interactuar o difundir en su entorno, y por lo tanto, permite obtener información sobre el estado emisor. El rendimiento cuántico de fluorescencia corresponde al número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos.

Se ha encontrado que el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) de las benzoxazinonas, naftoxazinonas y naftoxazoles no sustituidas es bajo ($\phi_F < 0,1$), pero al incorporar sustituyentes dadores de electrones, como por ejemplo grupos amino, dimetilamino, metoxilo a su estructura, sus propiedades fotofísicas se modifican sustancialmente. En general para los derivados de benzoxazinonas, se ha observado, que los rendimientos cuánticos de fluorescencia son moderadamente altos y dependen con el solvente, además los espectros de absorción muestran un aumento de los valores de coeficientes de absorción molar y las bandas de absorción se ensanchan. Por su parte, los espectros de fluorescencia se desplazan a longitudes de onda cercanas al rojo y consecuentemente presentan corrimientos de Stokes importantes, un bajo recubrimiento espectral y tiempos de vida del orden de 1-4 ns.¹⁹⁻²²

Las naftoxazinonas, muestran propiedades fotofísicas similares a las benzoxazinonas, las cuales se ven fuertemente influenciadas por la posición del anillo oxazolinona respecto al naftaleno. Estos compuestos también presentan una notoria dependencia del máximo de emisión con la polaridad del solvente, tienen una importante separación de carga en el estado excitado y son relativamente fotoestables en ausencia de aditivos, aunque en presencia de compuestos electrodoadores como aminas, aumenta el rendimiento cuántico de fotoconsumo.²⁰ Las propiedades fotofísicas y su relativa fotoestabilidad en soluciones equilibradas con aire sugieren que los derivados de naftoxazinonas son compuestos fluorescentes con potencial para desarrollar aplicaciones en química y tecnología. En particular se ha evaluado su viabilidad para usarlas

como fotosensibilizadores de oxígeno molecular singulete, $O_2(^1\Delta_g)$. Así por ejemplo, la 2-[p-metoxifenil]-benzoxazinona produce oxígeno molecular singulete moderadamente.¹⁹ Al incluir grupos electrodonadores en el anillo aromático aumenta significativamente la emisión desde el estado singulete excitado, lo que es acompañado por la disminución en la capacidad de producir $O_2(^1\Delta_g)$. Las moléculas fluorescentes 2-fenil y 2-metil naftoxazinona, generan $O_2(^1\Delta_g)$ con un bajo rendimiento,¹⁹ mientras que los compuestos más eficientes para ser usados como sensibilizadores de $O_2(^1\Delta_g)$ en solventes orgánicos (benceno, acetonitrilo y metanol) son los derivados 3-fenil-2H-nafto[2,3-b]-oxazin-2-ona y 2-metil-3-fenilquinoxalin-2(1H)-ona.¹⁹ Como se señaló anteriormente, en general las naftoxazinonas son compuestos fotoestables cuando se irradian con energías normales y en ausencia de aditivos, pero en presencia de grupos dadores de electrones, tales como aminas y en condiciones extremas de irradiación, aumenta el rendimiento cuántico de fotoconsumo.²⁰ Por ejemplo las naftoxazinonas: 2-metil-3H-nafto[2,1-b][1,4]-oxazin-3-ona, 2-metil-9-hidroxi-3H-nafto[2,1-b][1,4]-oxazin-3-ona y 2-metil-9-metoxi-3H-nafto[2,1-b][1,4]-oxazin-3-ona, en condiciones extremas de irradiación son compuestos fotoreactivos y se fotodescomponen en un 12 %, un 2 % y un 5% respectivamente.¹⁹ La fotodescomposición de estos compuestos en ausencia de aditivos, puede explicarse a partir de la formación de un oxazol derivado, como producto de la irradiación; esta reacción involucra la ruptura del enlace C-O del heterociclo, decarboxilación y recombinación del dirradical resultante. En presencia de dadores de electrones, el proceso primario involucra transferencia de electrones desde el dador al triplete de más baja energía de la oxazinona, Figura 1.6.

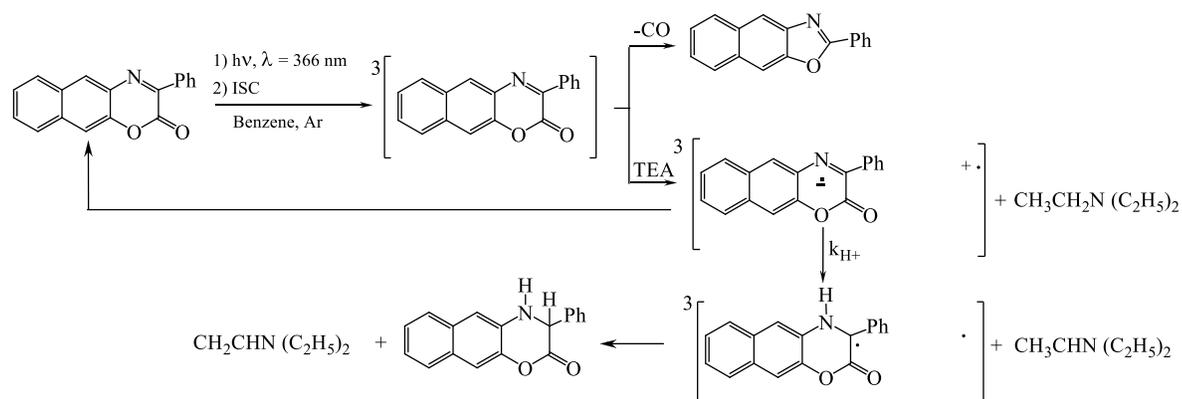


Figura 1.6. Esquema de reacciones de descomposición fotoquímica de naftoxazinonas.

Una familia de compuestos relacionada con las ariloxazinonas, corresponde a los ariloxazoles. En particular, los benzoxazoles han sido motivo de investigación en los últimos años, debido a sus múltiples aplicaciones, las que se encuentran en diversas áreas, tales como industria química, farmacéutica y tecnológica.²³⁻²⁸ Estudios recientes, sobre las características espectrales, emisión y absorción, del 2-fenilbenzoxazol y sus derivados con sustituyentes en posición para, lo sugieren como generador de láser UV, propuesta que se sustenta en los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, la eficiente emisión láser y la gran fotoestabilidad.^{29,30} Los espectros de absorción y emisión del 2-fenilbenzoxazol y sus derivados,³¹ sustituidos por grupos electrodonadores en posición para respecto al anillo fenilo, muestran una estructura vibracional resuelta en solventes polares, debido al doble enlace entre heteroátomo y el carbono 2 del heterociclo, el cual restringe la rotación de las dos subunidades (heterociclo y sustituyente). Un sustituyente electrodonador en el anillo fenilo del 2-fenilbenzoxazol, desplaza los espectros de absorción y emisión hacia longitudes de onda mayores. Éste comportamiento observado en el espectro de fluorescencia puede explicarse en términos de la transferencia de carga en el estado excitado, desde el anillo fenilo al benzoxazol. El significativo efecto solvatocrómico observado en las bandas de los espectros de absorción y emisión, como los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia de

los derivados del benzoxazol-5-il-alanina permiten su uso como marcador fluorescente para la detección de triptófano en sistemas biológicos.^{32,33} Algunas moléculas derivadas de benzoxazoles, también son una herramienta eficiente para monitorear y explorar las propiedades de micelas e interacciones hidrofóbicas en suero de albúmina humana²³ y para producir materiales poliméricos para óptica no-lineal con valores amplios de hiperpolarizabilidad.³⁴ Además, derivados de polibenzoxazol han sido propuestos como precursores fotosensitivos apropiados para aplicaciones en microelectrónica y en dispositivos electroluminiscentes.^{35,36}

Hasta hace algunos años, los naftoxazoles no habían sido estudiados desde el punto de vista fotofísico y fotoquímico. Se determinó, que en general estos compuestos presentan espectros de absorción UV-Vis insensibles a la polaridad del solvente, mientras que los espectros de fluorescencia en el mismo conjunto de solventes, muestran un importante efecto solvatocrómico reflejado en amplios corrimientos de Stokes. Las relaciones lineales de energía libre de solvatación empleadas para correlacionar la posición de los máximos de fluorescencia con los parámetros microscópicos del solvente, indican que existe un importante proceso de transferencia intramolecular de carga durante el proceso de excitación. Además, un análisis en términos de la ecuación de Lippert-Mataga³⁷ muestra un significativo aumento del momento dipolar en el estado excitado. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia para estos compuestos con cercanos a 1 en la mayoría de los solventes, tienen además, coeficientes de absorción molar elevados, tiempos de vida en el rango de los 1-2 ns y una gran fotoestabilidad. Específicamente, los naftoxazoles sustituidos con furano y quinolina presentan características espectroscópicas apropiadas para desarrollar eventuales aplicaciones. Especialmente, los naftoxazoles que están unidos al sustituyente a través de un puente vinílico como: 2-[(E)-2-quinolin-2-il-vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol, 2-[(E)-2-(1-benzofuran-2-il)vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol y 2-[(E)-2-(3-metil-1-benzotien-2-il)vinil]nafto[1,2-

d][1,3]oxazol.²¹ Estos compuestos, presentan un comportamiento espectroscópico relevante, sus coeficientes de absorción molar son mayores que $30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y sus espectros de absorción aparecen más desplazados hacia el rojo. En el caso de los derivados de quinolina e isoquinolina sus espectros de fluorescencia abarcan todo el rango visible (emisión de luz blanca)³⁸ cuando se observan en mezclas de solventes polares próticos que tienen altos valores del parámetro de acidez como trifluoroetanol (TFE) y hexafluoroisopropanol (HFIP) y un co-solvente aprótico polar básico como dimetilsulfóxido (DMSO), Figura 1.7.

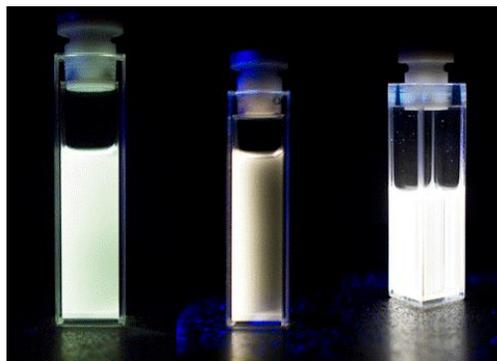
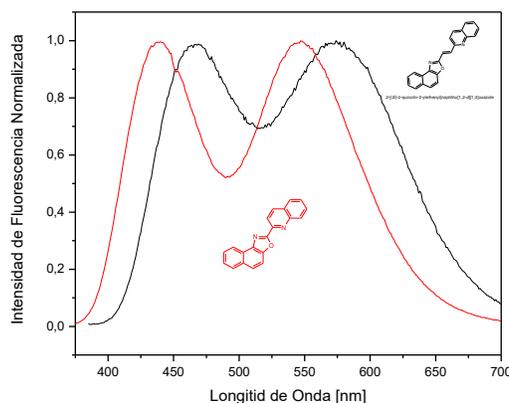


Figura 1.7. En la figura de la izquierda se muestran los espectros de emisión de fluorescencia normalizada, para los compuestos: 2-quinolin-2-il-nafto[1,2-d][1,3]oxazol (rojo) y 2-[(E)-2-quinolin-2-il-vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol (negro). En la figura de la derecha se observa la emisión de luz blanca del compuesto 2-quinolin-2-il-nafto[1,2-d][1,3]oxazol con distintas mezclas de TFE-DMSO.

La fluorescencia blanca observada en estos compuestos, cuando se encuentran en mezclas TFE-DMSO, proviene de un solapamiento de dos bandas del espectro de emisión, la banda de mayor energía corresponde a la emisión desde el estado localmente excitado (máximo a 443 nm) y la banda de menor energía se asocia a la emisión que resulta de la formación de un complejo en el estado excitado que involucra la transferencia intermolecular de protones.^{39,40} La fluorescencia dual observada en mezclas de compuestos,

podría conducir a importantes aplicaciones en el diseño de “OLED’s” si se encuentra un comportamiento análogo en fase sólida.

Otros compuestos que exhiben un comportamiento fotofísico interesante son los naftoxazoles sustituidos con furano, moléculas previamente estudiadas en nuestro grupo de investigación. Ambos compuestos el furilnaftoxazol (2-(furan-2-il)nafto[1,2-d][1,3]oxazol) y el furilvinilnaftoxazol (2-[(E)-2-(furan-2-il)vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol),²² presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia bajos, del orden de 0,02 a 0,07 en solventes polares y en solventes apolares como benceno o ciclohexano el rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta a 0,1 y 0,4, respectivamente. Los rendimientos cuánticos observados son muy bajos cuando se los compara con los observados con naftoxazoles sustituidos en posición 2 con una serie de grupos aromáticos. Este comportamiento, ha sido explicado en términos de un mecanismo de desactivación intramolecular del estado excitado del naftoxazol, el que ocurre mediante un proceso de transferencia parcial de carga desde el grupo furano al anillo oxazol. Considerando que, los compuestos derivados del furano reaccionan eficientemente con oxígeno molecular singulete,⁴⁰ cuando los naftoxazoles que tienen un grupo furano unido a la posición 2 directamente o a través de un puente vinilo, se irradian con luz visible en presencia de un sensibilizador de oxígeno molecular singulete,⁴¹ como azul de metileno o rosa de bengala, se observa la aparición de la fluorescencia típica del naftoxazol concomitante con un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia (Figura 1.8).

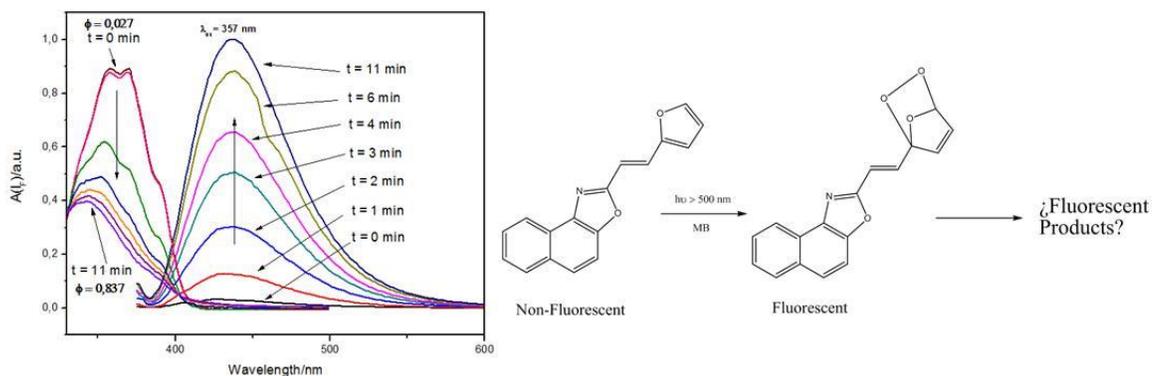


Figura 1.8. La imagen de la izquierda muestra la evolución de los espectros de absorción y fluorescencia del compuesto furilvinilnafotoxazol luego de irradiar azul de metileno en acetona con una lámpara halógena de 50 W, a través de un filtro de 500 nm. A la derecha, se muestra el esquema de reacción del furilvinilnafotoxazol con oxígeno singulete.

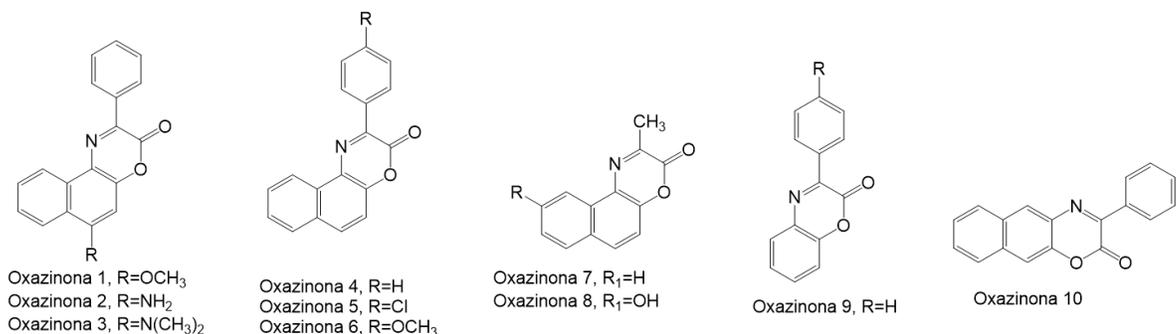
También, se ha encontrado que estas moléculas generan oxígeno excitado con muy bajos rendimientos cuánticos, menores que los observados para la SOSG (la sonda más utilizada para medir oxígeno excitado en sistemas biológicos empleando métodos fluorescentes), y que no reaccionan con otras especies activas de oxígeno como hidroperóxido y superóxido. Estos resultados permiten postular a estas moléculas como compuestos que actuarían en forma de un sensor del tipo “apagado-encendido”,^{42,43} el cual se enciende cuando reacciona con oxígeno molecular singulete, sin embargo, es deseable mejorar su solubilidad en agua e impedir eventuales reacciones secundarias con moléculas dadoras de electrones presentes en sistemas biológicos.

De la discusión anterior, se concluye que algunos aspectos generales y específicos del comportamiento fotofísico de ariloxazinonas y ariloxazoles son críticos para desarrollar eventuales aplicaciones: la baja solubilidad en agua, solvente compatible con el medioambiente, de ambos tipos de compuestos; la inestabilidad de ariloxazinonas en presencia de aditivos o cuando se someten a irradiación extrema; la conveniencia de producir luz blanca en fase sólida en el caso de oxazoles sustituidos con quinolinas y el interés que se prevé si se

obtuviera un sensor del tipo “apagado-encendido” basado en derivados furano sustituidos de ariloxazoles compatible con su empleo en sistemas biológicos.

En concordancia y considerando que la que la incorporación de moléculas fluorescentes a sistemas macrocíclicos mejora la solubilidad en agua, aumenta la estabilidad química y fotoquímica, y que los complejos formados limitan las reacciones indeseadas del huésped con moléculas exógenas o endógenas presentes en sistemas biológicos, en esta tesis se estudió la incorporación de ariloxazinonas en β -ciclodextrina y ariloxazoles en β - y γ -ciclodextrinas (Figura 1.9). Con éste propósito, se emplearon técnicas y metodologías que involucran medición de fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo. Se estudió la termodinámica del proceso de inclusión, con énfasis en el análisis de la dependencia de la energía libre, entalpía y entropía de inclusión con la estructura del huésped. Además, se realizaron estudios computacionales empleando metodologías de modelamiento molecular y de dinámica molecular, para optimizar la geometría del complejo heterociclo-ciclodextrina y estimar las contribuciones de las interacciones más importantes para la formación del complejo de asociación entre la molécula anfitrión y la molécula huésped. Este aspecto, aporta al conocimiento de los factores relativos a la estructura molecular que determinan la afinidad del anfitrión por el huésped. Adicionalmente, se evaluó si moléculas fluorescentes seleccionadas como huésped, que cambian su comportamiento fotofísico/fotoquímico relativo al observado para la molécula no complejada, son apropiadas para desarrollar aplicaciones relacionadas a la generación de luz blanca en fase sólida y detección de oxígeno excitado en medio acuoso mediante una molécula fluorescente que opera como un sensor del tipo apagado-encendido.

Ariloxazinonas



Ariloxazoles

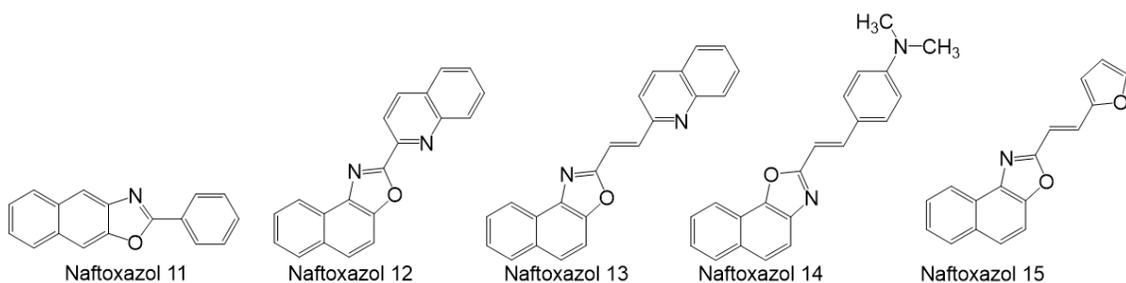


Figura 1.9. Estructura química de los derivados de ariloxazinonas y ariloxazoles.

La literatura muestra los derivados de cumarina tienen un comportamiento fotofísico similar al descrito para las oxazinonas. Las cumarinas se caracterizan por presentar espectros de fluorescencia que dependen de la naturaleza y posición de los sustituyentes en el anillo aromático. La presencia de grupos atractores de electrones conjugados con el grupo carbonilo inhiben la emisión,⁴⁴ al igual que grupos dadores de electrones en la posición 4, mientras los derivados de cumarina que poseen grupos dadores de electrones en la posición 7 muestran espectros de emisión relativamente intensos. El análisis del efecto solvente sobre las propiedades espectroscópicas de cumarinas, muestra que de forma análoga a las benzoxazinonas, sus homólogos estructurales, la 7-amino- y la 7-N,N-dimetilamino-4-metilcumarina presentan una significativa dependencia del espectro de emisión con el tipo de solvente, produciéndose un significativo corrimiento hacia el rojo con el

aumento de la polaridad del solvente. Si se comparan las propiedades fotofísicas de las cumarinas, se encuentra que la 7-amino-4-metilcumarina muestra una disminución significativa del ϕ_F en presencia de solventes polares, relativo al cambio observado para la cumarina 7-N,N-dimetilamino-4-metilcumarina. En particular, la 7-dimetilamino-1,4-benzoxazin-2-ona, presenta una intensa emisión en solventes apolares y en solventes polares no-próticos, mientras que en solventes polares próticos la intensidad de emisión disminuye notablemente.⁴⁵

Además las cumarinas han sido incluidas en ciclodextrinas. Estas moléculas presentan complejos de inclusión débiles con ciclodextrina ($K < 1000 \text{ M}^{-1}$). Por ejemplo la 7-metoxicumarina muestra una disminución de la intensidad de fluorescencia cuando forma el complejo de inclusión, mientras que la cumarina C153, la cumarina OST y las hidroxycumarinas (Figura 1.10) presentan un aumento de la fluorescencia al ser incluidas en la cavidad de la ciclodextrina.^{15,46-48} Otras cumarinas como la C460 y la C480 (Figura 1.10), han sido utilizadas para estudiar la dinámica de solvatación dentro de la cavidad de γ -ciclodextrina. Más recientemente, se ha estudiado detalladamente la fotodimerización de 6-metilcumarina en cucurbituril-8, encontrándose que la fluorescencia del huésped aumenta un factor 5 con la complejación, debido a una particular deformación geométrica del macrociclo.

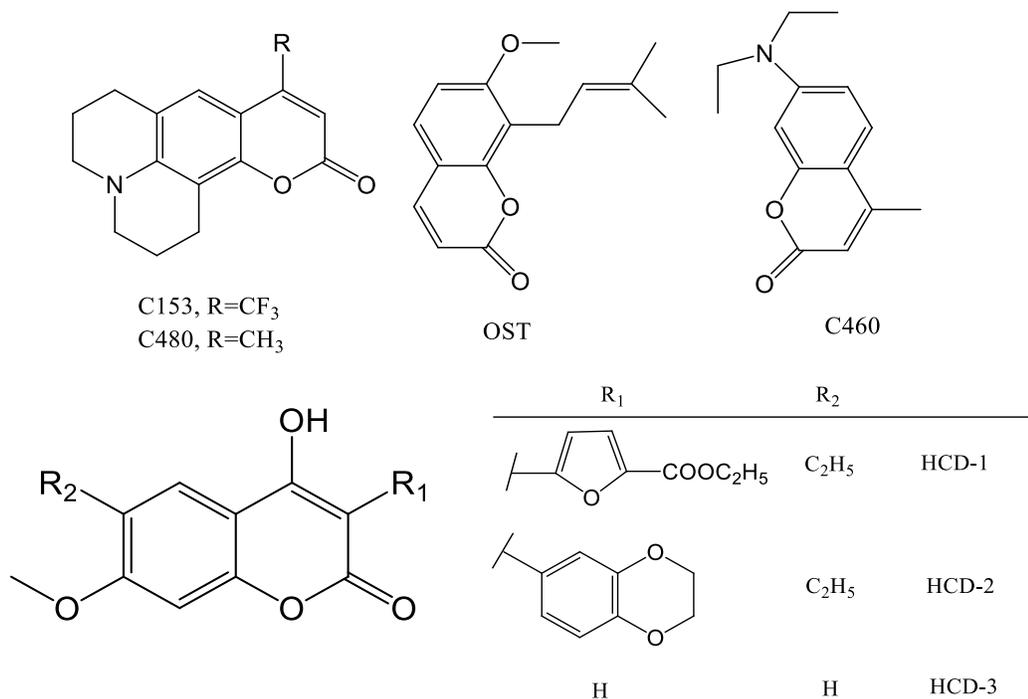


Figura 1.10. Estructura molecular de las cumarinas C153, C480, OST, C460, HCD-1, HCD-2 y HCD-3.

Para estudiar detalladamente el proceso de inclusión entre los derivados de ariloxazinonas y ariloxazoles con ciclodextrina, es necesario analizar los parámetros termodinámicos que controlan el proceso de inclusión, típicamente la constante de inclusión (K) y energía libre de Gibbs (ΔG°). Éstos dan cuenta de la espontaneidad del proceso de formación del complejo de inclusión, mientras que la entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) se relacionan al tipo de interacciones responsables de la estabilidad del complejo.⁴⁹ Entre las interacciones que permiten estabilizar la molécula huésped en la cavidad de la ciclodextrina se incluyen fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y ión-dipolo y efectos estéricos. Los cambios de entropía corresponden a cambios de entropía total e involucran contribuciones de los grados de libertad traslacionales, rotacionales y vibracionales.

Es importante entender desde el punto de vista termodinámico el proceso de formación de los complejos de inclusión, el sistema en estudio se compone por la molécula huésped (D), la molécula anfitrión (CD) y el complejo de inclusión (D-CD), representados por el siguiente equilibrio.



Donde n y m, corresponden a los coeficientes estequiométricos de las moléculas huésped y anfitrión, respectivamente.

La constante de equilibrio de la reacción representada por la ecuación 1.1, K, está dada por la ecuación 1.2

$$K = \frac{[D_n-CD_m]}{[D]^n [CD]^m} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

La constante de equilibrio, K, está expresada en concentraciones y no representa el proceso termodinámico de formación de los complejos de inclusión, para ello se usa la constante K_{TD} , la cual incluye el coeficiente de actividad, γ_i , de las especies en equilibrio.

$$K_{TD} = \frac{\gamma_{D_n-CD_m} [D_n-CD_m]}{\gamma_D^n \gamma_{CD}^m [D]^n [CD]^m} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Consecuentemente, γ_i corresponde a una medida de la desviación con respecto al comportamiento ideal. En una solución ideal, el coeficiente de actividad (γ_i) es igual a 1 y por lo tanto la actividad es igual a la concentración y por lo tanto la constante K, puede expresarse en unidades de concentración. En este estudio, se ha supuesto que las desviaciones de la idealidad no son significativas y en consecuencia, las constantes de equilibrio se han expresado en concentraciones. Por otra parte, la relación la constante de equilibrio y la energía libre estándar de la reacción:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

implica utilizar un estado estándar de concentración (típicamente 1 M) en la expresión para la constante de equilibrio de forma tal que esta sea adimensional. En esta tesis, y con propósitos comparativos con la literatura relacionada, se ha omitido el uso del estado de referencia y los valores de las constantes se han expresado en la escala de molaridad.

En este estudio, se ha supuesto que las desviaciones de la idealidad no son significativas, puesto que las fracciones molares de la molécula huésped, $\chi_{\text{huésped}} \cong 1,8 \cdot 10^{-7}$ M y hospedero $\chi_{\text{CD}} \cong 1,8 \cdot 10^{-4}$ M, caen en el rango de las soluciones muy diluídas, que típicamente se comportan idealmente, con coeficientes de actividad iguales a 1.

Para determinar experimentalmente la constante de inclusión, es posible aplicar diferentes metodologías las cuales dependerán de la técnica analítica a utilizar, entre otras, dicróismo circular, espectroscopia ultravioleta visible, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), voltametría, resonancia magnética de protones (^1H -RMN) y espectroscopia de fluorescencia.⁵⁰ En esta tesis se utilizó la técnica de fluorescencia, debido a que es sensible y rápida, requiere que las especies en solución sean de alta pureza y de un riguroso control de la temperatura a la cual se realiza el proceso. Se ha observado que se produce un cambio en la intensidad de fluorescencia, cuando una molécula fluorescente es incluida en la cavidad de la ciclodextrina. Empleando la metodología descrita por Benesi-Hildebrand⁵⁰ es posible relacionar el inverso de la diferencia en la intensidad de fluorescencia de la molécula huésped con la concentración de ciclodextrina. Este método ha sido aplicado al estudio del complejo de inclusión formado entre la 2-naftilamina-6-sulfonato y β -ciclodextrina,⁵¹ donde a partir de la ecuación de Benesi-Hildebrand, para complejos de inclusión con estequiometría 1:1, la constante de asociación obtenida es de $465 \pm 100 \text{ M}^{-1}$. También esta metodología ha sido aplicada al estudio de la incorporación de benzoquinolinas en β - y γ -ciclodextrinas.⁵² Las

constantes de inclusión obtenidas para complejos de inclusión con estequiometría 1:1, se encuentran en el orden de 10^2 M^{-1} y son mayores en complejos formados con β -ciclodextrina.

Otra metodología, comúnmente aplicada en la determinación de constantes de inclusión por técnicas fluorescentes, corresponde al método de Solubilidad de Fases propuesto en 1965 por Higuchi y Connors.⁵³ Este método permite determinar la constante de inclusión, a partir de la relación lineal entre la solubilidad de la molécula huésped y la concentración de ciclodextrina total. A modo de ejemplo, la determinación por solubilidad de fases, de la constante de asociación entre la hidroclorotiazida con β -ciclodextrina, para complejos de inclusión con estequiometría 1:1 es de 127 M^{-1} a 298 K y pH 7,4.⁵⁴ También, fue posible obtener a partir de este método, las constantes de inclusión para complejos formados por quercetina y β -ciclodextrina, hidroxipropil β -ciclodextrina y sulfobutil éter β -ciclodextrina iguales a 1028 M^{-1} , 11048 M^{-1} y 25340 M^{-1} , respectivamente.⁵⁵

Es importante señalar que además de los resultados obtenidos experimentalmente, es posible complementar el estudio realizando modelamientos moleculares para cada complejo. Cabe destacar que en la literatura existe una amplia variedad de estudios computacionales, que permiten entender la estructura, dinámica y comportamiento químico de las ciclodextrinas.⁵⁶⁻⁵⁸ Para este trabajo de investigación se aplicaron dos técnicas de modelamiento molecular, una de ellas es el *docking* y la otra es la dinámica molecular.

El desarrollo del *docking* molecular comenzó hace tres décadas promovido principalmente por el diseño de drogas y el desarrollo de la biología molecular.⁵⁹ En ciclodextrinas, la técnica de *docking* es una herramienta utilizada ampliamente, debido a que ayuda a explicar los resultados experimentales a partir del análisis de un modelo teórico. El estudio por *docking*

consiste en predecir la estructura tridimensional predominante, favorecida y estable para el complejo formado entre una molécula huésped y una molécula anfitrión. Además, esta técnica involucra la exploración de un espacio definido por la representación molecular de una molécula, usando un criterio energético para determinar la mejor pose, que muestre las interacciones de menor energía entre molécula huésped y la molécula anfitrión. Un estudio de *docking* aplicado al complejo de inclusión entre hidrocortizona y β -ciclodextrina,⁶⁰ demostró que ésta técnica es útil para predecir la conformación inicial del complejo de inclusión, la cual es refinada realizando estudios de dinámica molecular.

Como bien se sabe, las propiedades macroscópicas medidas experimentalmente no son observaciones directas, sino un promedio que representa el comportamiento de millones de moléculas que componen el sistema de estudio. Los estudios de dinámica molecular proveen información útil desde el punto de vista estructural y de movimiento del sistema en estudio.³⁹ A partir de experimentos de dinámica molecular es posible realizar estudios termodinámicos aplicando las metodologías de Mecánica Molecular/ Área de Superficie Poisson-Boltzman (MM/PBSA)⁶¹ y Mecánica Molecular/ Área de Superficie Generalizada de Born (MM/GBSA).⁶² Esta metodología de trabajo es útil para estudiar la descomposición energética de la energía libre, entender qué tipo de interacciones son las que modulan la estabilización del complejo de inclusión y evaluar la importancia relativa de los factores entálpicos y/o entrópicos en el proceso de inclusión.^{63,64}

1.2 Hipótesis

La incorporación de ariloxazinonas y ariloxazoles a la cavidad de ciclodextrinas para formar complejos de inclusión, causará un cambio en el comportamiento fotofísico de estas moléculas, relativo al observado en medio acuoso, que dependerá de su estructura. Este comportamiento permitirá estudiar la termodinámica del proceso de inclusión en función de la estructura molecular y evaluar si los complejos de inclusión entre ciclodextrinas y las moléculas estudiadas, permitirán desarrollar aplicaciones fluorescentes relacionadas con la generación de luz blanca en fase sólida y detección de oxígeno excitado en medio acuoso.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos Generales

- Estudiar la termodinámica del fenómeno de inclusión de ariloxazinonas y ariloxazoles en ciclodextrinas, en función de la estructura molecular.
- Evaluar si las moléculas fluorescentes seleccionadas como huésped, cambian su comportamiento fotofísico/fotoquímico relativo al observado para la molécula no complejada y si es posible desarrollar aplicaciones relacionadas a la generación de luz blanca en fase sólida y detección de oxígeno excitado en medio acuoso mediante una molécula fluorescente que opera como un sensor del tipo apagado-encendido.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Investigar el proceso de formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y derivados de ariloxazinonas y ariloxazoles, empleando espectroscopia de fluorescencia y/o el método de solubilización de fases.
- Determinar la constante de asociación por el método de Benesi-Hildebrand.
- Obtener los parámetros termodinámicos del proceso de inclusión a partir de la dependencia de la constante de asociación con la temperatura.
- Realizar un estudio químico-computacional para optimizar la geometría del complejo heterociclo-ciclodextrina con el fin de estimar las contribuciones de las interacciones más importantes para la formación del complejo de asociación entre la molécula anfitrión y la molécula huésped.

- Evaluar si los nuevos complejos anfitrión-huésped son apropiados para ser empleados en eventuales aplicaciones.
 - Generación de luz blanca en fase sólida.
 - Detección de oxígeno molecular singulete en medio acuoso.

CAPITULO 2

Materiales, Instrumentación y Metodologías

2.1 Materiales

Reactivos y Solventes:

- Beta ciclodextrina MERCK
- Gamma ciclodextrina Sigma-Aldrich
- Agua miliQ
- Acetona, Etanol y Metanol MERCK
- Ácido cítrico MERCK
- Citrato de Sodio MERCK
- Material de Vidrio
- Jeringas de vidrio de 5 y 10ml
- Matraces ámbar, aforados de vidrio de 10ml
- Balones de 100ml
- Refrigerante
- Frascos cilíndricos de vidrio con tapa, de diámetro 1,5 cm alto 5 cm

2.2 Instrumentación

2.2.1 Espectroscopia de Absorción

Los espectros de absorción de los compuestos estudiados se determinaron empleando espectrofotómetros Unicam UV-2 y UV-4, utilizando el software Vision y el espectrofotómetro Rayleigh, VIS-723G.

2.2.2 Espectroscopia de Emisión

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos utilizando un espectroflorímetro ISS PC1, utilizando el software Vinci.

Los espectros de fluorescencia en fase sólida, fueron obtenidos empleando un espectrofluorímetro Quattro, Optical Building Block Corporation.

2.2.3 Equipo para Agitación

Thermo Shaker Incubator MSC-100, Hongzhou Allseheng Instruments Co., rango de temperatura de 5° C a 100° C, rango de velocidad 200 rpm-1500 rpm.

2.3 Metodologías

2.3.1 Formación de los complejos de inclusión

Metodología I:

Para cada experimento se prepararon 11 soluciones de β -ciclodextrina con concentraciones en el rango de 0 a 10 mM, se añadió a cada solución una alícuota de 100 μ L de una solución 30 mM de la molécula fluorescente en metanol. Cada solución fue enrazada con buffer citrato para (pH 3 y pH 5) o buffer fosfato (pH 7,4), según sea el experimento a realizar. Las 11 soluciones se agitan por 24 horas a temperatura constante. Finalmente, las soluciones fueron filtradas antes de la medición espectroscópica.

Metodología II:

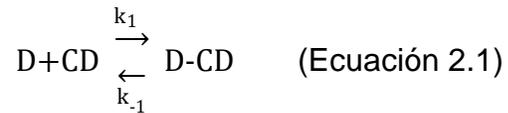
Para cada experimento se prepararon 11 soluciones de β -ciclodextrina de concentración 0 a 10 mM, añadiendo 1 mg de compuesto a cada matraz de 10 mL. Cada solución fue enrazada con buffer citrato a pH5. Las 11 soluciones se llevan a agitación por 24 horas a temperatura constante. Al igual que en la metodología I, las soluciones fueron filtradas antes de cada medición.

2.3.2 Determinación de la constante de inclusión

Método de Benesi-Hildebrand

Para determinar la constante de equilibrio o constante de asociación (K) y la estequiometría de los complejos no-covalentes, se empleó el método de Benesi-Hildebrand,⁵¹ utilizando la metodología I para preparar las soluciones.

Como las moléculas huésped emiten fluorescencia y coexisten en la misma solución con el complejo de inclusión, se supone el siguiente equilibrio, para el caso de los complejos de inclusión con estequiometría 1:1 (n=1).



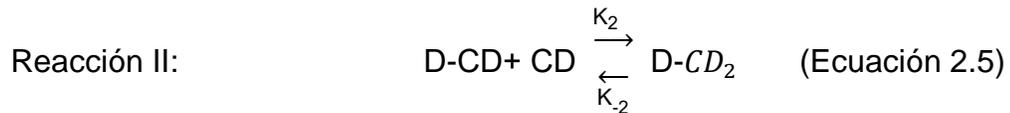
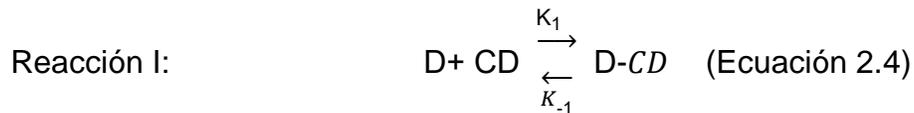
$$K_1 = \frac{[D-CD]}{[D][CD]} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Donde D, CD y D-CD, corresponden a la molécula huésped, molécula anfitrión y complejo de inclusión, respectivamente. K_1 , es la constante de equilibrio termodinámico para la reacción de formación del complejo de inclusión entre la molécula huésped y anfitrión. Los cambios espectrales pueden ser analizados de acuerdo a la ecuación de Benesi-Hildebrand (ecuación 2.3).

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K_1 k \Phi [D]_0} \times \frac{1}{[CD]_0} + \frac{1}{k \Phi [D]_0} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Donde $[CD]_0$ y $[D]_0$ son la concentración inicial de la molécula anfitrión y huésped, respectivamente, K_1 es la constante de asociación del complejo anfitrión-huésped, Φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia para el complejo de inclusión y k es una constante instrumental. ΔF , corresponde al cambio en la fluorescencia causado por la adición de molécula anfitrión ($\Delta F = F_x - F_0$, donde F_x y F_0 , son las intensidades de fluorescencia máxima en presencia y ausencia de CD). Al graficar $1/\Delta F$ versus $1/[CD]_0$ para cada sistema anfitrión-huésped, se debería observar una recta de donde se puede evaluar la constante K_1 a partir de la pendiente y el intercepto, si la estequiometría para la formación del complejo es 1:1.

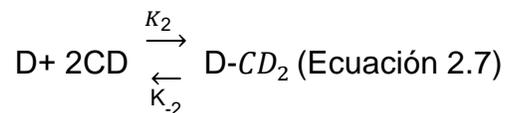
Para el caso de los complejos de inclusión con estequiometría 1:2 ($n = 2$), se consideran dos reacciones de equilibrio, correspondientes a la formación del complejo con estequiometría 1:1 (ecuación 2.4) y una segunda molécula de ciclodextrina que forma el complejo de inclusión con estequiometría 1:2.



Por lo tanto la ecuación no lineal que relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración de ciclodextrina, considerando las constantes de formación de complejos de inclusión, de acuerdo a la secuencia de equilibrios con estequiometría 1:1 y 1:2, corresponde a la ecuación 2.6.

$$I_{obs} = \frac{I_0 + I_1 K_1 [CD] + I_2 K_1 K_2 [CD]^2}{1 + K_1 [CD] + K_1 K_2 [CD]^2} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Donde [CD] es la concentración de ciclodextrina, K_1 y K_2 son las constantes de inclusión del complejo anfitrión-huésped con estequiometría 1:1 y 1:2. I_{obs} , corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima en presencia de ciclodextrina. Si la unión del huésped a la ciclodextrina es altamente cooperativa, $K_1 \ll K_2$, en otras palabras si la concentración de complejos de inclusión 1:1 es despreciable, la formación del complejo de inclusión puede ser descrita en términos de la reacción entre el huésped y dos moléculas de ciclodextrina, ecuación 2.7:



$$K_2 = \frac{[D-CD_2]}{[D][CD]^2} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

Donde D, CD y D-CD₂, corresponden a la molécula huésped, molécula anfitrión y complejo de inclusión de estequiometría 1:2, respectivamente. K_2 , es la constante de equilibrio correspondiente. Los cambios espectrales pueden ser

analizados de acuerdo a la ecuación de Benesi-Hildebrand, para complejos de inclusión con estequiometría 1:2 (ecuación 2.9):

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K_2 k \Phi [D]_0} \times \frac{1}{[CD]_0^2} + \frac{1}{k \Phi [D]_0} \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

Donde $[CD]_0$ y $[D]_0$ son la concentración inicial de la molécula anfitrión y huésped, respectivamente, K_2 es la constante de asociación del complejo anfitrión-huésped, Φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia para el complejo de inclusión y k es una constante instrumental. ΔF , corresponde al cambio en la fluorescencia causado por la adición de molécula anfitrión ($\Delta F = F_x - F_0$, donde F_x y F_0 , son las intensidades de fluorescencia máxima en presencia y ausencia de ciclodextrina). Al graficar $1/\Delta F$ versus $1/[CD]_0^2$ para cada sistema anfitrión-huésped, se obtiene una recta, de la cual se evalúa la constante K_2 a partir de la pendiente y el intercepto.

Método de solubilidad de fases

Otro método empleado en la determinación de la constante de inclusión es el método de solubilidad de fases, propuesto en 1965 por Higuchi y Connors.⁵³ Este método no sólo permite obtener el valor de la constante de inclusión sino que también es posible obtener la estequiometría del complejo formado. Este procedimiento es sensible a la concentración y pureza de las especies en solución, como también a la temperatura del proceso.

El método de solubilidad de fases, utiliza las curvas de solubilidad, las cuales son representadas en la Figura 2.1. Donde S_0 , corresponde la solubilidad de la molécula huésped en ausencia de ciclodextrina. Existen dos perfiles de solubilidad A y B, donde A corresponde a la formación de complejos de inclusión solubles y B sugiere la formación de complejos de inclusión muy poco solubles. Cada perfil se divide en diferentes curvas de solubilidad. Para el perfil A se encuentran las A_L , A_P y A_N , donde A_L representa el aumento lineal de la solubilidad de la molécula huésped en función de la

concentración de ciclodextrina, comportamiento esperado para aplicar el método de solubilidad de fase, mientras que A_P y A_N , representan a la desviación isotérmica positiva y a la desviación isotérmica negativa, respectivamente. Por otra parte el perfil B se divide en dos curvas, la curva B_S indica el límite de solubilidad para complejos de inclusión y B_I , corresponde a los complejos de inclusión insolubles.

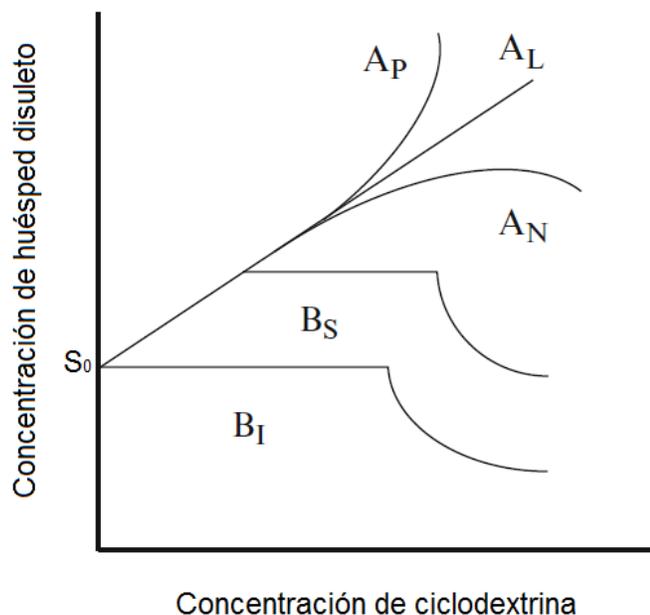


Figura 2.1. Diagrama solubilidad de fases para ciclodextrina.⁵³

El procedimiento empleado para la formación de los complejos anfitrión/huésped corresponde a la metodología II previamente mencionada, la cual en términos generales consiste en adicionar una cantidad constante de la molécula huésped en exceso a concentraciones crecientes de molécula anfitrión, en un volumen constante de mezcla. Luego, las soluciones son agitadas a temperatura controlada hasta que estas llegan al equilibrio termodinámico. Posteriormente, son filtradas y medidas a través de técnicas espectroscópicas, con el propósito de determinar la concentración del sustrato en solución.

Para determinar el valor de la constante de inclusión se considera el equilibrio:



$$K = \frac{D_mCD_n}{D^mCD^n} \quad (\text{Ecuación 2.11})$$

Donde D y CD corresponden a la molécula huésped y ciclodextrina respectivamente, m y n son los coeficientes estequiométricos para las moléculas anfitrión y huésped, D_mCD_n es el complejo de inclusión formado y K es la constante de inclusión del proceso.

Si la concentración de la molécula huésped D, tiene una solubilidad, S y S_0 en presencia y ausencia de ciclodextrina respectivamente. La solubilidad total (S_T) disuelta de la molécula huésped será:

$$S_T = S_0 + m[D_mCD_n] \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

Por lo tanto despejando D_mCD_n en la ecuación 2.12, la concentración del complejo de inclusión puede expresarse como:

$$[D_mCD_n] = \frac{S_T - S_0}{m} \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

En el caso de la molécula huésped, la concentración de ciclodextrina no complejada CD, se obtiene a partir de la diferencia entre la concentración total de ciclodextrina agregada (CD_T) y la concentración del complejo (D_mCD_n), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[CD] = CD_T - n[D_mCD_n] \quad (\text{Ecuación 2.14})$$

Si el complejo de inclusión formado posee estequiometría 1:1 ($n=1$) respecto a la ciclodextrina y reemplazando en la ecuación 2.12, en las ecuaciones 2.11 y 2.14, la solubilidad total de la molécula huésped podrá expresarse en función de la concentración de ciclodextrina agregada (CD_T), el

factor estequiométrico de la molécula huésped (m), la constante de inclusión K y la solubilidad en ausencia de ciclodextrina de la molécula huésped (Ecuación 2.15).

$$S_T = \frac{mKS_0^m}{1+KS_0^m} CD_T + S_0 \quad (\text{Ecuación 2.15})$$

La ecuación anterior corresponde a una ecuación de recta, de un gráfico S_T versus CD_T se puede calcular de la pendiente el valor de K.

$$K = \frac{mS_0^m}{1+KS_0^m} \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

Y si K es la constante para un complejo 1:1 ($m = n = 1$), entonces:

$$K_1 = \frac{\text{pendiente}}{S_0(1-\text{pendiente})} \quad (\text{Ecuación 2.17})$$

Una desviación positiva del perfil A (curva A_P), Figura 2.1, sugiere la formación de un complejo de inclusión de un orden mayor a uno, entonces para el caso de estequiometría 1:2 ($m=1$ y $n=2$), huésped/ciclodextrina, la solubilidad total (S_T) disuelta de la molécula huésped será:⁶⁵

$$S_T = S_0 + K_1S_0[CD] + K_1K_2[CD]^2 \quad (\text{Ecuación 2.18})$$

La estequiometría para el caso de complejos de inclusión 1:2 puede corroborarse graficando la ecuación cuadrática (ecuación 2.18).

2.3.3 Método gráfico de Job

Para corroborar la estequiometría del complejo de inclusión, se utilizó el método gráfico de Job,⁶⁶ que consiste en graficar $\Delta F[R]$ versus r , donde R es la concentración total del huésped y r corresponde a la fracción molar del huésped en la solución.

Las concentraciones del huésped (D) y del anfitrión (CD) en complejos de inclusión 1:n, se pueden expresar de la siguiente forma:

$$[D]=rM-[D:CD] \quad (\text{Ecuación 2.19})$$

$$[CD]=M(1-r)-n[D:CD] \quad (\text{Ecuación 2.20})$$

Finalmente para determinar la estequiometría del complejo de inclusión, D-CD_n, se obtiene el valor máximo de r del gráfico y se despeja n de la ecuación: $r = (n+1)^{-1}$.

2.3.4 Determinación de los parámetros termodinámicos

Los parámetros termodinámicos se obtuvieron siguiendo la formación de complejos de inclusión anfitrión-huésped en el rango de 20 - 60° C. De la constante de asociación, se calculó el valor de ΔG° y de su dependencia con la temperatura, se estimaron ΔH° y ΔS° , empleando gráficos de van't Hoff.

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (\text{Ecuación 2.21})$$

K: Constante de inclusión

R: Constante Universal de los gases ideales

T: Temperatura

ΔH° : Entalpía en condiciones estándar de presión y temperatura

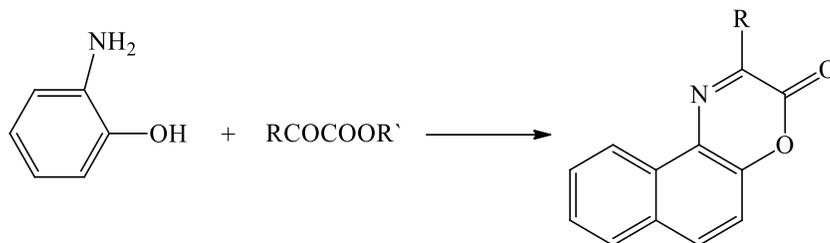
ΔS° : Entropía en condiciones estándar de presión y temperatura

2.3.5 Síntesis

Ariloxazinonas

Las ariloxazinonas, fueron sintetizadas previamente en el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, utilizando el método descrito por Moffet.⁶⁷

Esquema I: Reacción para la síntesis de ariloxazinonas.



La reacción del esquema I, entre el o-aminofenol y el α -cetoéster ocurre a temperatura ambiente, cuando los precursores son especies reactivas, sin embargo, cuando la reactividad es baja, la reacción se realiza a diferentes temperaturas dependiendo de la naturaleza del sustrato. A continuación, se describe el procedimiento general para la síntesis de ariloxazinonas:

En un balón seco de 3 bocas, de 25 mL, provisto de un refrigerante y agitación magnética, se disuelven 1 mmol de o-aminofenol y 1 mmol del α -cetoéster, en etanol. La mezcla se calienta a reflujo durante una hora y luego se enfría en un baño con hielo para que precipite la oxazinona. El producto sólido, se filtra y se lava con agua y se recristaliza en acetonitrilo. Una mayor purificación se logra utilizando una columna cromatográfica de sílica con una mezcla de solventes adecuada.

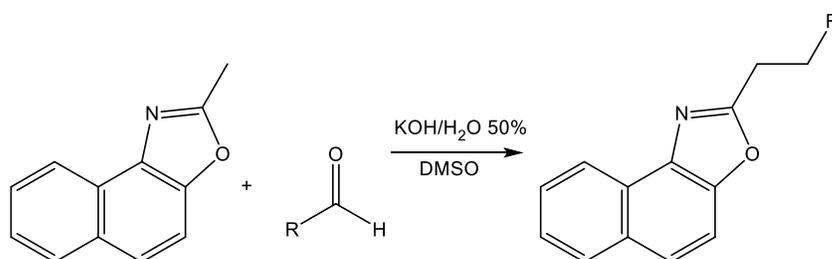
Las ariloxazinonas sintetizadas fueron:

- Oxazinona **2**: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) / ppm: $\delta=8,34$ (dd, 2H), $\delta=7,86$ (dd, 1H), $\delta=7,53$ (t, 1H), $\delta=7,46$ (dd, 2H), $\delta=7,43$ (t, 1H), $\delta=7,32$ (t, 1H).
- Oxazinona **3**: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) / ppm: $\delta=8,48$ (dd, 2H), $\delta=7,86$ (dd, 1H); $\delta=7,48$ (t, 1H), $\delta=7,33$ (m, 2H), $\delta=7,05$ (dd, 2H), $\delta=3,89$ (s, 3H),
- Oxazinona **5**: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) / ppm; $\delta=8,20$ (m, 2H), $\delta=7,44$ (m, 4H), $\delta=6,70$ (dd, 1H), $\delta=6,05$ (d, 1H), $\delta=5,94$ (s, 2H).
- Oxazinona **6**: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) / ppm: $\delta=8,33$ (m, 2H), $\delta=7,60$ (d, 1H), $\delta=7,49$ (m, 3H), $\delta=6,72$ (dd, 1H), $\delta=6,48$ (d, 1H), $\delta=3,15$ (s, 6H).

Ariloxazoles

Para la síntesis de los naftoxazoles, se utilizó el método descrito por M. Zajac,⁶⁸ que consiste en la condensación de metilnaftoxazol con un aldehído aromático utilizando hidróxido de potasio como base y dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente.

Esquema II: Reacción para la síntesis de ariloxazoles.



En esta metodología se emplea un balón seco de 50 ml, en el cual se disuelve 1 mmol de 2-metilnaftoxazol en 6 mL de dimetilsulfóxido. Luego se agregan 2 mL de una solución acuosa de KOH al 50% y finalmente 0,95 mmol del correspondiente aldehído. La mezcla se agita por 12 horas a temperatura ambiente. Al crudo de la reacción se agregan 10 mL de agua, precipitando un sólido en la mayoría de los casos, el cual es filtrado y lavado con metanol frío. Para una mayor purificación, se utiliza una columna cromatográfica de sílica con una mezcla de solventes adecuada o bien se recristaliza en metanol.

Sólo se sintetizó el ariloxazol **30**: ¹H-RMN (CDCl₃) / ppm: δ=9,35 (s, 1H), δ=8,66 (d, 1H), δ=8,54 (d, 1H), δ=8,56 (d, 1H), δ=8,13 (d, 1H), δ=8,09 (d, 1H), δ=8,02 (d, 1H), δ=7,98 (d,1H), δ=7,84 (d, 1H), δ=7,73 (d, 1H), δ=7,74 (m, 2H), δ=7,57 (dd, 1H), δ=7,33 (d, 1H).

βSO₃H-ciclodextrina

La β-ciclodextrina modificada con un grupo sulfonato se sintetizó agregando sobre una solución de 2,25 mmol de β-ciclodextrina en 10 mL de

diclorometano, agitada a 0° C. Luego se adiciona 4,5 mmol de ácido clorosulfónico, gota a gota durante 3 horas. Terminada la adición del ácido clorosulfónico, la mezcla se agitó por 2 a 4 horas adicionales, con el fin de remover completamente el ácido clorhídrico formado. Después la mezcla se filtró y lavó con 30 mL de metanol. Posteriormente se secó a temperatura ambiente obteniéndose 2,5 g de la β SO₃H-ciclodextrina.^{69,70} El producto fue analizado por espectrometría de masas y se encontró que la razón carga masa (m/z) para la β -ciclodextrina aparece a 1135 y para la ciclodextrina sulfonada a 1215.

2.3.6 Rendimientos cuánticos de fluorescencia

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F), corresponden a la razón entre los fotones absorbidos y los fotones emitidos a través del proceso de fluorescencia. Estos fueron medidos por el método de razones descrito por Eaton y Demas^{71,72} utilizando solventes representativos de la escala de polaridad, usando sulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1N ($\phi_F=0,55$) como actinómetro.

Brevemente, el método consiste en medir los espectros de absorción y emisión, manteniendo la geometría del sistema. Para calcular los rendimientos cuánticos de fluorescencia se empleó la ecuación:

$$\phi_x = \left(\frac{GRAD_x}{GRAD_{Act}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{Act}^2} \right) \phi_{Act} \text{ (Ecuación 2.22)}$$

Donde ϕ_x y ϕ_{Act} , corresponden a los rendimientos cuánticos de fluorescencia de la muestra y el actinómetro, $GRAD_x$ y $GRAD_{Act}$ son las pendientes gráfico del espectro integrado de fluorescencia versus la absorbancia, para la muestra y para el actinómetro, respectivamente y η_x y η_{Act} corresponden al índice de refracción del solvente en el que se encuentra la muestra y el actinómetro respectivamente.

2.3.7 Determinación de tiempos de vida de fluorescencia

Los tiempos de vida de las moléculas fluorescentes se midieron usando un sistema de conteo de fotones PicoQuant Fluotime 200, que permite medir la fluorescencia resuelta en el tiempo de alta resolución. Se midieron soluciones de la sonda equilibradas con aire en diferentes solventes. La absorbancia de la sonda se ajustó a alrededor de 0,1 en el máximo de absorción de la banda de menor energía.

2.3.8 Determinación de oxígeno molecular singulete

Las medidas del tiempo de vida del oxígeno molecular singulete, se realizaron utilizando un espectrómetro infrarrojo resuelto en el tiempo que permite la detección de la fosforescencia del oxígeno excitado resuelta en el tiempo a 1270 nm. Las mediciones se efectúan empleando celdas de fluorescencia de 1 cm, y a temperatura ambiente (20°C). La intensidad de emisión y por lo tanto la señal eléctrica producida por el detector, es proporcional a la concentración de oxígeno singulete.

2.3.9 Generación de Luz Blanca

Medio Acuoso:

Se preparó una solución 30 mM del naftoxazol **13** en solución buffer a pH 5, se tomó una alícuota de 200 μ L del compuesto y fue añadido a 6 matraces de 5 mL con β SO₃H-ciclodextrina, en concentraciones de 20, 21, 22, 23, 24 y 25 mM. Cada solución fue agitada durante 24 horas a temperatura controlada.

Medio Sólido:

Se preparó una solución 30 mM del naftoxazol **13** en solución buffer a pH 5, se tomó una alícuota de 200 μ L del compuesto y fue añadido a 6 matraces de 5 mL con β SO₃H-ciclodextrina, en concentraciones de 20, 21, 21,2, 21,4, 22 y 23 mM. Cada solución fue agitada durante 24 horas a temperatura controlada

y posteriormente liofilizada; 3 mg del sólido obtenido fueron depositados entre dos placas de cuarzo de 0,5 cm x 0,5 cm, para luego medir su intensidad de fluorescencia.

2.3.10 Cinéticas de consumo del complejo de inclusión naftoxazol 15/β-ciclodextrina en presencia de oxígeno molecular singulete

El consumo de sondas fluorescentes por reacción con oxígeno molecular singulete, fue seguido mediante espectroscopia de absorción UV visible y por emisión de fluorescencia. La fotólisis se realizó utilizando una lámpara de 50 watts de potencia colocada a una distancia de 20 cm de la celda de fotólisis, de forma que durante el experimento la geometría del sistema permanezca constante. La fotólisis fue registrada cada 1 minuto hasta que se consuma entre un 50% a un 90% de la molécula fluorescente. La temperatura del sistema se mantuvo constante a 25° C, mediante la circulación de agua desde un baño termostático y el rango de longitudes de onda de la luz incidente fue controlado a través de filtros de corte apropiados de forma tal que sólo absorba del sensibilizador. En la cubeta de paso óptico de 1 cm, se agregó 3 mL de solvente, la sonda en una concentración adecuada y azul de metileno como sensibilizador.

2.3.11 Determinación de la constante de desactivación de oxígeno molecular singulete.

Las constantes de desactivación de oxígeno molecular singulete fueron obtenidas a partir de mediciones del tiempo de vida del oxígeno excitado en ausencia y presencia de distintas concentraciones de desactivante, para este caso el complejo de inclusión naftoxazol 15/ β-ciclodextrina, utilizando agua deuterada como solvente. La fosforescencia del $^1\text{O}_2$ fue detectada por medio de un sistema PicoQuant Fluotime 200 modificado. Para la excitación se utilizó un láser Nd:YAG (FTSS355-Q, Crystal Laser, Berlin, Germany) bombeado por diodo usando una velocidad de repetición de 1 kHz. La luminiscencia emitida

por el oxígeno excitado fue filtrada con un filtro de silicio (Edmund Optics, U.K.) y un filtro de interferencia centrado a 1265 nm (Spectrogon, Sweden) para remover la luz dispersada y la fluorescencia remanente del láser. Para la detección se utilizó un tubo fotomultiplicador sensible en el IR-cercano (Hamamatsu Photonics Hamamatsu City, Japan). El conteo de fotones se realizó con un escalador multicanal PicoQuant's Nanoharp 250. Las señales de la emisión resuelta en el tiempo fueron analizadas usando el software PicoQuant FluoFit 4.0, que permite extraer el tiempo de vida y los valores de amplitud. Los valores de las constantes de desactivación se obtuvieron, usando la ecuación de Stern-Volmer, a partir de la pendiente de gráficos de la constante de decaimiento del oxígeno excitado versus la concentración de la sonda de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$k_d = k_d^0 + k_q[S] \quad (\text{Ecuación 2.23})$$

Donde k_d^0 , es la constante de velocidad del decaimiento del oxígeno molecular singulete en ausencia de aditivos, k_d es la constante de velocidad de decaimiento del oxígeno molecular singulete en presencia de desactivante y k_q es la constante de velocidad total de desactivación de oxígeno molecular singulete.

2.3.12 Estudios Computacionales

Obtención de las estructuras cristalinas de la β -ciclodextrina

Para los cálculos computacionales, se empleó la estructura cristalina de la β -ciclodextrina, descargada de la base de datos Protein Data Bank (www.rcsb.org), código: 1BFN.⁷³

Optimización de geometría

Con el propósito de obtener la estructura molecular de mínima energía para cada una de las moléculas derivadas de ariloxazinonas y ariloxazoles, se realizó una optimización de la geometría con el programa Gaussian98,⁷⁴ aplicando la teoría de funcionales de densidad (DFT), debido a su gran utilidad en el análisis de moléculas orgánicas.⁷⁵⁻⁷⁷ Para este estudio se utilizó el funcional híbrido B3LYP y combinando el conjunto de funciones base con doble función de polarización 6-31G (d,p), debido a que se ha demostrado que estas funciones matemáticas son las que describen los orbitales moleculares de los sistemas orgánicos de mejor manera.^{78, 79}

Determinación de Cargas Parciales

El método más preciso que ofrece el programa AMBER14⁸⁰ para definir las propiedades electrostáticas de un sistema es el ajuste restringido del potencial electrostático (Restrained Electrostatic Potential Fit o RESP). El método RESP ajusta el potencial electrostático calculado mecánicamente a superficies moleculares, usando un modelo de carga puntual centrada en el átomo. Para generar el archivo de entrada del potencial electrostático para ejecutar RESP, se usa el programa Gaussian98⁷⁴ y se obtienen las cargas RESP de la molécula con el programa RED-III-4.^{81,82}

Estudio de modelamiento molecular

Un método útil para el acoplamiento molecular o *docking*, consiste en predecir la orientación preferida de una molécula cuando ésta interactúa con otra. En esta tesis se estudió la orientación más favorecida y de mayor afinidad para la formación de un complejo estable entre la molécula anfitrión (ariloxazinonas y ariloxazoles) y la molécula huésped (β -ciclodextrina).

Existen dos métodos de *docking*, sistemático y estocástico. En el primer caso la búsqueda es determinística y está dirigido principalmente a sistemas rígidos en los cuales hay sólo 6 grados de libertad. El segundo método, corresponde a una búsqueda aleatoria y es usado para sistemas flexibles.⁶¹ Para este trabajo se utilizó el software AutoDock4,⁸³ el cual para otorgar el puntaje de *docking* utiliza una función basada en los campos de fuerza de mecánica molecular, diseñados para el software AMBER.⁸⁴

AutoDock, Es un programa de *docking* basado en un detallado modelo de interacciones intermoleculares no-covalentes. Debido a la complejidad de las correlaciones encontradas entre la constante de afinidad (K), de un compuesto y la energía libre de interacción determinada por métodos de mecánica molecular, AutoDock cuenta con una función empírica basada en el estudio de múltiples complejos cristalizados cuyas constantes de afinidad han sido determinadas experimentalmente, obteniendo de este modo relaciones empíricas entre la estructura molecular y energías libres de interacción. La función empírica se amplía para modelar la energía libre de interacción incluyendo términos entrópicos:

$$\Delta G = \Delta G_{vwd} + \Delta G_{pteh} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol} \quad (\text{Ecuación 2.24})$$

En la Ecuación 2.24, los primeros cuatro términos (ΔG_{vwd} , ΔG_{pteh} , ΔG_{elec} y $\Delta G_{conform}$) corresponden a los típicos términos de mecánica molecular tales como energías libres de dispersión/repulsión, puentes de hidrogeno, electrostáticas y desviaciones de la geometría covalente, respectivamente.^{85,86} El término ΔG_{tor} , modela la restricción dada por el rotor interno (enlace sp^3) junto con la rotación y traslación global. El termino ΔG_{sol} , modela la desolvatación que se produce después de la interacción junto con el efecto hidrofóbico (el cambio de entropía en soluto-solvente en la interface de interacción).

Tomando en cuenta un modelo más detallado como lo es el ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg,⁸⁶ el cual corresponde a una función de energía mejorada, que incorpora a la ecuación 2.24 términos de desolvatación basados en evaluaciones de volumen ocupado por los átomos de carbono del ligando y de los términos constantes para los puentes de hidrógenos, los cuales fueron desarrollados por modelos de desolvatación para átomos polares.⁸³

$$\Delta G = \Delta G_{vwd} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{pteh} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{pteh} \right) + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij})} \right) + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{i,c,j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (\text{Ecuación 2.25})$$

En la ecuación 2.25, los cinco términos son coeficientes determinados empíricamente por análisis de regresión lineal para un número de complejos ligando-proteína, con constantes de afinidad conocida. Las contribuciones de vacío incluyen tres términos energéticos, el primero corresponde a Lenard-Jones 12-6 dispersión/repulsión, el segundo a la dirección de puentes de hidrogeno 12-10, donde E(t) depende del ángulo t definido por el átomo de prueba y un receptor; luego un término que describe el potencial electrostático de Coulomb y finalmente el término que describe la entropía de pérdida conformacional del ligando tras la unión. Este término es proporcional con los enlaces sp³ del ligando.

La estructura cristalográfica de β-ciclodextrina,⁷³ se utilizó para modelar su geometría tridimensional. Los estudios de acoplamiento molécula-ciclodextrina, se llevaron a cabo utilizando el programa AutoDock4 con el algoritmo de Lamarkian (LGA).⁸³ El volumen escogido para los mapas de grilla serán de 40 x 40 x 40 puntos. La elección de la conformación más estable será basada en un criterio de menor puntaje de *docking*.

Dinámica molecular

La dinámica molecular es una herramienta útil para entender el principio físico y función de macromoléculas, debido a que involucra el uso de cálculos computacionales para simular el movimiento de átomos o grupos de átomos en un sistema. Los cálculos de dinámica molecular son capaces de determinar la posición y aceleración de todos los átomos del sistema en una serie de pasos. La variación de la posición de un átomo en el tiempo que transcurre la dinámica se conoce como trayectoria. Para poder hacer los cálculos de dinámica es importante emplear un campo de fuerza, el cual otorga al sistema los parámetros necesarios, basados en funciones matemáticas que describen la energía potencial del sistema.

Los cálculos, están basados en la segunda ley de Newton, la cual relaciona la fuerza con la aceleración, de acuerdo a la siguiente ecuación diferencial:

$$F_i = m_i \frac{d^2 R_i}{dt^2} = \sum_j - \frac{\partial u_{ij}(\vec{r}_{ij})}{\partial \vec{r}_{ij}} \text{ (Ecuación 2.26)}$$

Donde F_i es la fuerza ejercida por la partícula denotada por i , m_i es la masa de la partícula i , R_i es el radio de la partícula i , t es el tiempo y u_{ij} es el potencial interatómico entre el átomo i y el átomo j . Cuando la ecuación de Newton es integrada, la energía se conserva, por lo que en general se trabaja a temperatura constante.

En general, la dinámica molecular se utiliza para el estudio de la estructura y comportamiento de las moléculas, de acuerdo al potencial intermolecular. Debido a que existen distintos mínimos locales de energía en la superficie de energía potencial, es conveniente realizar los cálculos con la estructura de mínima energía, la cual corresponde a cero kelvin. Luego de minimizado el sistema, se eleva a temperatura, para que la molécula comience

a experimentar movimientos vibracionales, hasta que cruza la barrera de energía y es re-optimizada para dar una nueva estructura.

Los cálculos de dinámica molecular se dividen en tres etapas: primero se realiza una etapa de minimización en la cual se restringe el movimiento de los átomos que conforman el sistema, con el propósito de obtener una estructura de referencia. Luego se equilibra el sistema, para ello se calienta de 0 a 300 K, en tres pasos consecutivos de 100 K cada uno y finalmente se realiza la etapa de producción por un tiempo determinado.

Para este trabajo se utilizó el programa AMBER14⁸⁰ empleando un conjunto de parámetros generales de campos de fuerza, GAFF,⁸⁴ el cual posee los parámetros para todas las moléculas orgánicas que están compuestas por los átomos de C, N, O, H, S, P, F, Cl, Br y I y GLYCAM_06h,⁸⁵ diseñado específicamente para carbohidratos. Para realizar las simulaciones, se empleó las estructuras de los complejos obtenidas a partir de docking molecular. Se parametrizó cada una de las estructuras (ligando, receptor, complejo), además de parametrizar la estructura de complejo solvatado en un caja octaédrica de agua TIP3P, luego se minimizó y equilibró el sistema de 100 a 300 K. Se aplicó el algoritmo SHAKE para restringir los átomos de hidrógeno. Luego se calentó el sistema hasta la fase de equilibrio para posteriormente llegar a la etapa de producción (20ns). Los análisis de las trayectorias de la dinámica molecular se realizaron con el programa VMD v.1.9.⁸⁶

Determinación de los parámetros termodinámicos basados en los métodos MM/PBSA⁶² y MM/GBSA⁶³

Los métodos computacionales actualmente permiten determinar las energías libres de unión para macromoléculas, combinando los cálculos de mecánica molecular y modelos de solvatación continuos. En esta tesis se utilizaron los métodos de Mecánica Molecular/ Área de Superficie Poisson-

Boltzman (MM/PBSA)⁶² y Mecánica Molecular/ Área de Superficie Generalizada de Born (MM/GBSA),⁶³ debido a que son eficientes y no requieren de elevados recursos computacionales. Para ambos métodos la energía libre de unión (ΔG_{bind}) entre la molécula anfitrión (L) y la molécula huésped (R), las cuales forman un complejo (RL) se calcula a partir de las ecuaciones, derivadas del ciclo termodinámico descrito en la Figura 2.2.⁸⁷

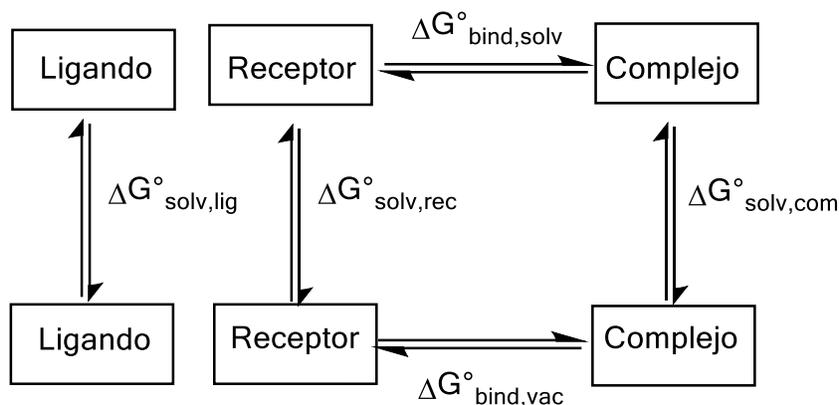


Figura 2.2. Ciclo termodinámico empleado para evaluar las diferencias de energía libre. Donde $\Delta G^{\circ}_{solv,lig}$, $\Delta G^{\circ}_{solv,rec}$ y $\Delta G^{\circ}_{solv,com}$, corresponden a las energías libres de solvatación del ligando, receptor y complejo, respectivamente y $\Delta G^{\circ}_{bind,solv}$ y $\Delta G^{\circ}_{bind,vac}$ son las energías libres de la unión en presencia de solvente y en el vacío, para complejo de inclusión ligando y receptor respectivamente.

La diferencia de energía libre de unión ΔG°_{bind} está dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} - T\Delta S \quad (\text{Ecuación 2.27})$$

Donde ΔE_{MM} , ΔG_{sol} y $-T\Delta S$ son los cambios de la energía en fase gas calculada por métodos basados en mecánica molecular (MM), la energía libre de solvatación y la entropía conformacional, respectivamente, tras la unión de la molécula anfitrión con el huésped. ΔE_{MM} , incluye $\Delta E_{interna}$ (cambio de energías de enlace, ángulos y ángulos diedros), $\Delta E_{electrostática}$ (cambio de energía electrostática) y ΔE_{vdw} (cambio de energía de van der Waals).

Para cada sistema:

$$\Delta\bar{G}_x = \Delta\bar{E}_{MM} + \Delta\bar{G}_{PBSA/GBSA} - TS_{MM} \text{ (Ecuación 2.28)}$$

Donde x= ciclodextrina libre, ligando libre y complejo

$\Delta\bar{E}_{MM}$, corresponde a la energía promedio calculada por mecánica molecular, la cual depende de la función de campo de fuerza usado para representar las siguientes variables:

$$\Delta\bar{E}_{MM} = \Delta\bar{E}_{enlaces} + \Delta\bar{E}_{ángulos} + \Delta\bar{E}_{torsiones} + \Delta\bar{E}_{vdw} + \Delta\bar{E}_{elec} \text{ (Ecuación 2.29)}$$

El término, $-TS_{MM}$, es la entropía del soluto que es calculada a partir de un análisis cuasi-armónico de sus trayectorias.

Ambas metodologías consideran la energía libre de solvatación como, ΔG_{sol} :

$$\Delta G_{solvatación} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \text{ (Ecuación 2.30)}$$

$$\Delta G_{no,solv} = \gamma SASA + b \text{ (Ecuación 2.31)}$$

Donde SASA es calculado por la metodología de combinaciones lineales de superposición de pares (Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO)),⁸⁸ donde γ y b son parámetros empíricos.

Para el método de MM/PBSA, $\Delta\bar{G}_{PBSA}$, corresponde a la energía libre electrostática de desolvatación calculada a partir de la diferencia de energía libre obtenida en el vacío y en fase condensada, respectivamente:

$$\Delta G_{solvatación}^{elec} = G_{elec}^{\varepsilon=80} - G_{elec}^{\varepsilon=1} \text{ (Ecuación 2.32)}$$

Donde ε es la constante dieléctrica (80 para agua y 1 para el interior de la ciclodextrina). Los cálculos de energía libre electrostática usando ambas constantes son obtenidos a partir de la siguiente ecuación:

$$G_{elec} = \frac{1}{2} \int_V \rho(r)\varphi(r)dV \text{ (Ecuación 2.33)}$$

En la ecuación 2.33, el volumen (V) es integrado en todo el espacio. Para calcular la energía libre electrostática, son necesarios los valores de densidad de carga ($\rho(r)$) y de potencial electrostático ($\phi(r)$) calculados a partir de la solución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzmann (PB):

$$\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] - \kappa^2(r)\sinh\phi(r) = -4\pi\rho^f(r) \text{ (Ecuación 2.34)}$$

Donde κ es el parámetro de Debye-Hückel, el cual está relacionado con la raíz cuadrada de la fuerza iónica. ρ^f , es la densidad de carga que representa la distribución de carga atómica parcial de la macromolécula; \sinh , es aplicado debido a la presencia del parámetro de Debye-Hückel y provee una descripción de la media de los campos de fuerza de los iones.

Una aproximación de cálculo más rápida y precisa que MM/PBSA, es la metodología de MM/GBSA, en esta técnica a las energías libres de solvatación electrostática, se agregan las energías libres de solvatación apolar, las cuales son consideradas proporcionales al área superficial accesible del solvente (SASA).

Cálculos de Orbitales Naturales de Enlace (NBO)

El análisis de NBO⁸⁹⁻⁹¹ provee una imagen precisa de la estructura de Lewis de una molécula usando un alto porcentaje de la representación de la densidad electrónica orbital. Por lo tanto, esta herramienta permite entender las interacciones intra e intermoleculares recogiendo principalmente información desde las interacciones que ocurren entre los orbitales ocupados y virtuales. También proporciona información respecto a los cambios de densidad de carga entre los átomos, los cuales pueden actuar como dadores o aceptores con relación a la molécula sola o a distintas moléculas interactuando. Esta relación permite determinar la estabilidad del sistema debido a la interacción entre orbitales enlazantes y antienlazantes.⁹¹

La relación entre un donador (i) y un aceptor (j) corresponde a la energía de estabilización $E(2)^{N.B.}$ la cual se obtiene a partir de la ecuación 2.35.

$$E(2)_{i \rightarrow j^*} = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F(i,j)^2}{E_j - E_i} \quad (\text{Ecuación 2.35})$$

En donde q_i es el orbital donador ocupado; E_i , E_j son las energías de los orbitales y $F(i,j)$ se obtiene a partir de la matriz elemental de NBO Fock, la cual corresponde a la aplicación de un operador monoelectrónico cuya matriz en una base completa de espin-orbitales. Valores altos de $E(2)$ corresponden a una interacción fuerte entre un átomo dador y uno aceptor, o en otras palabras, una fuerte tendencia dadora desde el átomo dador hasta el aceptor y consecuentemente una alta extensión de la conjugación en todo el sistema resultado la estabilidad de éste. Todos los cálculos se realizaron usando el programa NBO 6.0.⁹²

N.B. La energía $E(2)$, corresponde a la energía de interacción estabilizante entre los orbitales de los átomos involucrados, dando cuenta de la fuerza de la interacción y no de su valor cuantitativo.

CAPITULO 3: Resultados y Discusión

Estudio de las propiedades fotofísicas de las ariloxazinonas y ariloxazoles

3.1 Ariloxazinonas

Los derivados de ariloxazinonas, tales como benzoxazinonas y naftoxazinonas, son compuestos que presentan características espectrales y propiedades fotofísicas interesantes desde el punto de vista de sus espectros de absorción y emisión, los cuales en solventes orgánicos de elevada polaridad, muestran desplazamientos batocrómicos, amplios corrimientos de Stokes y tiempos de vida de fluorescencia relativamente cortos.^{20,21} Estas moléculas han sido propuestas como sondas fluorescentes para determinar propiedades fisicoquímicas locales en sistemas de interés biológico, debido a la sensibilidad de los máximos de emisión con el solvente y a la gran fotoestabilidad que poseen.^{20,21} Estudios en medio acuoso de la fotofísica de estas moléculas han sido infructuosos, debido a su pobre solubilidad en agua, lo cual limita significativamente el desarrollo de nuevas aplicaciones para éstos compuestos.

Con el propósito de estudiar y caracterizar las propiedades fotofísicas de las ariloxazinonas, se estudiaron las moléculas 1-10 (descritas en la Figura 3.1), en medio acuoso, e incluidas en β -ciclodextrina. Se eligieron moléculas que presenten modificaciones estructurales, tanto en el anillo (lineal o angular) como en los sustituyentes (dadores y aceptores), con el objetivo de observar si existen cambios solvatocrómicos significativos y variaciones en los corrimientos de Stokes, cuando estas moléculas se incluyen dentro de la β -ciclodextrina.

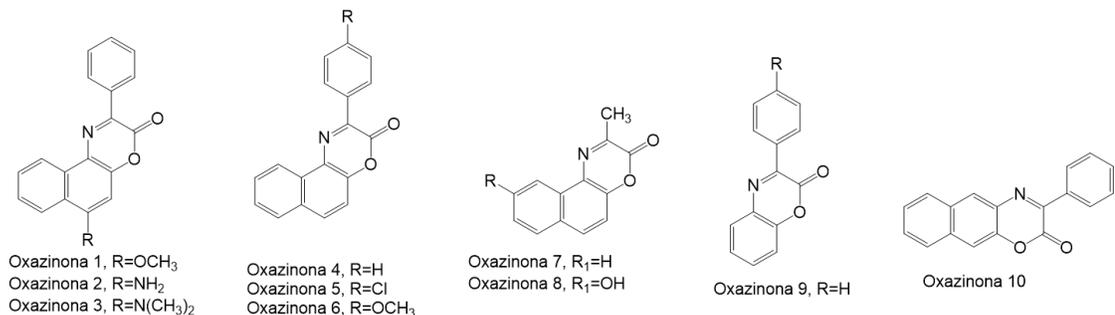


Figura 3.1: Estructura molecular de las ariloxazinonas incluidas en β -ciclodextrina.

Comportamiento fotofísico de las ariloxazinonas en ausencia y presencia de β -ciclodextrina

Para cada ariloxazinona se determinaron los espectros de emisión de la molécula libre en benceno y acetonitrilo, junto con los de molécula libre en medio acuoso y formando complejo de inclusión en agua. Los resultados se resumen en la Tabla 3.1, donde en general se observan desplazamientos batocrómicos de los máximos de emisión a medida que la polaridad del solvente aumenta.

Las naftoxazinonas **1**, **2** y **3**, poseen sustituyentes con características electrónicas dadoras en posición 6 respecto al heterociclo. Las oxazinonas **2** y **3**, tienen grupos amino y N,N-dimetilamino, respectivamente, mientras que la oxazinona **1**, posee un grupo metoxilo. La presencia de estos sustituyentes, provoca importantes desplazamientos batocrómicos de los máximos de emisión, los cuales se encuentran descritos en la Tabla 3.1. Por ejemplo cuando se compara benceno con acetonitrilo, las oxazinonas **1**, **2** y **3**, presentan desplazamientos batocrómicos de sus máximos de emisión de 92 cm^{-1} , 491 cm^{-1} y 258 cm^{-1} , respectivamente.

Tabla 3.1. Longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc} /nm) y longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$ /nm), de las oxazinonas **1-10** en solventes con distinta constante dieléctrica, ϵ (benceno, acetonitrilo y agua) y en β -ciclodextrina.

OXAZINONA	λ_{exc} /nm	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$ /nm Benceno ($\epsilon=2,3$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$ /nm Acetonitrilo ($\epsilon=41,1$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$ /nm Agua ($\epsilon=80,0$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$ /nm complejo
<u>1</u>	368	444	450	468	466
<u>2</u>	396	478	500	541	527
<u>3</u>	457	496	532	561	553
<u>4</u>	392	467	474	491	491
<u>5</u>	409	473	479	485	459
<u>6</u>	400	478	481	506	500
<u>7</u>	358	427	443	485	471
<u>8</u>	406	454	504	479	473
<u>9</u>	335	422	440	447	441
<u>10</u>	332	516	542	380	382

De acuerdo con lo anterior, son las oxazinonas **2** y **3** aquellas que presentan un mayor desplazamiento batocrómico. Este comportamiento, es resultado del efecto dador de electrones que poseen estos sustituyentes, los cuales promueven un proceso de transferencia de carga hacia el anillo oxazol. En concordancia con los resultados experimentales, cálculos teóricos reportados en la literatura reflejan que éstas moléculas poseen una diferencia significativa entre el momento dipolar del estado excitado con el momento dipolar del estado basal de 6,86 D para la oxazinona **2** y 10,36 D para la oxazinona **3**,⁹³ valores que indican que el estado excitado de éstas moléculas tiene un carácter más polar que el estado basal y por lo tanto el estado excitado emite a menor energía en solventes polares.

Cuando las oxazinonas **1**, **2** y **3** se encuentran en agua, presentan máximos de emisión a 468, 541 y 562 nm, respectivamente. De acuerdo con lo discutido anteriormente para el caso de benceno y acetonitrilo, el estado excitado de estas moléculas es mayormente estabilizado en solventes polares próticos como el agua (Tabla 3.1). Consecuentemente, este comportamiento en las oxazinonas **2** y **3**, se debe a que la presencia del átomo de nitrógeno (amino y N,N-dimetilamino, respectivamente), que puede formar puentes de hidrógeno con el agua, debido a la presencia de un par electrónico no compartido y por lo tanto favorece la estabilidad de estas moléculas en agua.

El espectro de emisión de las oxazinonas **1**, **2** y **3**, muestra que cuando estas moléculas son incluidas en β -ciclodextrina, presentan desplazamientos a menores longitudes de onda con máximos a 466, 527 y 553 nm, respectivamente. Este comportamiento, se debe a que la inclusión de éstas moléculas produce una menor estabilización del estado excitado, ya que el microambiente que rodea al estado excitado cambia de un medio polar, como lo es el agua, a uno apolar como lo es la cavidad de la β -ciclodextrina (Figura 3.2).

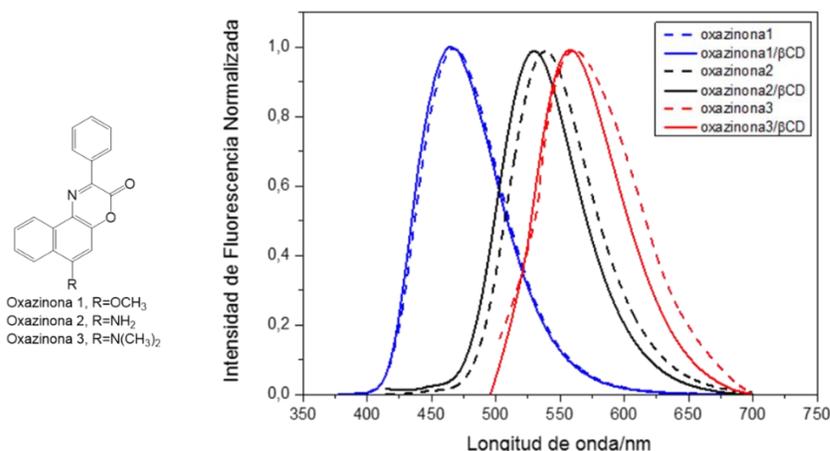


Figura 3.2. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas **1**, **2** y **3** en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).

Al revisar los máximos de emisión en agua y compararlos con los de las moléculas incluidas en β -ciclodextrina, se aprecia que las oxazinonas **1**, **2** y **3**, tienen desplazamientos hipsocrómicos de 92, 491 y 258 cm^{-1} , respectivamente, donde el desplazamiento para la oxazinona **1** es muy pequeño, no así para las oxazinonas **2** y **3** (Figura 3.2). Por lo tanto, una vez más la presencia de grupos dadores de electrones en la estructura (amino y N,N-dimetilamino), hace que estas moléculas tengan elevada sensibilidad a la polaridad del medio.

Al analizar la estructura molecular de las ariloxazinonas **4**, **5** y **6**, se observa que tienen en común un grupo fenilo en la posición 2 del anillo aromático (Figura 3.1). Además las oxazinona **5** presenta un átomo de cloro (Cl) y la oxazinona **6** un grupo metoxilo (MeO), ambos con carácter dador de electrones.

En la Tabla 3.1, se observa que estas moléculas presentan corrimientos solvatocrómicos de sus máximos de emisión hacia longitudes de onda mayores cuando se encuentran en solventes polares. Cuando las oxazinonas **4**, **5** y **6**, se solubilizan en agua, se observa que sus bandas de emisión son de baja intensidad, con máximos que se encuentran a 447 nm, 438 nm y 466 nm.

Los espectros de emisión de las oxazinonas **4**, **5** y **6**, exhiben bandas estructuradas en agua, observándose que para la oxazinona **6**, el espectro de fluorescencia muestra tres máximos (Figura 3.3), el principal a 506 nm, mientras que las oxazinonas **4** y **5** muestran bandas de emisión en que se pierde la estructura fina, con máximos a 491 y 459 nm, respectivamente.

Al comparar los máximos de emisión de las oxazinonas **4**, **5** y **6** en agua y cuando son incluidas en β -ciclodextrina, se observa que éste no cambia para la oxazinonas **4**, mientras que para las oxazinonas **5** y **6** existe un importante desplazamiento hacia longitudes de onda menores de 1168 cm^{-1} y 237 cm^{-1} respectivamente, cuando forman complejos de inclusión (Figura 3.3).

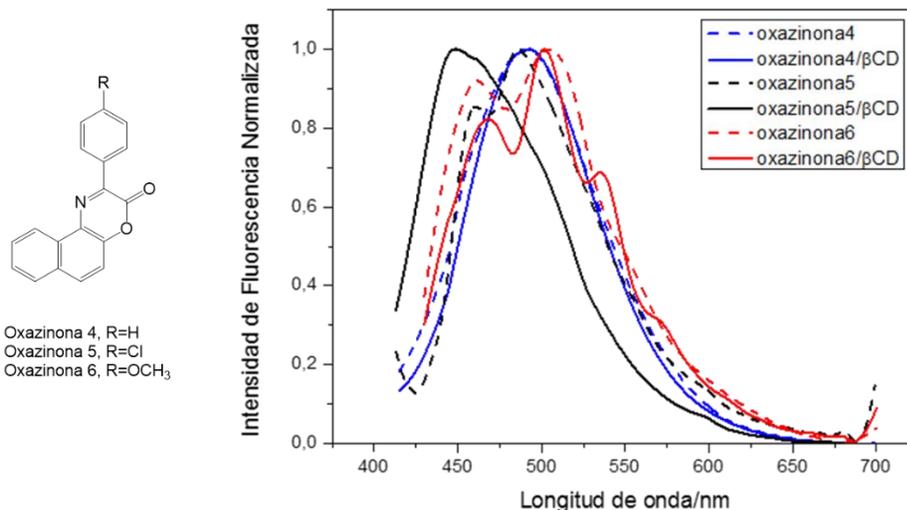


Figura 3.3. Espectros de emisión normalizada en medio acuoso para las oxazinonas **4**, **5** y **6** en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).

Este comportamiento da cuenta del proceso de inclusión de éstas moléculas. Además la presencia de las naftoxazinonas con sustituyentes dadores de electrones como el átomo de cloro y metoxilo le otorgan a las ariloxazinonas una mayor sensibilidad solvatocrómica respecto a la no sustituida.

Por otra parte, las oxazinonas **7** y **8**, tienen en común que en su estructura presentan un grupo metilo en posición 2 y la oxazinona **8** además tiene un grupo hidroxilo en la posición 9, que tiene la característica de ser dador de electrones. Cuando estas moléculas se encuentran en solventes polares (Tabla 3.1), como acetonitrilo sus máximos de emisión se encuentran a 443 nm y 504 nm (oxazinonas **7** y **8**, respectivamente). Si la polaridad del medio disminuye, los máximos de emisión son desplazados significativamente a longitudes de ondas menores, por ejemplo en benceno, estas moléculas presentan máximos de emisión a 427 nm (oxazinona **7**) y 452 nm (oxazinona **8**)

Cuando se comparan los máximos de emisión entre las oxazinonas **7** y **8** en agua e incluidas en β -ciclodextrina (Figura 3.4), se observan corrimientos hipsocrómicos del orden de 613 cm^{-1} a 265 cm^{-1} (Tabla 3.1), siendo mayores para la oxazinona **7**.

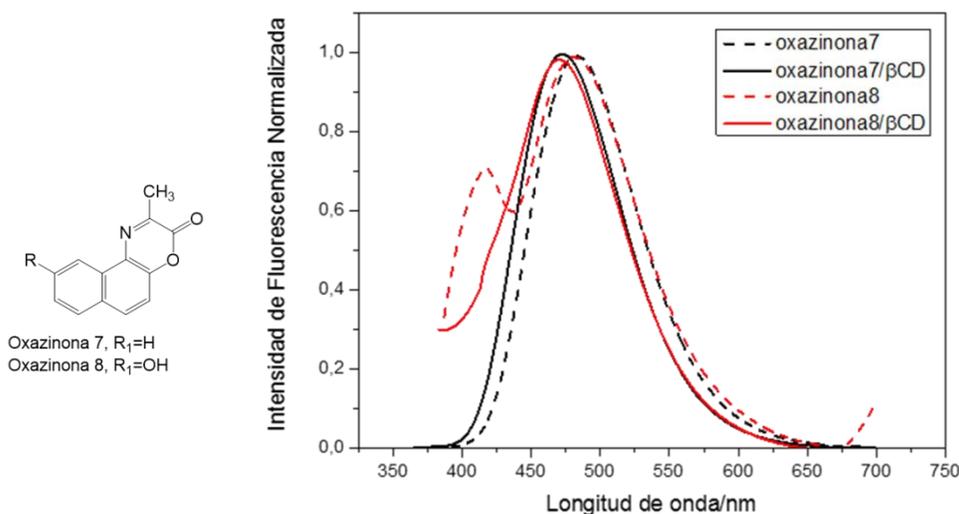


Figura 3.4. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas **7** y **8**, en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).

Las oxazinonas **4**, **9** y **10** son comparables desde el punto de vista de la geometría que tienen, las oxazinonas **4** y **10** corresponden a un naftoxazinonas angular y lineal respectivamente y la oxazinona **9** es una benzoxazinona angular. Sus espectros de emisión en agua y formando complejo de inclusión se observan en la Figura 3.5.

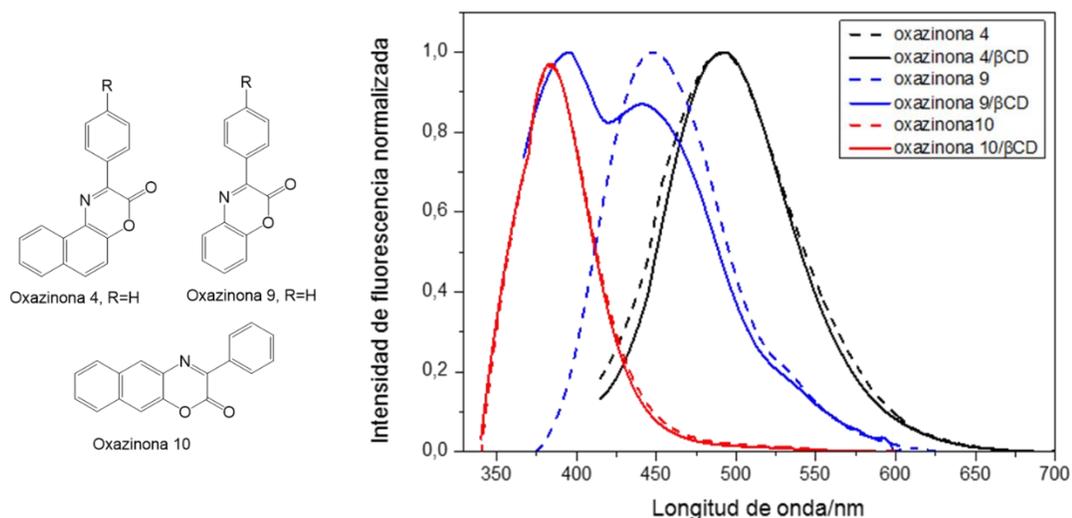


Figura 3.5. Espectros de emisión normalizada para las oxazinonas **4**, **9** y **10**, en solución acuosa (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD, (línea continua).

Al comparar los máximos de emisión de las oxazinonas **4**, **9** y **10** cuando pasan de benceno a acetonitrilo, se observan desplazamientos batocrómicos de 316, 969 y 930 cm^{-1} , respectivamente. Este comportamiento muestra que un cambio estructural importante, como pasar de una estructura angular tipo fenantreno, en la cual la condensación del anillo heterocíclico involucra a las posiciones [1,2] del anillo (oxazinona **4**), a una conformación lineal tipo antraceno, en donde están involucradas las posiciones [2,3] del anillo (oxazinona **10**), produce desplazamientos significativos en el espectro de emisión.

Esta conducta probablemente se debe al efecto de la benzoanelación, fenómeno que se relaciona con factores estructurales y energéticos que contribuyen a la aromaticidad de la molécula.^{94,96} La aromaticidad de una molécula puede determinarse empleado el modelo de oscilador armónico para la aromaticidad, el cual entrega un índice de HOMA.^{94,96} Para un compuesto aromático el HOMA es cercano a 1, mientras que para uno no aromático el HOMA es 0. Para el fenantreno se determinó que el HOMA es de 0,88 y para

antraceno 0,66 aproximadamente.^{94,95} Estos resultados concuerdan con los obtenidos por el método computacional de corrimientos químicos núcleo independientes (NICS),⁹⁶ el cual calcula el apantallamiento magnético en el centro de un anillo, en donde valores negativos indican aromaticidad y positivos antiaromaticidad, la literatura reporta que para el fenantreno tiene un NICS de -10,2 ppm y para el antraceno -8,2 ppm.⁹⁶ Conforme a estos resultados el fenantreno es más aromático que el antraceno y consecuentemente la oxazinona **10** es menos aromática, luego el estado excitado de esta molécula presenta una mayor sensibilidad a la polaridad del medio en el que se encuentra.

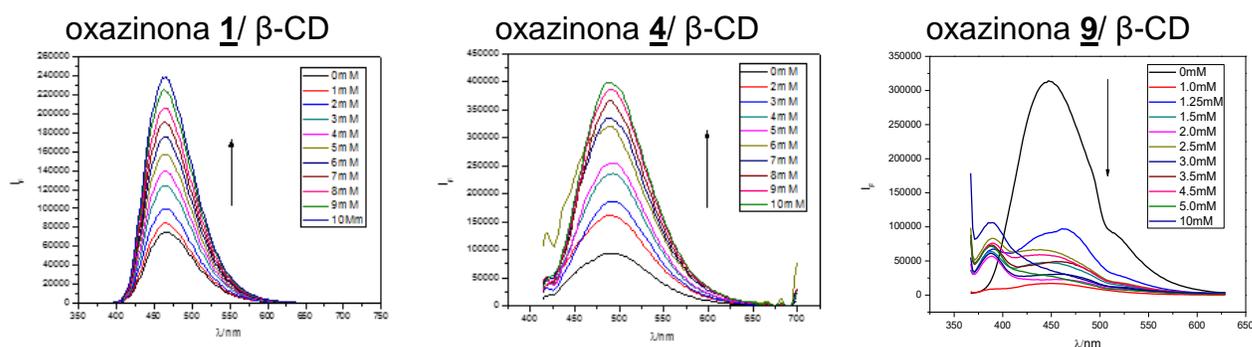
El rendimiento cuántico de fluorescencia observado para la oxazinona **10** se encuentra bajo el límite de detección, lo cual sugiere que el estado excitado de los compuestos con mayor aromaticidad decae preferentemente por fluorescencia. La literatura⁹⁷ indica que la mayor intensidad de fluorescencia se observa en compuestos aromáticos con baja energía de transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y que el rendimiento cuántico de fluorescencia aumenta a mayor conjugación de anillos. La presencia de heteroátomos como el nitrógeno, promueve la desactivación del estado excitado a través de cruce entre sistemas, que convierte al estado singulete excitado en triplete excitado. Nonell y colaboradores²⁰ determinaron que el rendimiento cuántico de generación de oxígeno molecular singulete por la oxazinona **10** es $\phi_{\Delta}=0,48$. Luego, el rendimiento cuántico de tripletes debe ser al menos igual o mayor que este valor, lo que es compatible con el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia observado.

Cuando estas moléculas pasan de agua a la cavidad de la β -ciclodextrina, los máximos de emisión de la oxazinona **9** presentan desplazamientos hipsocrómicos de 304 cm^{-1} , mientras que los máximos de emisión de las oxazinonas **4** y **10** no muestran desplazamientos significativos,

probablemente porque estas moléculas no se encuentran completamente incluidas en la β -ciclodextrina.

Modificación de la intensidad de fluorescencia los complejos de inclusión en presencia de β -ciclodextrina

En general se observa que cuando las oxazinonas de la Figura 3.1 son incluidas en β -ciclodextrina, la intensidad de fluorescencia aumenta a concentraciones crecientes de β -ciclodextrina (Figura 3.6). Este aumento de la fluorescencia, es originado por la localización en un entorno más hidrofóbico respecto al medio acuoso en el que se encuentra la molécula, efecto que da cuenta de la formación del complejo de inclusión. Estos resultados concuerdan con los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las oxazinonas 1-10, ya que para la mayoría de las moléculas tienen ϕ_F moderadamente altos, $\phi_F > 0,5$, tanto en solventes polares como apolares (Tabla AN 2.1).



*La flecha indica el aumento o disminución de la intensidad de fluorescencia, para cada complejo de inclusión.

Figura 3.6. Espectros de emisión de fluorescencia (I_F) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de β -CD, de 0-10mM para los complejos de inclusión entre las oxazinonas 1, 4 y 9 en β -CD, a temperatura 298K.

Las oxazinonas 2 y 3; muestran un significativo aumento del ϕ_F , en medios apolares, por lo que es posible inferir que al pasar de un medio polar (agua) hacia la cavidad apolar de la β -ciclodextrina, estas moléculas presentan un aumento de la fluorescencia (Figura AN 2.4). Éste comportamiento se

explica a través de la formación de un estado de transferencia intramolecular de carga, para el caso de la oxazinona **2** y un estado de transferencia de carga torcido (ETICT), para el caso de la oxazinona **3**.⁹⁸⁻¹⁰¹

El ETICT es un mecanismo que involucra un cambio de geometría del grupo N,N-dimetilamino junto con transferencia electrónica a lo largo de la conjugación aromática de la molécula. La formación de un ETICT involucra dos factores, primero que no exista impedimento estérico a la rotación de sustituyentes de la molécula y segundo que el carácter donador-aceptor, de los grupos que conforman a la molécula sea elevado. En el caso de la oxazinona **3**, sólo se cumple el segundo factor. En la Tabla AN 2.1, se observa que en la oxazinona **3** el ϕ_F disminuye en solventes polares, por ejemplo en acetonitrilo ϕ_F es 0,46, mientras que en hexano ϕ_F es 0,72 (Tabla AN 2.1). Krishnamoorthy y Dogra 1999,¹⁰² explican que la disminución del ϕ_F en solventes polares del 2-(4'-N,N-dimetilaminofenil)benzoimidazol se debería a la formación de una especie no emisiva, la cual se explica por la estabilización del zwitterion en solventes polares. Estas características sumado al importante efecto solvatocrómico que presenta ésta molécula refuerzan la idea que la oxazinona **3** presenta un ETICT que es favorecido en ambientes polares, lo cual sugiere que la energía del ETICT es menor que la del estado localmente excitado (LE). Cuando la oxazinona **3**, ingresa a la cavidad apolar de la β -ciclodextrina la libre rotación del grupo N,N-dimetilamino es significativamente limitada, provocando un aumento de la emisión de fluorescencia.

El compuesto **7**, muestra un comportamiento análogo al observado para la naftoxazinona **4**, debido a que el ϕ_F aumenta al pasar de solventes apolares a solventes polares (Tabla AN 2.1), en este caso el aumento de la emisión de fluorescencia en presencia de β -ciclodextrina, puede explicarse en función que esta molécula es poco soluble en agua y por lo tanto fue necesario utilizar metanol como co-solvente para solubilizar el compuesto y así detectar la

emisión. La presencia de este co-solvente posiblemente modifica la polaridad del interior de la ciclodextrina y ayuda a que una mayor proporción de oxazinona **7** ingrese a la cavidad de la β -ciclodextrina y sea posible detectar su emisión de fluorescencia.

Cuando la oxazinona **10** se incluye en β -ciclodextrina, se observa un aumento de la emisión de fluorescencia a medida que la concentración de β -ciclodextrina aumenta (Figura AN 2.4). Este comportamiento corrobora la formación del complejo de inclusión entre la oxazinona y β -ciclodextrina y consecuentemente las interacciones huésped/hospedero favorecen la emisión de fluorescencia del complejo de inclusión.

En el caso particular de la oxazinona **9** se observa que la intensidad de emisión disminuye a concentraciones crecientes de β -ciclodextrina (Figura 3.6). Hamai (2006)⁵⁴ describió este comportamiento en el complejo de inclusión entre la benzo[h]quinolina y la β -ciclodextrina.

3.2 Ariloxazoles

Las propiedades fotofísicas de los naftoxazoles **11** al **15** (Figura 3.7), fueron estudiadas cuando éstos se encuentran formando complejos de inclusión con β - y/o γ -ciclodextrina. Los naftoxazoles elegidos, presentan sustituyentes en la posición 2 del anillo oxazol. En la Figura 3.7, se aprecia que el naftoxazol **11**, presenta una estructura lineal respecto al resto de las moléculas, esta geometría le confiere un comportamiento fotofísico diferente al del resto de las moléculas. También los naftoxazoles **11** y **12** presentan sustituyentes, dadores de electrones, unidos directamente al anillo oxazol, mientras que los sustituyentes de los naftoxazoles del **13** al **15**, se unen mediante un puente vinílico, el cual le otorga una extensión de la aromaticidad del sistema conjugado fusionado al anillo oxazol. Es importante destacar que los naftoxazoles **12** y **13** fueron incluidos tanto en β - como en γ -ciclodextrina, con el objetivo de estudiar cómo afecta el tamaño de la cavidad tanto a las propiedades fotofísicas de la molécula como al proceso de inclusión, lo cual será discutido más adelante.

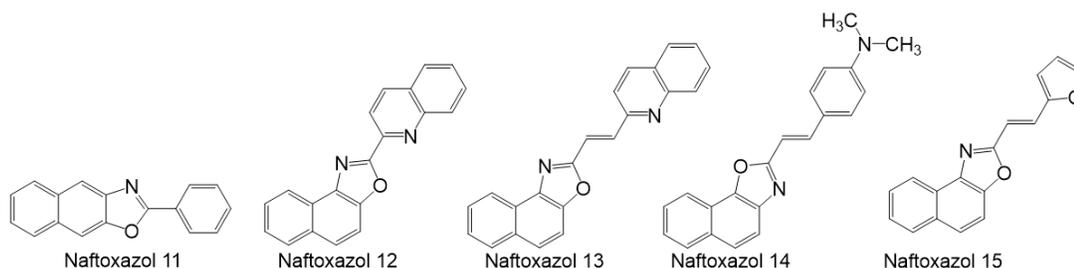


Figura 3.7. Estructura molecular de los naftoxazoles incluidos en ciclodextrina.

Los espectros de emisión de los naftoxazoles fueron medidos en solventes diferenciados por su polaridad, tales como benceno (apolar, $\epsilon=2,3$) y acetonitrilo (polar, $\epsilon=41,1$). También se obtuvo el espectro de emisión en agua para la molécula libre y para el complejo de inclusión.

Comportamiento fotofísico de las ariloxazoles en ausencia y presencia de β -ciclodextrina.

De acuerdo a los resultados expuestos en la Tabla 3.2, los naftoxazoles **11** y **12**, muestran desplazamientos batocrómicos de sus máximos de emisión cuando la polaridad del medio aumenta. Esto se observa claramente ya que en benceno ambos naftoxazoles tienen máximos de emisión a 400 nm y 410 nm, respectivamente. Cuando la polaridad del medio aumenta, por ejemplo a un solvente polar aprótico como acetonitrilo, sus máximos de emisión aumentan a 422 nm y 415 nm respectivamente. Y al pasar a agua, se observan los máximos de emisión a 442 y 452 nm.).

Tabla 3.2. Longitud de onda máxima de excitación (λ_{exc}/nm) y longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{máx}^{emis}/nm$), de los naftoxazoles **11-15** en solventes con distinta constante dieléctrica, ϵ (benceno, acetonitrilo y agua) y en β -ciclodextrina y/o γ -ciclodextrina.

NAFTOXAZOL	λ_{exc}/nm	$\lambda_{máx}^{emis}/nm$ Benceno ($\epsilon=2,3$)	$\lambda_{máx}^{emis}/nm$ Acetonitrilo ($\epsilon=41,1$)	$\lambda_{máx}^{emis}/nm$ Agua ($\epsilon=80,0$)	$\lambda_{máx}^{emis}/nm$ complejo
11-β	344	400	422	442	430
12-β	360	410	415	453	439
12-γ					477
13-β	374	450	458	507	464
13-γ					496
14-β	396	444	480	518	492
15-β	363	429	428	471	449

El efecto solvente observado, a través de los desplazamientos de los máximos de emisión de una molécula, se origina a partir de una polarización inducida producida por el solvente debido al cambio en el momento dipolar de la molécula en el estado excitado. La literatura muestra que a medida que la constante dieléctrica del solvente aumenta se observa un desplazamiento

batocrómico,⁹⁷ este comportamiento queda demostrado en los datos obtenidos para los naftoxazoles **11** y **12** (Tabla 3.2).

El principio de Franck-Condon¹⁰³ también es un aspecto importante en el estudio asociado al efecto solvente, la relación entre el soluto y el solvente en términos de orientación, momento dipolar y distribución de carga. Una diferencia en la energía de solvatación, entre el estado basal y el estado excitado de la molécula, se reflejarán en cambios en la posición de los máximos de emisión del espectro de fluorescencia. Por consiguiente, el efecto de la geometría en el comportamiento fotofísico de los naftoxazoles, se manifiesta en el mayor efecto solvente que presenta el naftoxazol **12** respecto al naftoxazol **11**. Como se explicó en la sección 3.1, para la oxazinona **10** este comportamiento también puede corresponder al efecto de la benzoanelación,⁹⁴⁻⁹⁶ en donde la aromaticidad influye en la sensibilidad de la molécula frente a la naturaleza del medio en el que se encuentra, como también a las características electrónicas del grupo sustituyente.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia para los naftoxazoles **11** y **12** en hexano, benceno, acetonitrilo y metanol se encuentran en la Tabla AN 3.1. El naftoxazol **11** tiene ϕ_F moderados y menores a 0,5, lo cual sugiere que al igual que la oxazinona **10**, tanto la baja aromaticidad del naftoxazol lineal, como la presencia de heteroátomos, disminuye la energía de las transiciones que involucran al sistema $n \rightarrow \pi^*$, lo cual probablemente favorece la desactivación del estado excitado a través de un triplete excitado.

Para el naftoxazol **11**, se estudiaron las propiedades fotofísicas cuando forma complejos de inclusión con β -ciclodextrina. Los datos de la Tabla 3.2, muestran que para esta molécula el máximo de emisión tiene desplazamientos hipsocrómicos cuando pasa de agua a β -ciclodextrina, presentando un desplazamiento hipsocrómico de 631 cm^{-1} (Figura 3.8).

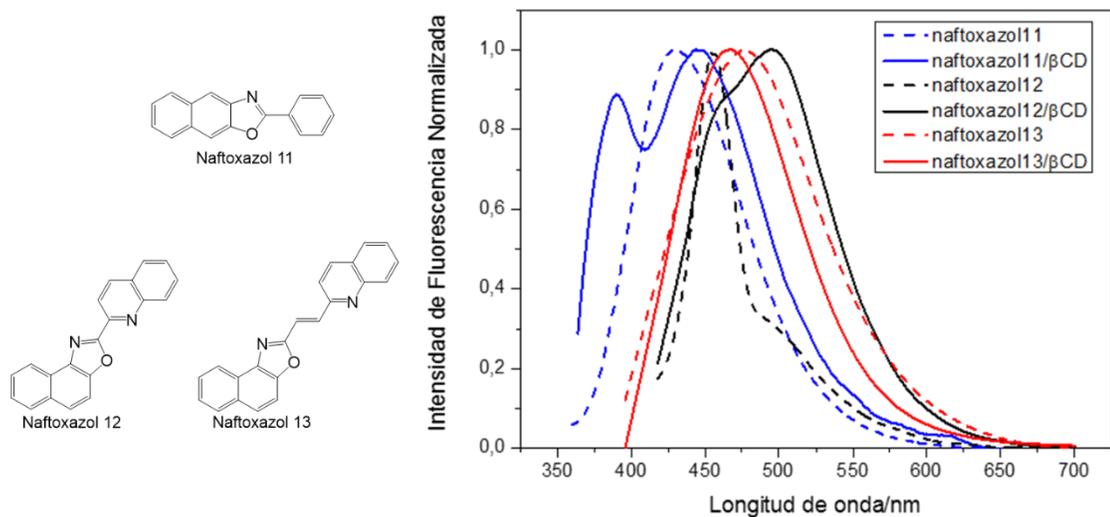


Figura 3.8. Espectros de emisión normalizada para las naftoxazoles **11**, **12** y **13**, en agua (línea punteada) e incluidos en 5 mM de β -CD, (línea continua).

La literatura ha reportado el comportamiento fotofísico del 2-metilnafto[2,3-d]oxazol (MNO),¹⁰⁰ molécula que sólo difiere del naftoxazol **11**, que en vez de tener un grupo fenilo en posición 2 del anillo, tiene un grupo metilo. Ésta molécula presenta un importante proceso de transferencia intramolecular de carga (TIC) en el estado excitado, el cual se hace más importante a pHs superiores a 3. Al observar la Figura 3.8 se ve que cuando el naftoxazol **11** forma complejos de inclusión con β -ciclodextrina, teniendo en cuenta que el pH de trabajo es 5, esta nueva banda de emisión correspondería a la formación de un estado de transferencia intramolecular de carga (TIC), la cual aparece a menor energía.

El naftoxazol **13**, es comparado con el naftoxazol **12**, debido a que ambas moléculas están sustituidas por quinolina. Los máximos de emisión en benceno y acetonitrilo muestran corrimientos batocrómicos de 294 cm^{-1} , para en el naftoxazol **12** y 388 cm^{-1} para el naftoxazol **13** (Figura 3.8). Además, estas moléculas tienen una diferencia entre el momento dipolar del estado basal y excitado de 6 D para el naftoxazol **12** y de 9,34 D el naftoxazol **13**.¹⁰⁴ Por tanto, el estado fluorescente sería un estado más polar que el estado basal, con un

mayor carácter de transferencia de carga para el naftoxazol **13**, consecuencia de la presencia del puente vinílico.

Por otra parte, en la Tabla 3.2 se observa que las posiciones de los máximos de emisión se desplazan significativamente hacia longitudes de onda menores, respecto a la molécula no incluida (Figura 3.8). Estos desplazamientos hipsocrómicos son de 704 cm^{-1} para el naftoxazol **12** y de 1828 cm^{-1} para el naftoxazol **13**, cuando pasan de agua a la cavidad de la β -ciclodextrina. En consecuencia, la presencia de un puente vinílico en la estructura también le otorga a la molécula una mayor sensibilidad al microambiente que la rodea.

Uno de los propósitos de estudiar los naftoxazoles **14** y **15**, fue observar el efecto de un sustituyente voluminoso como lo es el grupo N,N dimetilaminofenil (el cual además tiene libre rotación de enlace, en el grupo N,N dimetilamino) y uno pequeño como el furano, en las propiedades fotofísicas de los naftoxazoles cuando se incluyen en β -ciclodextrina. Por su parte los naftoxazoles **14** y **15**, al igual que el naftoxazol **13**, se encuentran unidos a través de puente vinílico con el sustituyente. Además, se observa que estas moléculas muestran una notoria dependencia de la posición de los máximos de fluorescencia con el cambio de la polaridad del solvente (Tabla 3.2).

Para el naftoxazol **14** se encontró que los espectros de emisión son intensos (Figura 3.9) y presentan desplazamientos batocrómicos significativos cuando pasan de un medio apolar a un polar. Por ejemplo, se observan desplazamientos batocrómicos de los máximos de emisión del naftoxazol **14** de 1689 cm^{-1} , cuando pasa de benceno a acetonitrilo y de 3281 cm^{-1} cuando se compara benceno con agua.

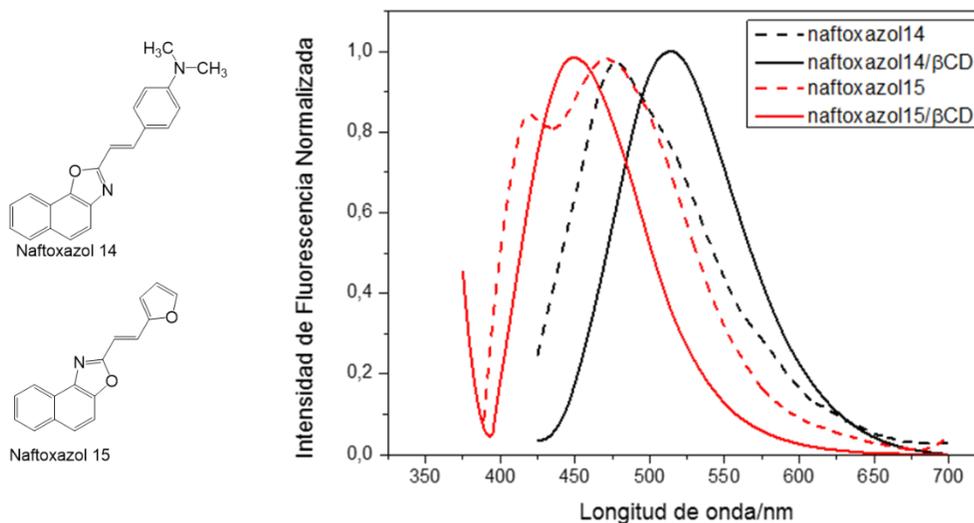


Figura 3.9. Espectros de emisión normalizada para las naftoxazoles **14** y **15**, en agua (línea punteada) e incluidas en 5 mM de β -CD (línea continua).

El momento dipolar del estado basal del naftoxazol **14**, obtenido a partir de cálculos de optimización geométrica en fase gaseosa, empleando el método de la teoría del funcional diferencial (DFT) B3LYP 6-31g++(d,p), es de 5,42 D. Para el estado excitado se encontró que el naftoxazol **14** tiene un momento dipolar (μ^*) de 10 D.¹⁰⁴ El comportamiento descrito, permite inferir que el singulete excitado del naftoxazol **14**, sería altamente polar, consecuencia de un importante proceso de transferencia parcial de carga, desde el grupo sustituyente hacia el anillo naftoxazol.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia, son menores 0,3, en la mayoría de los solventes estudiados (Tabla AN 3.1). Para el naftoxazol **14**, ϕ_F es 0,037 y 0,035 en solventes apolares como hexano y benceno y en solventes polares como acetonitrilo y metanol ϕ_F es 0,022 y 0,019, respectivamente. Este comportamiento muestra que la desactivación del estado excitado, por emisión de fluorescencia no es favorecida, lo que sumado a la diferencia existente entre los momentos dipolares ($\mu^*-\mu$), permite proponer que el bajo nivel de emisión se origina desde un estado no emisivo de transferencia intramolecular de carga torcido (ETICT), el cual se desactiva principalmente a través de un camino

no-radiativo debido a la presencia del grupo N,N-dimetilamino.¹⁰² En la literatura^{105,106} además se indica que la formación de un estado emisor ETICT es mayormente estabilizado con el aumento de la polaridad del medio. Como el momento dipolar del ETICT es elevado, las interacciones de la molécula en el ETICT serán más fuertes con solventes polares y por lo tanto sus máximos de emisión presentarán corrimientos batocrómicos mayores a los 1600 cm⁻¹.

Cuando el naftoxazol **14** forma complejos de inclusión con β -ciclodextrina, se puede apreciar, en la Tabla 3.2, que los máximos de emisión para la molécula no incluida presentan corrimientos hipsocrómicos respecto a los de la molécula incluida en la ciclodextrina (Figura 3.9). Esta situación da cuenta del microambiente apolar que rodea a las moléculas cuando éstas se encuentran en la cavidad de la β -ciclodextrina. Como el estado excitado de ésta moléculas es más polar que el estado basal, cuando el naftoxazol **14** entra a la cavidad hidrofóbica apolar de la ciclodextrina, se restringe la formación del estado excitado ETICT, por lo tanto los máximos de emisión del complejo de inclusión se desplazan a energías mayores y la emisión de fluorescencia aumenta.

En la Tabla 3.2, es posible observar que cuando el naftoxazol está sustituido por un grupo furano a través de un puente vinílico, como es el caso del naftoxazol **15**, los máximos de emisión muestran un importante efecto solvente en medios polares próticos. Por ejemplo el naftoxazol **15** tiene desplazamientos batocrómicos del máximo de emisión de 54 cm⁻¹ cuando se compara benceno con acetonitrilo y 2079 cm⁻¹ cuando pasa de benceno a agua.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia del naftoxazol **15** son 0,014 en metanol, 0,017 en acetonitrilo y 0,445 en hexano (Tabla AN 3.1). Estos resultados muestran que la emisión de fluorescencia no es favorecida en medios polares, pero en solventes apolares se observa un aumento significativo de ésta. La diferencia del momento dipolar entre el estado basal y excitado (μ^* -

μ) del naftoxazol **15** es de 5,32 D.¹⁰⁴ Como se discutió anteriormente la dependencia de la posición de los máximos de fluorescencia con el cambio en la polaridad del solvente, en general no es significativo. Pero en el caso del naftoxazol **15**, cuando se pasa de benceno a agua, se demuestra que para este compuesto, el estado fluorescente sería un estado levemente más polar que el estado basal, con un débil carácter de transferencia intramolecular de carga.

De acuerdo a los datos de la Tabla 3.2, se observa que el máximo de emisión del naftoxazol **15** en agua, se encuentra a 471nm y cuando forma complejos de inclusión con β -ciclodextrina, el máximo de emisión presenta desplazamientos hipsocrómicos de 1040 cm^{-1} , Figura 3.15. Esta conducta da cuenta del carácter apolar de la cavidad de la β -ciclodextrina, debido a que las moléculas de agua estabilizan de mayor manera el estado excitado de ésta molécula, el cual como se vio anteriormente es levemente polar. Consecuentemente, el interior apolar e hidrofóbico de la β -ciclodextrina, no es capaz de estabilizar al estado excitado y el máximo de emisión se traslada a mayor energía.

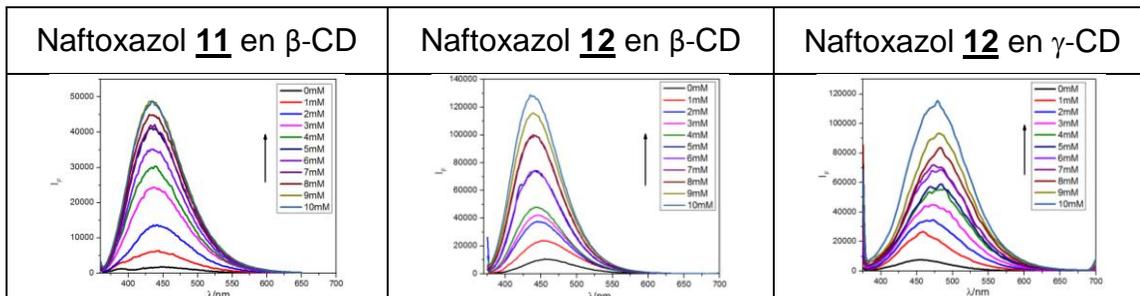
Comportamiento fotofísico de los ariloxazoles en ausencia y presencia de γ -ciclodextrina

Se ha observado experimentalmente que los naftoxazoles **12** y **13** son moléculas que emiten luz blanca en mezclas de solventes polares próticos y apolares apróticos, lo que será discutido en el capítulo 5. Con el propósito de estudiar aplicaciones de éstas moléculas relacionadas con la emisión de luz blanca en fase sólida, es importante analizar los cambios en las propiedades fotofísicas de los naftoxazoles **12** y **13**, cuando se encuentran encapsuladas en un ambiente apolar de mayor volumen. Para ello se eligió γ -ciclodextrina ya que tienen un volumen mayor que la β -ciclodextrina (β -ciclodextrina, 262 \AA^3 y γ -ciclodextrina 427 \AA^3).¹⁰⁷

En la Tabla 3.2 se observa, que cuando estas moléculas son incluidas en γ -ciclodextrina, presentan desplazamientos hipsocrómicos menores, que cuando son incluidas en β -ciclodextrina, lo cual permite inferir que la cavidad de la β -ciclodextrina es levemente más apolar que el interior de la γ -ciclodextrina. Niya A. y Schwarz,¹⁰⁸ postulan que la diferencia en el comportamiento observado para una misma molécula huésped incluida en β - o γ - ciclodextrina, se debe principalmente a la reorganización de las moléculas de agua que se encuentran en la cavidad de la respectiva ciclodextrina. Consecuentemente debido al mayor tamaño de la cavidad de la γ -ciclodextrina, es posible que retenga moléculas de agua luego de la inclusión de la molécula huésped, lo cual causaría un cambio en la polaridad de la cavidad, que se traduce en un menor desplazamiento hipsocrómico de los máximos de emisión.

Modificación de la intensidad de fluorescencia los complejos de inclusión en presencia de β - y/o γ -ciclodextrina

Se observa que todos los naftoxazoles **11** al **15** forman complejos de inclusión, se observa que aumenta la intensidad de emisión de fluorescencia cuando la concentración de β - y/o γ -ciclodextrina aumenta (Figura 3.10). Cuando los naftoxazoles **11**, **12** y **13** forman complejos de inclusión con β -ciclodextrina y los naftoxazoles **12** y **13** con γ -ciclodextrina, se observó un aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia a concentraciones crecientes de β - y/o γ -ciclodextrina (Figura AN 3.3). Este aumento en la intensidad de fluorescencia, da cuenta de la formación de un complejo de inclusión y concuerda con los datos de rendimientos cuánticos de fluorescencia encontrados, ϕ_F altos y cercanos a la unidad, en solventes apolares apróticos, como hexano y benceno, mientras que en solventes polares como acetonitrilo y metanol, los ϕ_F disminuyen a 0,7 (Tabla AN 3.1).



*La flecha indica el aumento de la intensidad de fluorescencia, para cada complejo de inclusión.

Figura 3.10. Espectros de emisión de fluorescencia (I_F) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de ciclodextrina, de 0 a 10 mM para los complejos de inclusión entre los naftoxazoles **11** y **12** en β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, según corresponda, a temperatura 298K.

Este mismo comportamiento se encontró para los naftoxazoles **14** y **15**, que tienen bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia en solventes polares y apolares, sin embargo en hexano presentan valores mayores que en acetonitrilo y metanol (Tabla AN 3.1).

CAPÍTULO 4:

Caracterización termodinámica de los complejos de inclusión y comparación entre los resultados experimentales con estudios teórico-computacionales

4.1 Ariloxazinonas

Constante de inclusión

Las ariloxazinonas son compuestos poco polares y tienen baja solubilidad en agua. Con el propósito de incrementar la solubilidad en este medio, fueron incluidas en β -ciclodextrina. Se estudió el efecto que produce el aumento de la concentración de β -ciclodextrina sobre las ariloxazinonas empleando espectroscopia de fluorescencia.

Como se discutió en el capítulo anterior, en general las benzoxazinonas y naftoxazinonas presentan un aumento de la emisión de fluorescencia a medida que la concentración de β -ciclodextrina aumenta. Este comportamiento espectroscópico, permite caracterizar termodinámica y fisicoquímicamente el proceso de formación de los complejos de inclusión, entre las ariloxazinonas y la β -ciclodextrina.

Los parámetros termodinámicos, entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) son los que determinan si la formación del complejo inclusión, está controlada por interacciones entre las ariloxazinonas y la β -ciclodextrina o por el efecto hidrofóbico resultante de la inclusión de la molécula huésped en la molécula anfitrión. La energía libre de Gibbs (ΔG°), es el parámetro termodinámico que da cuenta de la espontaneidad del proceso de inclusión y junto con la constante de inclusión, permiten validar si el equilibrio es termodinámicamente favorecido hacia la formación de complejos de inclusión.

Para obtener la constante de inclusión se aplicaron dos métodos, debido a que algunas moléculas presentaron problemas experimentales, como baja intensidad de emisión de fluorescencia y problemas en la concentración adecuada de trabajo.

La primera metodología corresponde al método de Benessi-Hildebrand (Figura 4.1). Para la mayoría de las oxazinonas se encontró una correlación lineal entre el inverso de la concentración de β -ciclodextrina y la diferencia entre la intensidad de fluorescencia de la molécula huésped, en ausencia y presencia de β -ciclodextrina. La segunda metodología corresponde al método de solubilidad de fases, el cual sólo fue aplicado en las oxazinonas 4 y 5 (Figura 4.1). Ambas, metodologías presentaron, para todo el rango de temperaturas (298, 303, 308, 313 y 318 K), un comportamiento lineal, para complejos de inclusión con estequiometría 1:1 (Figura AN 2.2 y AN 2.3)

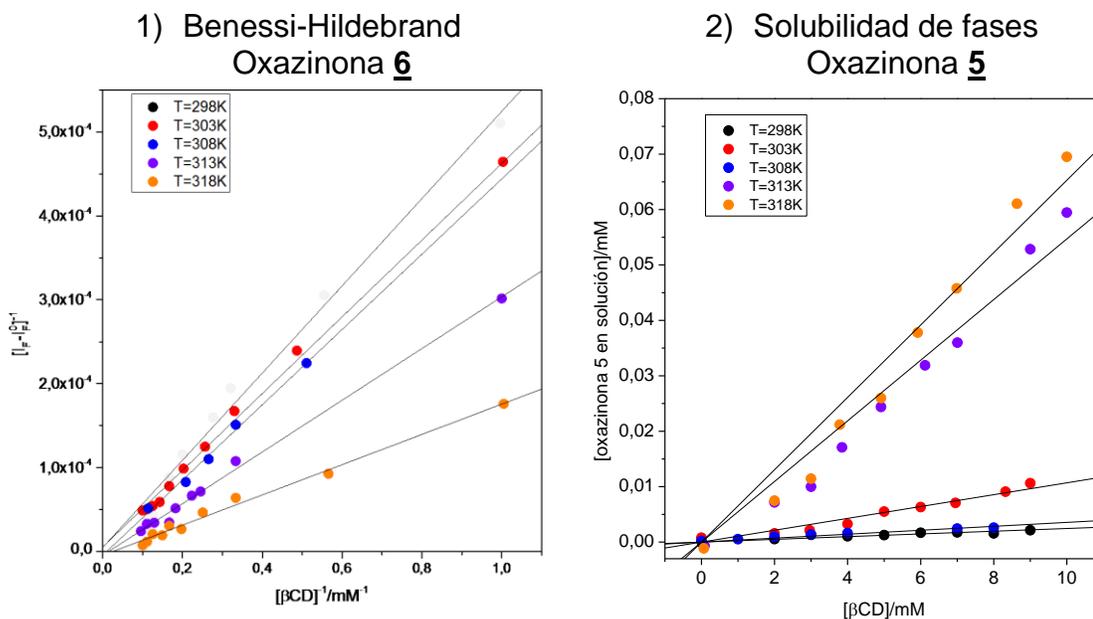


Figura 4.1. 1) Gráfico de $1/[\beta\text{-CD}]$ versus $1/[I_F - I_F^0]$, para el complejo de inclusión entre la oxazinona 6 y β -CD, con estequiometría 1:1. 2) Gráfico de $[\beta\text{-CD}]$ versus $[\text{oxazinona 5 en solución}]$, para el complejo de inclusión formado entre la oxazinona 5 y β -CD, con estequiometría 1:1.

Las constantes de inclusión obtenidas por Benessi-Hildebrand o solubilidad de fases, se muestran en la Tabla 4.1. Se encontró que los valores de las constantes de inclusión, entre oxazinonas y β -ciclodextrina, son similares entre sí y se encuentran en el orden de magnitud de 10^2 - 10^3 . Estas constantes de inclusión concuerdan con los resultados reportados en la literatura para las cumarinas, compuestos análogos desde el punto de vista de su comportamiento fotofísico en complejos de inclusión, a las ariloxazinonas.^{47, 109}

Tabla 4.1. Constantes de inclusión (K) y parámetros termodinámicos en condiciones estándar, para las oxazinonas **1** a la **10** incluidas en β -ciclodextrina.

oxazinona	K (M ⁻¹)	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	ΔH° (kcal·mol ⁻¹)	ΔS° (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T· ΔS° (kcal·mol ⁻¹)
1	58±0,4	-2,4±0,3	56,3±1,7	197±5,3	58,7±1,6
2	486±0,5	-3,7±0,8	-23,6±0,7	-66,9±2,1	-19,9±0,6
3	604±0,4	-3,7±0,7	11,1±3,2	50,0±9,7	14,9±3,0
4	515±0,4	-3,7±0,8	7,9±3,4	39,0±1,0	11,6±0,3
5	238±6,2	-3,4±1,2	38,4±5,1	140±1,5	40,8±0,4
6	36±5,7	-2,8±1,3	19,0±5,4	73,1±1,6	21,8±0,5
7	220±0,4	-3,2±1,0	27,2±4,2	102±1,3	30,4±0,4
8	46±0,5	-1,5±0,3	30,1±1,1	106±3,3	31,6±1,0
9	279±0,5	-3,3±0,4	-4,9±1,5	-5,5±0,4	-1,6±0,1
10	107±0,4	-2,8±0,6	-4,8±2,5	-6,9±0,6	-2,1±2,0

La Figura 4.2 muestra que para la familia de las ariloxazinonas las constantes de inclusión, se favorece el equilibrio hacia la formación de complejos de inclusión. De estos datos se desprende que las oxazinonas

sustituidas en posición 6, por grupos dadores de electrones aquellas que presentan mayor afinidad por la cavidad de la β -ciclodextrina, como ocurre en el caso de las oxazinonas 2, 3.

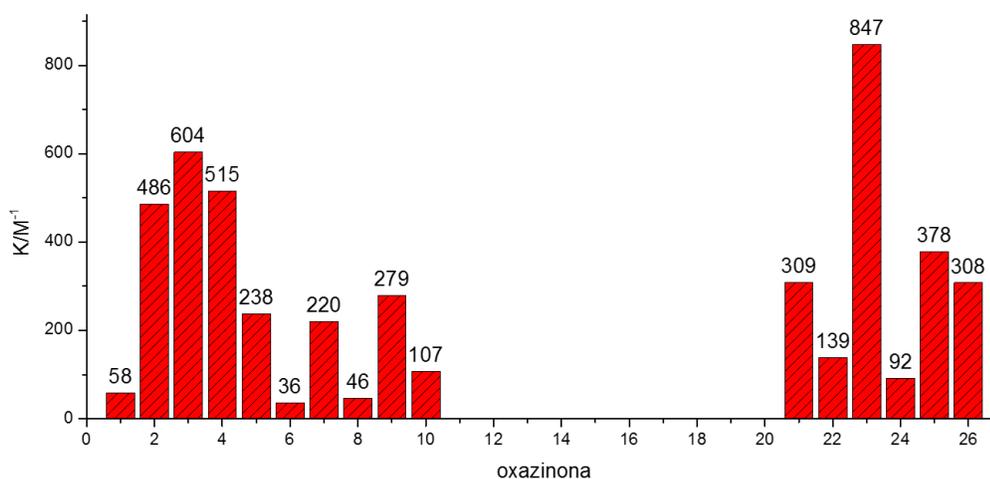


Figura 4.2. Representación gráfica de la constante de inclusión, K/M^{-1} , para las oxazinonas 1 a la 10 y 21 a la 26, incluidas en β -ciclodextrina.

Al comparar los valores de las constantes de inclusión en la Tabla 4.1 para las naftoxazinonas 4, 5 y 6, se observa la constante de inclusión disminuye cuando se incorporan sustituyentes cloro o metoxilo a la estructura de las oxazinonas. La presencia de estos grupos en la molécula cambia la polaridad de esta, debido a que son electrónicamente diferentes, encontrándose que el sustituyente metoxilo aumenta la polaridad de la molécula, respecto a la no sustituida (oxazinona 4) y sustituida por cloro (oxazinona 5). El cambio de polaridad de las moléculas sería el responsable que estos compuestos presenten una menor afinidad por la cavidad de la β -ciclodextrina.

Considerando que la presencia de sustituyentes cambia la polaridad de la molécula y por lo tanto esto afecta a la afinidad de éstas por la β -ciclodextrina, al comparar la oxazinona 1, la cual también está sustituida por un metoxilo, en posición 6, con la oxazinona 6, se observa que su constante de

inclusión es pequeña y del mismo orden de magnitud que moléculas análogas (oxazinona **1**: 58 M^{-1} y oxazinona **6**: 36 M^{-1}).

Cuando se analizan las oxazinonas **7** y **8**, se aprecia que la constante de inclusión disminuye al poseer en su estructura un grupo de menor volumen, cuando este se ubica en posición 9 respecto del heterociclo. Por ejemplo las constantes de inclusión de oxazinona **7** es $K_{1:1}=220\pm 0,4 \text{ M}^{-1}$ y para la oxazinona **8** es $K_{1:1}=46\pm 0,4 \text{ M}^{-1}$. Además es posible notar que la presencia de sustituyentes en esa posición no ayuda a aumentar la afinidad de la oxazinona por la β -ciclodextrina.

Por su parte, la forma lineal de la oxazinona **10** le otorga una constante de inclusión de 107 M^{-1} , valor que es menor al de sus análogos angulares, como la naftoxazinona (oxazinona **4** $K_{1:1}=505 \text{ M}^{-1}$) y la benzoxazinona (oxazinona **9** $K_{1:1}=279 \text{ M}^{-1}$). Por lo tanto, el cambio en la geometría de la molécula, de angular a lineal, disminuye la afinidad de la oxazinona por la β -ciclodextrina y consecuentemente el proceso de formación de complejos de inclusión es desfavorecido levemente.

Los resultados experimentales de todas las moléculas estudiadas, muestran que las constantes de inclusión tienen valores en el rango de 40 a 600 M^{-1} , lo cual indica que el equilibrio está desplazado hacia la formación de complejos de inclusión, siendo las oxazinonas **3**, **7** y **9**, las que presentan constantes de inclusión más altas. Si bien las oxazinonas **1**, **6** y **8**, tienen constantes de inclusión pequeñas (Tabla 4.1), es importante señalar que los resultados de dinámica molecular, muestran que el parámetro de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas) promedio de las oxazinonas estudiadas, se encuentra entre los 1 y 3 \AA (Tabla AN 2.8). Este resultado indica que las oxazinonas se encuentran durante toda la dinámica dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina y que no existe inversión de la

orientación de la molécula durante el tiempo de simulación o bien desestabilización del complejo de inclusión (Figura AN 2.7).

Parámetros Termodinámicos

Como se señaló anteriormente, la formación de complejos de inclusión esta modulada por las interacciones que preferentemente estabilizan los complejos de inclusión. Estas interacciones en general son: fuerzas de van de Waals, puentes de hidrógeno de la molécula con los hidroxilos de la β -ciclodextrina, efecto hidrofóbico, cambios conformacionales (AN 1.1).

Los valores de ΔG° negativos indican que el proceso de formación del complejo de inclusión es favorecido termodinámicamente, como se encontró para todos los derivados de las oxazinonas estudiadas. Además se observa, en la Tabla 4.1, que todas las oxazinonas presentan valores de energía libre entre -1,0 y -4,0 kcal/mol. Siendo las oxazinonas **4**, **5** y **6** ($\Delta G^\circ = -3,7$, $-3,7$ y $-3,9$ kcal/mol, respectivamente) las más favorecidas termodinámicamente para formar complejos de inclusión con β -ciclodextrina, mientras que es la oxazinona **8** menos favorecida ($\Delta G^\circ = -1,5$ kcal/mol).

En la Figura 4.3, se observa en las oxazinonas, que la inclusión en β -ciclodextrina es controlada por la entalpía, para aquellas moléculas que se encuentran sustituidas por grupos dadores de electrones en posición 6 del anillo naftoxazol, con excepción de la oxazinona **2**. Los resultados experimentales muestran que aquellas oxazinonas que tienen sustituyentes en posición 9 del anillo naftoxazol, tienen estructura lineal, como la oxazinona **15** o son oxazinonas inversas, como las oxazinonas **25** y **26**, el control del proceso de inclusión es entrópico, debido a que tanto los valores de ΔH° como $T\Delta S^\circ$ son negativos.

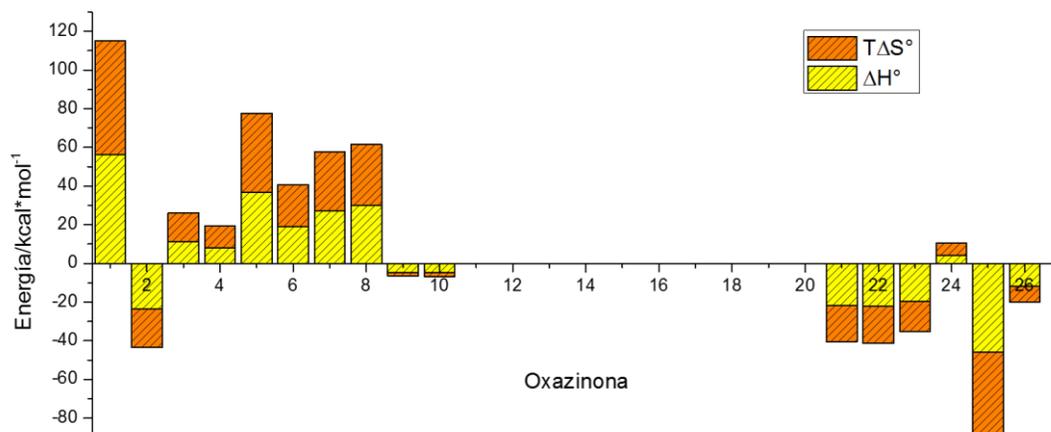


Figura 4.3. Representación gráfica de la entalpía (ΔH° /kcal/mol) y factor entrópico ($T\Delta S^\circ$ /kcal/mol), para las oxazinonas 1 a la 10 y 21 a la 26, incluidas en β -ciclodextrina.

Cuando la estabilidad del complejo de inclusión está controlada por la entalpía, se relaciona con un aporte importante de las interacciones de puentes de hidrógeno o de van der Waals, en cambio, cuando el control es entrópico el efecto hidrofóbico es el que juega un rol esencial en la formación del complejo de inclusión.¹¹⁰⁻¹¹² Por lo tanto, desde el punto de vista de las interacciones que contribuyen a la estabilización, los complejos de inclusión 1:1, para las ariloxazinonas en β -ciclodextrina, fueron clasificados en dos grupos.

Grupo I:

En este grupo se encuentran las oxazinonas 2, 9 y 10. Se observa, que estas moléculas disminuyen su constante de inclusión, cuando la temperatura del proceso aumenta. Por lo tanto es posible deducir que a altas temperaturas el complejo de inclusión se disocia; sin embargo, los argumentos desde el punto de vista molecular que explican este comportamiento, aún no ha sido claramente establecidos,¹¹³ pero considerando que altas temperaturas aumenta la energía cinética y que las interacciones del tipo puentes de hidrógeno y electrostáticas se hacen más débiles, es razonable esperar una disminución de la constante de inclusión.

Además, las entalpías y entropías de formación del complejo de inclusión obtenidas aplicando la ecuación de van't Hoff, son negativas ($\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$). A partir de estos resultados se deduce que el proceso de inclusión es exotérmico y entálpicamente dirigido, consecuentemente las interacciones electrostáticas y tipo puentes de hidrógeno, son las que principalmente contribuyen a la estabilización del complejo de inclusión.

Dentro de las interacciones que juegan un papel importante en el control entálpico, se incluye la formación de puentes de hidrógeno, que corresponden a interacciones direccionales que involucran a un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo. Para el sistema en estudio, corresponde a la interacción entre la oxazinona y los grupos hidroxilos (primarios o secundarios) de la β -ciclodextrina. El complejo de inclusión que presenta un valor de entalpía de formación más exotérmica, Tabla 4.1, es la oxazinona **2** ($\Delta H^\circ = -23,6$ kcal/mol) la que tiene una mayor probabilidad de formar enlace tipo puente de hidrógeno con la β -ciclodextrina, debido a que la presencia del grupo amino.

Las conformaciones que adopta el complejo de inclusión obtenidas por *docking*, muestran que la oxazinona **2**, se orienta hacia la cavidad de mayor radio (Figura AN 2.6). Esta orientación permite que los átomos de hidrógeno del grupo amino se encuentren a una distancia menor de 2,6 Å, por lo tanto tienen una elevada probabilidad de formar interacciones tipo puente de hidrógeno con los átomos de oxígeno del hidroxilo primario de la β -ciclodextrina. La identificación de esta interacción corrobora la importancia energéticamente favorable, del puente de hidrógeno en la estabilización del complejo de inclusión.

Las interacciones de van de Waals, también aportan al control entálpico del proceso de inclusión, se conforman por interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y de dispersión de London. Considerando que la β -ciclodextrina

posee dipolos y que las oxazinonas **2**, **9** y **10** presentan sustituyentes y átomos con distinta naturaleza electrónica, es probable que las interacciones de van der Waals también favorezcan el control entálpico en estos casos.

Como el parámetro ΔS° es negativo, el cambio entrópico del sistema no es significativo en la estabilización del complejo de inclusión. Este fenómeno se explica considerando que la inclusión de las oxazinonas en β -ciclodextrina, produce una reorganización y desolvatación asociada con la formación del complejo de inclusión, debido a que las moléculas de agua que se encuentran dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina, son expulsadas para que ingrese la oxazinona. Por lo tanto, el cambio de entropía observado puede ser originado por la ganancia entrópica, derivada a partir de la reorganización de las moléculas de agua que originalmente solvatan a la molécula anfitrión, junto con la pérdida entrópica del ligando, la cual se relaciona con la disminución de los grados de libertad después del proceso de complejación. Como estos efectos, son opuestos la variación de entropía es negativa (Tabla 4.1) y por lo tanto no es un aporte significativo a la estabilización del complejo de inclusión.

Por su parte, los resultados de *docking*, muestran que la oxazinona **9**, se orienta preferentemente hacia la cavidad de menor radio, mientras que la oxazinona lineal **10**, se orienta hacia la cavidad de mayor radio. Estas orientaciones permiten que las interacciones hidrofóbicas de van der Waals sean favorecidas (Figura AN 2.6).

Grupo II:

En este grupo se encuentran las oxazinonas **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** y **8**, las cuales presentan valores positivos de la entalpía ($\Delta H^\circ > 0$) y entropía ($\Delta S^\circ > 0$), descritos en la Tabla 4.1. Consecuentemente el proceso de inclusión es controlado entrópicamente, lo que indica la importancia del efecto hidrofóbico en la estabilización del complejo de inclusión. Además se observa en la Tabla AN 4.1, que la constante de inclusión aumenta a temperaturas altas y junto con

los valores de entalpías de formación positivas, se concluye que la formación del complejo de inclusión es endotérmica ($\Delta H^\circ > 0$) y por lo tanto el aumento en la temperatura favorece el proceso de complejación.

Para comprender el proceso termodinámico controlado entrópicamente, es importante definir los factores que aportan positivamente al efecto hidrofóbico. Éstos involucran la deshidratación de la β -ciclodextrina, la cual corresponde a la liberación de las moléculas de agua desde la cavidad hacia el solvente, junto con la desolvatación de la molécula huésped, lo que conlleva al rompimiento de su esfera de solvatación y finalmente la formación del complejo de inclusión. Es importante definir que cuando el efecto hidrofóbico es el que controla el proceso, se observan aportes energéticos del factor entrópico de 10 a 58 kcal/mol.

Entre las moléculas que han sido clasificadas en este grupo, se encuentran aquellas que presentan sustituyentes como, metilo (oxazinona **8**), metoxilo (oxazinona **1** y **6**), N,N-dimetilamino (oxazinona **3**) y cloro (oxazinona **5**), en distintas posiciones. La presencia de estos sustituyentes favorece el efecto hidrofóbico, ya que el factor entrópico aumenta su valor entre 20 y 60 kcal/mol.

Las oxazinonas **1** y **6**, corresponden a fenilnaftoxazinonas sustituidas por un grupo metoxilo en distintas posiciones del anillo; éstas moléculas tienen una constante de inclusión de 58 y 36 M^{-1} , además el factor entrópico, $T\Delta S$, es de 59 y 22 kcal/mol respectivamente, por lo tanto el factor entrópico es incrementado cuando el grupo metoxilo se encuentra en posición 6 del anillo naftoxazinona.

Los modelos obtenidos por *docking*, muestran que las oxazinonas **1** y **6** se orientan hacia la cavidad de menor radio, acomodando el grupo metoxilo cerca de los grupos hidroxilos primarios de la β -ciclodextrina (Figura AN 2.6). Sin embargo, tanto en la oxazinona **1** como en la oxazinona **6**, los resultados de

docking y dinámica molecular muestran la formación de puentes de hidrógeno, entre el sustituyente y los hidroxilos primarios de la β -ciclodextrina, lo cual concuerda con los resultados experimentales observados, ya que para éstas moléculas la formación del complejo de inclusión tiene un control entrópico, por lo tanto no son las interacciones ciclodextrina/oxazinona las que juegan un rol importante sino el efecto hidrofóbico que se presenta con estas moléculas.

Sin embargo existen contradicciones en el comportamiento observado, por ejemplo en este grupo se encuentra la oxazinona **8**, la cual está sustituida por un grupo hidroxilo, lo que le confiere una mayor polaridad que sus pares y además la posibilidad de formar interacciones de puente de hidrógeno con los hidroxilos de la ciclodextrina. Los resultados de modelamiento molecular por *docking*, muestran que la oxazinona **8**, forma un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo en posición 9 respecto al anillo naftoxazinona y los hidroxilos primarios de la β -ciclodextrina. Esta interacción tiene un carácter débil de acuerdo con los experimentos de dinámica molecular, debido a que sólo se observa durante los primeros 3,6 ns, de la dinámica molecular (Figura AN 2.7).

La oxazinona **4**, corresponde a una fenilnaftoxazinona no sustituida y cuando forma complejos de inclusión con β -ciclodextrina, el proceso es controlado entrópicamente. Este comportamiento es contrario a los resultados que tienen sus pares estructurales, las oxazinonas **9** y **10**, las cuales presentan control entálpico. Esta ganancia entrópica puede estar relacionada con un impedimento estérico a la formación del complejo de inclusión, lo cual causa restricciones en los grados de libertad relativos al movimiento de la molécula, cuando se encuentra dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina y por lo tanto interacciones de tipo hidrofóbicas de corto alcance serán favorecidas, o bien por el carácter poco polar del huésped, se genere una esfera de solvatación importante desde el punto de vista energético.

La oxazinona **3** (fenilnaftoxazinona), sustituida por un grupo N,N-dimetilamino, tiene una constante de inclusión de 604 M^{-1} y un aporte entrópico de $14,9 \text{ kcal/mol}$. Este comportamiento, se explica considerando el tamaño del sustituyente, lo cual proporciona a la molécula una mayor superficie de solvatación que involucra más moléculas de agua, lo que se traduce en un mayor efecto hidrofóbico cuando se forma el complejo de inclusión. Al igual que en la situación anterior, los resultados de modelamiento molecular (*docking* y dinámica molecular), no muestran interacciones importantes (Figuras AN 2.6 y AN 2.7).

Análisis Termodinámico por MM/PBSA y MM/GBSA

En la actualidad se pueden realizar cálculos teóricos que describen el comportamiento experimental con diversos niveles de aproximación. Entre éstos, se encuentran los métodos de mecánica molecular de área de superficie Poisson-Boltzmann (MM/PBSA) y de mecánica molecular de área de superficie generalizada de Born (MM/GBSA). Estos métodos, combinan cálculos de mecánica molecular con modelos de solvatación continua y utilizan las trayectorias obtenidas a partir de cálculos de dinámica molecular para determinar la afinidad de una molécula por otra y además permiten refinar los modelos obtenidos por *docking*.^{113,114}

En las Tablas AN 2.9 y AN 2.10, se incluyen los resultados obtenidos para los estudios de descomposición energética a partir de trayectorias moleculares empleando los métodos de MM/PBSA y MM/GBSA, para la inclusión de las ariloxazinonas en β -ciclodextrina. Los resultados muestran que, independientemente de la metodología utilizada, la energía de interacción de van der Waals (VDW) es negativa y se encuentra en el rango entre -30 y -10 kcal/mol . Las oxazinonas **4**, **5** y **6**, son las que presentan valores de energía de interacción de VDW más negativos, consecuentemente la presencia de

sustituyentes dadores de electrones en la posición 2 del anillo oxazinona, aporta a la estabilidad del complejo de inclusión.

Por otra parte, también se determinaron valores negativos de energía de interacción electrostática (EEL). Aunque las EEL son menores que las energías de VDW, aportan a la estabilidad del complejo de inclusión y se encuentran en el rango entre -5 y -17 kcal/mol. Siendo las oxazinonas **2**, **3** y **8** las moléculas que tienen mayor energía EEL, por lo tanto la presencia de grupos amino, N,N-dimetilamino e hidroxilo, favorece la estabilización del complejo de inclusión.

Las energías libres calculadas (ΔG_{total}) por el método de MM/GBSA, predicen que las oxazinonas **3**, **5** y **6**, son las que presentan una mayor afinidad por la cavidad de la β -ciclodextrina, mientras que los resultados obtenidos usando el método de MM/PBSA, indican que las oxazinonas **3**, **5**, **8** y **10** son más afines por la β -ciclodextrina. Ambos métodos coinciden en que las oxazinonas **3** y **5** son mejores moléculas huésped para la β -ciclodextrina. Sin embargo, se debe considerar que estas metodologías, utilizan distintos modelos de solvatación y consideran parámetros diferentes, por ejemplo el cálculo de MM/GBSA no incorpora las energías de solvatación apolar y de dispersión. Experimentalmente, se encontró que las oxazinonas **2**, **3** y **4** tienen una mayor constante de inclusión en β -ciclodextrina. Luego, al comparar los datos experimentales de la Tabla 4.1, con los valores de ΔG_{total} obtenidos de los cálculos (Tabla AN 2.9 y AN 2.10), se encuentra que ambos métodos coinciden con los resultados experimentales en que es la oxazinona **3** quien tiene una mayor afinidad por la β -ciclodextrina.

4.2 Ariloxazoles

Constante de inclusión

De forma similar a los experimentos realizados con las oxazinonas, para estudiar y comprender el proceso de formación de complejos de inclusión, desde el punto de vista de su estabilidad energética y de las fuerzas responsables de su formación, se realizó un estudio termodinámico utilizando el método de solubilidad de fases para determinar la constante de inclusión del proceso (K) a distintas temperaturas (Figura 4.4). También, en la Tabla AN 3.4, se encuentran las constantes de inclusión a distintas temperaturas. Se observa que todas las moléculas estudiadas aumentan la constantes de inclusión con el aumento de la temperatura, consecuentemente el proceso de inclusión es favorecido a temperaturas altas (Tabla 3.4).

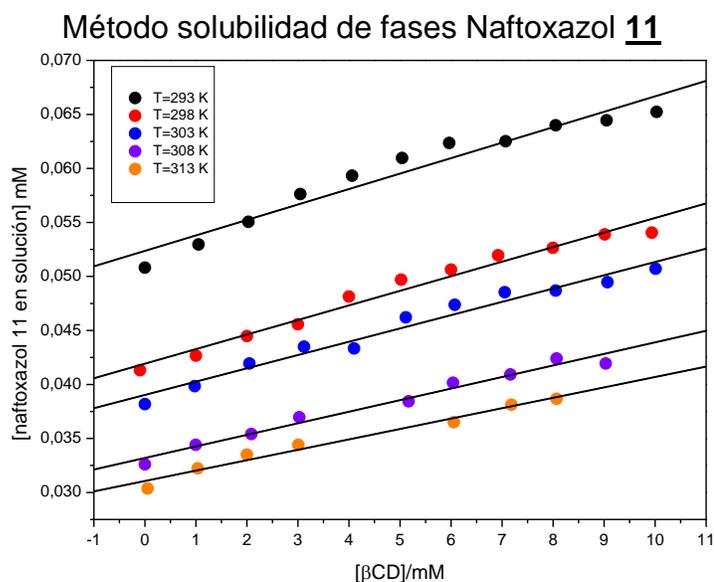


Figura 4.4. Gráfico de $[\beta\text{-CD}]$ versus $[\text{naftoxazol en solución}]$, para el complejo de inclusión formado entre la naftoxazol **11** y β -ciclodextrina, con estequiometría 1:1.

En la tabla AN 3.4, se incluyen los valores de las constantes de inclusión a distintas temperaturas (de 293 a 313 K), calculadas de los parámetros de la ecuación de correlación. Además, se encuentra que la ecuación de correlación es

compatible con una estequiometría 1:1 de los complejos, independiente de si la inclusión se realiza en β - y/o γ -ciclodextrina.

En general los arilnaftoxazoles incluidos en β -ciclodextrina, presentan constantes de inclusión que desplazan el equilibrio hacia la formación de los complejos con β -ciclodextrina. La Figura 4.5, muestra que los naftoxazoles **15** y **20**, tienen las constantes de inclusión más altas, $K = 640$ y 881 M^{-1} , mientras que los naftoxazoles **16** y **17** tienen las constantes de inclusión pequeñas.

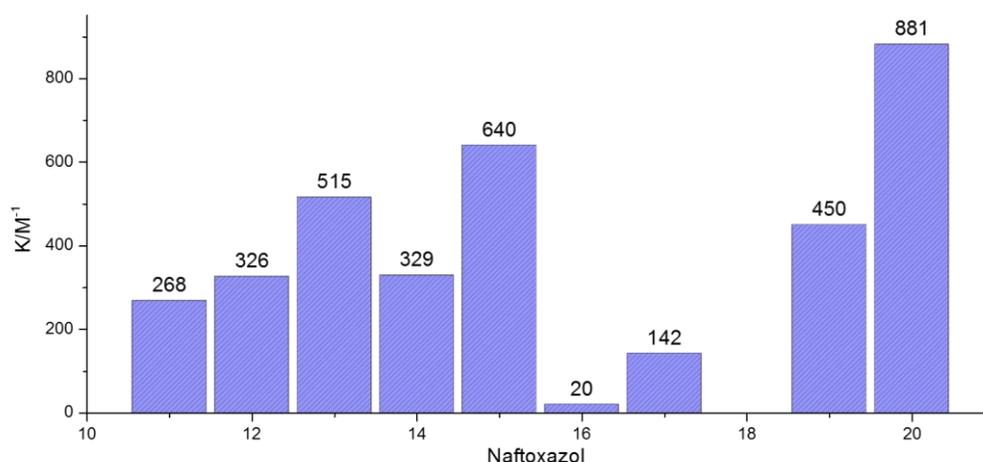


Figura 4.5. Representación gráfica de la constante de inclusión, K/M^{-1} , para los oxazoles **11** al **20**, incluidos en β -ciclodextrina.

Las constantes de inclusión obtenidas para los naftoxazoles (Tabla 4.2), son similares en magnitud a las calculadas por otros autores, por ejemplo, Hamai,¹⁰¹ encontró que para el 2-metilnafto[2,3-d]oxazol en β -ciclodextrina, la constante de inclusión es $K_{1:1}=640 \text{ M}^{-1}$ y para el naftaleno $K_{1:1}=685 \text{ M}^{-1}$,¹⁰¹ estas moléculas son estructuralmente análogas al naftoxazol **11** (2-fenilnafto[2,3-d]oxazol), el cual en β -ciclodextrina tienen una constante de inclusión de 326 M^{-1} . Este valor es la mitad que el reportado por Hamai para el metilnaftoxanol lineal, sin embargo, es simple visualizar que el sustituyente fenilo en el naftoxazol **11** es un sustituyente voluminoso y polarizable, lo que puede generar mayor impedimento estérico que un sustituyente metilo y posiblemente aumenta

levemente la solubilidad en agua. Ambos factores, limitan la inclusión completa del huésped en la cavidad de la β -ciclodextrina.

Tabla 4.2. Constantes de inclusión y parámetros termodinámicos para los naftoxazoles **11** al **15** en β -ciclodextrina y los naftoxazoles **12** y **13** en γ -ciclodextrina.

Naftoxazol	K (M ⁻¹)	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	ΔH° (kcal·mol ⁻¹)	ΔS° (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T ΔS° (kcal·mol ⁻¹)
11-β	268±2,5	-3,3±0,6	2,9±0,3	21,0±7,8	6,3±0,2
12-β	326±6	-3,4±0,6	-2,8±0,2	2,3±0,6	0,7±0,2
12-γ	133±5,9	-2,9±0,9	4,2±0,4	23,8±6,1	7,1±1,0
13-β	515±5,9	-3,7±1,0	3,1±0,8	22,7±1,0	6,8±0,3
13-γ	1006±5,2	-4,1±0,2	2,3±0,1	13,6±1,0	7,6±0,3
14-β	329±6,2	-3,4±0,3	5,1±0,1	28,7±2,2	8,5±0,6
15-β	640±5,9	-3,8±0,3	3,8±0,2	25,6±3,1	7,6±0,8

Hamai,⁵⁴ también determinó la constante de inclusión para el 2,4-difeniloxazol en γ -ciclodextrina, $K_{1:1}=760$ M⁻¹. Este valor es aproximadamente el doble que los encontrados para los naftoxazoles **12** y **13** en γ -ciclodextrina, debemos tener en cuenta que estas moléculas presentan grupos sustituyentes voluminosos y más polarizables (quinolina y vinilquinolina, respectivamente), que un sustituyente fenilo, por lo que al igual que en el caso del naftoxazol derivado **11**, se espera una disminución de la constante de inclusión.

Hamai,⁵⁴ también determinó las constantes de inclusión para las benzoquinolinas: benzo[h]quinolina, benzo[f]quinolina y fenantridina en β -ciclodextrina, obteniendo valores de $K_{1:1} = 750$, 490 y 370 M⁻¹, respectivamente. En γ -ciclodextrina, Hamai encontró que sólo la benzo[f]quinolina y fenantridina, forman complejos de inclusión con constantes $K_{1:1} = 250$ y $K_{1:1} = 150$ M⁻¹, respectivamente.⁵⁴ Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los naftoxazoles de la Tabla 4.3, las constantes de inclusión son de magnitud

similar, por lo tanto, al igual que en las benzoquinolinas, la posición del nitrógeno en el sistema aromático, influye tanto en la constante de inclusión, como en las interacciones de la β -ciclodextrina con la molécula huésped. De los resultados encontrados, es aparente que los derivados del naftoxazol que poseen sustituyentes aromáticos unidos al heterociclo a través de un puente vinílico y que no tienen grupos adicionales en la estructura, son más afines por la β -ciclodextrina.

El naftoxazol **11**, corresponde a un compuesto con geometría lineal, el cual presenta una constante de inclusión $K_{1:1} = 268 \pm 2,5 \text{ M}^{-1}$, este valor es más pequeño que los observados para el resto de los naftoxazoles, lo que muestra que la geometría lineal no favorece la inclusión de éstas moléculas en β -ciclodextrina.

Los naftoxazoles **12** y **13**, tienen el mismo grupo sustituyente (quinolina), con la diferencia que en el naftoxazol **12**, la quinolina se une directamente al anillo oxazol y en el naftoxazol **13** la distancia al heterociclo es mayor, debido a la presencia de un puente vinílico. Los valores de constante de inclusión en β -ciclodextrina (naftoxazol **12** $K_{1:1} = 326 \text{ M}^{-1}$ y naftoxazol **13** $K_{1:1} = 515 \text{ M}^{-1}$) o γ -ciclodextrina (naftoxazol **12** $K_{1:1} = 133 \text{ M}^{-1}$ y naftoxazol **13** $K_{1:1} = 1006 \text{ M}^{-1}$), muestran que los naftoxazoles que presentan sustituyentes unidos a través de puentes vinílicos son favorecidos termodinámicamente para formar complejos de inclusión, respecto de aquellos que no lo presentan. Este comportamiento puede explicarse debido a que la presencia del puente vinílico en la oxazinona **13**, permite una extensión de la aromaticidad, que lo cual hace que este naftoxazol sea más polar que su análogo el naftoxazol **12**.

Para evaluar el efecto del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina sobre la constante de inclusión y los parámetros termodinámicos asociados al proceso, se determinaron las constantes de inclusión de los naftoxazoles **12** y **13** en β - y γ -ciclodextrina. En la Tabla 4.2 se puede observar que la constante

de inclusión del naftoxazol **12** disminuye, cuando la cavidad del hospedero es mayor, esto se debe a que las interacciones que estabilizan al complejo de inclusión son más débiles. En el caso del naftoxazol **13**, se observa un efecto contrario, cuando el radio de cavidad de la ciclodextrina aumenta, la constante de inclusión aumenta, probablemente debido a que predomina un factor de tipo conformacional, ya que esta molécula al tener un mayor tamaño, puede acomodarse mejor en la cavidad de la γ -ciclodextrina.

Los naftoxazoles **15** y **14**, tienen un puente vinílico que une el anillo naftoxazol con el sustituyente. Cuando estas moléculas son incluidas en β -ciclodextrina, se observa que la constante de inclusión del naftoxazol **15** es aproximadamente el doble que para el naftoxazol **14** (Tabla 4.2). Esta situación probablemente se relaciona con factores estéricos, debido a que el naftoxazol **14** tiene un menor volumen que el naftoxazol **15**.

Parámetros Termodinámicos

A partir de las constantes de inclusión descritas en la Tabla 4.3, se determinaron la entalpía de formación del complejo de inclusión (ΔH°), la entropía (ΔS°) y la energía libre de Gibbs (ΔG°) para el proceso de inclusión.

Los valores de ΔG° negativos, entre -2 y -4 kcal/mol, para los naftoxazoles estudiados (Tabla 4.2), muestran que el proceso de inclusión es favorecido termodinámicamente y sugieren que el naftoxazol **15**, es la molécula más favorecida termodinámicamente para formar complejos de inclusión con β -ciclodextrina. Consecuentemente, se deduce que grupos sustituyentes electrodonadores en posición 2 del anillo naftoxazol, favorecen la formación de complejos de inclusión.

Por otra parte, cuando se comparan los naftoxazoles **12** y **13**, sustituidos por quinolina, con la diferencia de que en el naftoxazol **12** la quinolina se une directamente al anillo y en el naftoxazol **13** está separada del anillo heterocíclico

a través puente vinílico, se concluye que, independiente del anfitrión, β - o γ -ciclodextrina, los naftoxazoles que presentan sustituyentes unidos a través de puentes vinílicos son más favorecidos termodinámicamente para formar complejos de inclusión. Por ejemplo cuando los naftoxazoles **12** y **13**, se incluyen en β -ciclodextrina el ΔG° de formación del complejo de inclusión es de -3,4 y -3,7 kcal/mol, respectivamente. Cuando se incluyen en γ -ciclodextrina, estas moléculas tienen ΔG° de -2,9 y -4,09 kcal/mol, respectivamente. Este efecto se atribuye a que a mayor distancia del anillo se encuentre el sustituyente, el impedimento estérico producido por sustituyentes voluminosos se hace menos relevante (Tabla 4.2).

La figura 4.6 y los datos de la Tabla 4.2, muestran que los naftoxazoles **11**, **12- γ** , **13**, **13- γ** , **14** y **15** tienen entalpías y entropías positivas ($\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$), lo que indica que el proceso de inclusión es endotérmico y está controlado entrópicamente. Se puede entonces concluir que para estas moléculas, tanto la ruptura de las interacciones solvente-naftoxazol, como la desolvatación de la ciclodextrina, producen un cambio de entropía positivo y consecuentemente es el efecto hidrofóbico el responsable de la inclusión.

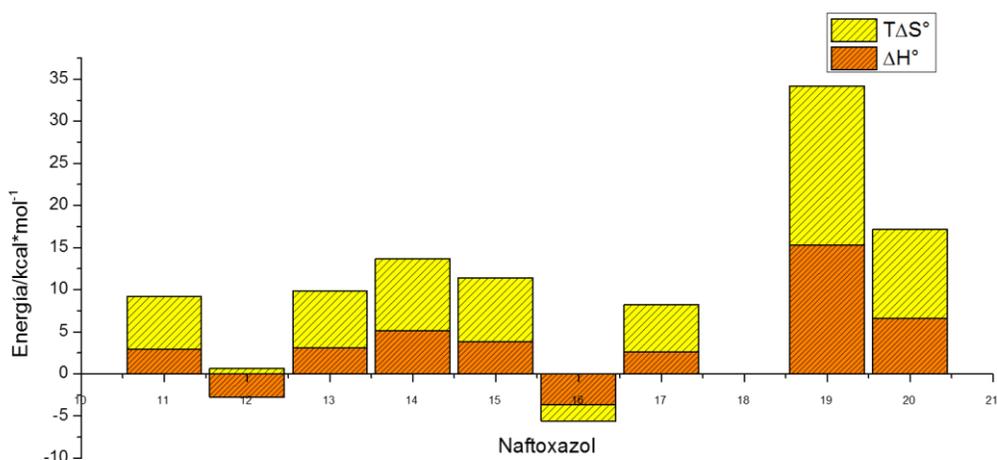


Figura 4.6. Representación gráfica de la entalpía (ΔH° /kcal/mol) y factor entrópico ($T\Delta S^\circ$ /kcal/mol), para los naftoxazoles **11** al **20**, incluidos en β -ciclodextrina.

Un comportamiento diferente al esperado lo presenta el naftoxazol **16** (Figura 4.6), en el cual se observa un control entálpico del proceso de inclusión, probablemente, porque al tener un menor volumen entra completamente a la cavidad de la β -ciclodextrina y las interacciones con ésta son favorecidas. Además, esta molécula tiene un $\Delta G^\circ = -20$ kcal/mol, el cual es mayor en módulo.

El caso particular de la inclusión del naftoxazol **12** en β -ciclodextrina, se observa que la entalpía de inclusión es negativa ($\Delta H^\circ < 0$) y la formación del complejo de inclusión es un proceso exotérmico. Además, se encontró que la entropía de inclusión es positiva ($\Delta S^\circ > 0$) y que $\Delta H^\circ > T\Delta S^\circ$, en consecuencia, el control termodinámico para la formación del complejo de inclusión es entálpico. Por consiguiente, la entalpía aporta -2,07 kcal/mol más que el factor entrópico en la en la estabilización del complejo de inclusión.

Los resultados de *docking* permiten explicar la importancia del efecto hidrofóbico para el naftoxazol **11** y el control entálpico para el naftoxazol **12** (Figura AN 3.5). Estas moléculas se orientan hacia la cavidad de mayor radio, así los sustituyentes se encuentran parcial o totalmente fuera de la cavidad, favoreciendo una interacción de puente de hidrógeno, entre los heteroátomos del anillo naftoxazol con los hidroxilos secundarios de la β -ciclodextrina. Por otra parte, la dinámica molecular para el naftoxazol **12**, muestra que la interacción del puente de hidrógeno está presente durante el transcurso de la simulación, lo que indica que ésta es energéticamente importante y favorece la estabilidad del complejo de inclusión.

Las poses de *docking*, en el caso de los naftoxazoles **13** y **15** en la cavidad de la β -ciclodextrina (Figura AN 3.5), muestran que se orientan hacia el portal de mayor radio, lo que implica que el naftoxazol es el que está incluido y el sustituyente queda fuera de la molécula hospedero. Sólo en el caso del naftoxazol **13** se observa una interacción de puente de hidrógeno entre el

nitrógeno de la quinolina con uno de los hidroxilos secundarios de la β -ciclodextrina

Además, los resultados de *docking* y dinámica molecular, muestran que el naftoxazol **14**, presenta una orientación hacia la entrada de menor radio, ya que el grupo naftoxazol es más voluminoso y tiene un carácter más apolar que el resto de molécula, de manera tal que queda dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina con el sustituyente fuera de ella (Figura AN 3.5). Experimentalmente se encontró que la inclusión de esta molécula, ocurre con control entrópico, por lo tanto el efecto hidrofóbico y la solvatación de la molécula son primordiales en la estabilización del complejo de inclusión. La conformación estructural del complejo de inclusión, no muestra interacciones energéticamente importantes, tales como puentes de hidrógeno entre los heteroátomos de los naftoxazoles y/o los sustituyentes respectivos, con los hidroxilos de la β -ciclodextrina.

De los datos de la Tabla AN 3.7, se encuentra que el naftoxazol **15**, tiene un RMSD promedio 2,59 Å. Para esta molécula, los resultados de *docking* y dinámica molecular, muestran que el grupo furano interactúa con los hidroxilos secundarios de la β -ciclodextrina, ubicándose fuera de la cavidad, por lo que su RMSD promedio es mayor a lo largo de la dinámica.

Al igual que para las oxazinonas, los resultados de dinámica molecular muestran que el parámetro de RMSD (raíz de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas) promedio de los naftoxazoles, se encuentra entre los 1,0 y 3,0 Å (Tabla AN 3.7). Consecuentemente, estas moléculas se encuentran durante todo el tiempo de simulación dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina y no se observa que la orientación de la molécula se invierta, o que el complejo de inclusión se desarme.

Análisis Termodinámico por MM/PBSA y MM/GBSA

Los resultados obtenidos empleando los métodos de MM/PBSA y MM/GBSA, para los naftoxazoles se incluyen en las Tablas AN 3.8 y AN 3.9. Ambas metodologías muestran que la energía de interacción de van der Waals (VDW) es negativa y se encuentra en el rango de -20 a -30 kcal/mol y favorece la estabilización del complejo de inclusión, siendo los naftoxazoles **12** y **13**, los que presentan mayor energía de interacción de VDW.

La energía de interacción electrostática (EEL), también es negativa y se encuentran en el rango de -2 a -11 kcal/mol. Los naftoxazoles **13** y **14**, presentan mayor EEL, consecuentemente se deduce a partir de estos resultados, que la presencia de grupos dadores de electrones unidos al naftoxazol a través de un puente vinílico proporciona mayor estabilidad al complejo de inclusión.

Los valores de ΔG° , calculados por el método de MM/GBSA, se encuentran en el rango de -19 a -25 kcal/mol. Los resultados obtenidos por esta metodología (Tablas AN 3.8 y AN 3.9), muestran que los valores de ΔG° son similares y consecuentemente no permiten discriminar los naftoxazoles más afines para formar complejos de inclusión con β -ciclodextrina. El método de MM/PBSA, muestra que los valores de ΔG° son menores a -7 kcal/mol y se observan diferencias significativas entre las energías de estas moléculas, siendo los naftoxazoles **13**, **14** y **15**, aquellos que presentan mayor afinidad por la cavidad de la β -ciclodextrina.

Al comparar los valores de ΔG° calculados (MM/GBSA y MM/PBSA) con los datos experimentales de la Tabla 4.2, se encontró que MM/PBSA es mejor método para reproducir la afinidad de los naftoxazoles por la β -ciclodextrina, ya que en ambos casos (experimental y MM/PBSA), son los **13**, **14** y **15**, las moléculas energéticamente más favorables para formar complejos de inclusión con β -ciclodextrina.

4.3 Compensación entálpica-entrópica para ariloxazinonas y ariloxazoles

La compensación entálpica-entrópica en principio no es una relación explícita entre el cambio de entropía y entalpía, pero puede ser derivada a partir de ecuaciones termodinámicas fundamentales, por lo que es empleada para analizar una relación lineal compensatoria.¹¹⁰ Como las constantes de inclusión dependen con la estructura de la molécula, el análisis del factor entálpico-entrópico permite determinar el criterio con el cual realizar cambios estructurales a la molécula, con el fin de potenciar una disminución de la entalpía, lo cual producirá una energía libre de Gibbs aún más favorable para la formación del complejo oxazinona o naftoxazol en β -ciclodextrina.

Para el análisis se correlacionará linealmente el valor de $T\Delta S^\circ$ con el valor de ΔH° , según las siguientes ecuaciones:

$$T\Delta\Delta S^\circ = \alpha\Delta\Delta H^\circ \text{ (ecuación 4.1)}$$

$$T\Delta S^\circ = \alpha\Delta H^\circ + T\Delta S_0^\circ \text{ (ecuación 4.2)}$$

$$\Delta G^\circ = (1-\alpha)\Delta\Delta H^\circ \text{ (ecuación 4.3)}$$

Donde, α es la pendiente del gráfico $T\Delta S^\circ$ versus ΔH° (ecuación 4.2). Esta ecuación indica en qué medida una ganancia entálpica ($\Delta\Delta H^\circ$), inducida por cambios en la molécula huésped, anfitrión y en el solvente, es cancelada por la pérdida entrópica ($\Delta\Delta S^\circ$) que acompaña el proceso de formación del complejo de inclusión. En otras palabras, la fracción $(1-\alpha)$ de la ganancia entálpica contribuye al aumento en la estabilidad del complejo de inclusión. Por otra parte, el intercepto, $T\Delta S_0^\circ$, representa la estabilidad inherente del complejo de inclusión (ΔG°), obtenido a $\Delta H^\circ=0$, lo cual significa que el complejo es estabilizado incluso en ausencia de la estabilización entálpica, si el término $T\Delta S^\circ$ es positivo.¹¹⁰

Con el propósito de observar una tendencia representativa del comportamiento de ambas familias (ariloxazinonas y ariloxazoles) se incluyó en el gráfico, Figura 4.7.

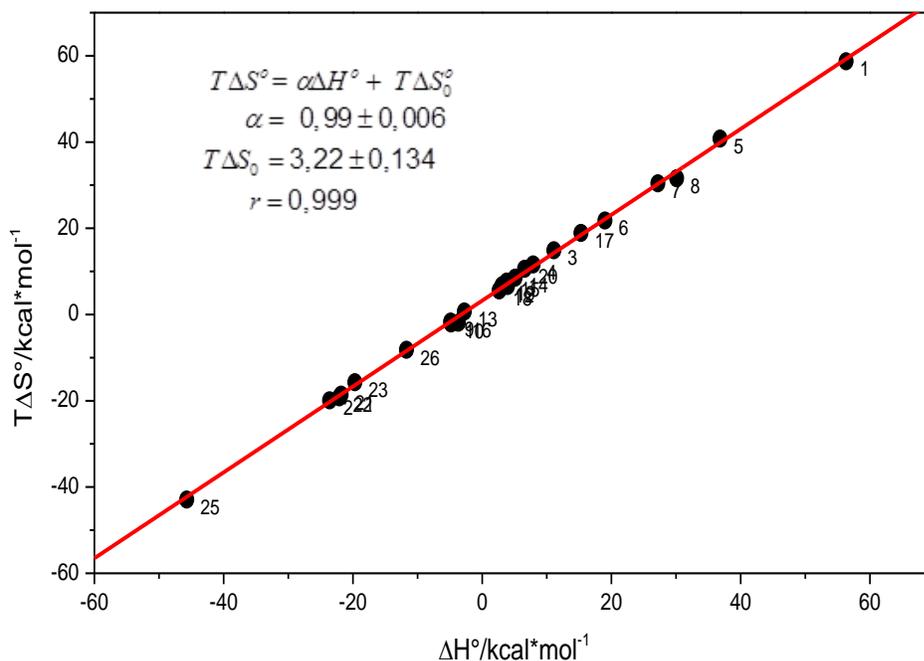


Figura 4.7: Gráfico de factor entálpico-entrópico, para las oxazinonas y ariloxazoles 1-26 incluidas en β -ciclodextrina.

Los resultados para las ariloxazinonas y ariloxazoles, muestran que el factor entálpico-entrópico, es de $\alpha = 0,995$ para la β -ciclodextrina (Figura 4.7). Este valor indica que sólo el 0,5% de la pérdida entálpica ($\Delta\Delta H^\circ$) provocada por variaciones estructurales de las oxazinonas, aportan un aumento en el ΔG° de formación del complejo y por consiguiente en la constante $K_{1:1}$ del proceso de formación de complejos de inclusión entre oxazinonas y β -ciclodextrina. Este valor de α , concuerda con los valores encontrados para la $K_{1:1}$ y el ΔG° del proceso de formación de complejos de inclusión debido a que a la temperatura de 298 K, los cambios de estos parámetros entre una molécula y otra son pequeños.

4.4 Caracterización termodinámica y efecto del pH en la formación del complejo de inclusión entre la oxazinona 2 y β -ciclodextrina.

En la búsqueda de compuestos orgánicos fluorescentes que posean una alta fotoestabilidad y emisión en agua, solvente biológicamente importante, se estudió el comportamiento termodinámico de la oxazinona 2, cuando es incluida en β -ciclodextrina a distintos pHs usando técnicas fluorescentes descritas en el capítulo 2. Se seleccionó ésta molécula, debido a que posee un grupo amino en su estructura, el cual es susceptible a ser ionizado dependiendo del pH del medio.

Se determinó previamente que la oxazinona 2 es sensible a la polaridad del medio en el que se encuentra, presentando desplazamientos batocrómicos del máximo de emisión en presencia de solventes polares. En la Tabla 4.3, se distingue que cuando la molécula no-incluida se encuentra en solventes apolares como benceno presenta un máximo de emisión de 478 nm y cuando está en solventes polares como agua y acetonitrilo, sus máximos de emisión son de 541 y 500 nm, respectivamente. Consecuentemente, la Tabla 4.3, muestra que a distintos pHs, los valores de longitud de onda máxima de emisión presentan corrimientos hipsocrómicos cuando la oxazinona 2 es incluida en la cavidad apolar de la β -ciclodextrina. Además, a medida que la basicidad del medio aumenta, los máximos de emisión también presentan ligeros desplazamientos hipsocrómicos de 490 nm cuando el pH aumenta de 3 a 5.

Tabla 4.3. Longitud máxima de emisión de fluorescencia ($\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}$) en nanómetros (nm), para la oxazinona **2** libre y para el complejo de inclusión (oxazinona **2**/ β -CD) a pH 3, pH 5 y pH 6,8.

	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ oxazinona 2	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ oxazinona 2 / β -CD
pH3	538	532
pH5	541	527
pH6,8	540	526

El aumento en la intensidad de fluorescencia de la oxazinona **2** con la concentración de β -ciclodextrina (Figura AN 2.6), indicativo de la inclusión del esta en la cavidad del hospedero, permite determinar las constantes de inclusión usándose la ecuación de Benessi-Hildebrand (Figura 4.8 a). Los datos experimentales se ajustan a la ecuación considerando una estequiometría 1:1, resultado que fue corroborado empleando el método gráfico de Job. Los gráficos, que fueron obtenidos variando el factor r entre 0,1 y 0,9, muestran un máximo a $r = 0,5$, compatible con estequiometría 1:1 para el complejo de inclusión (Figura 4.8 b).

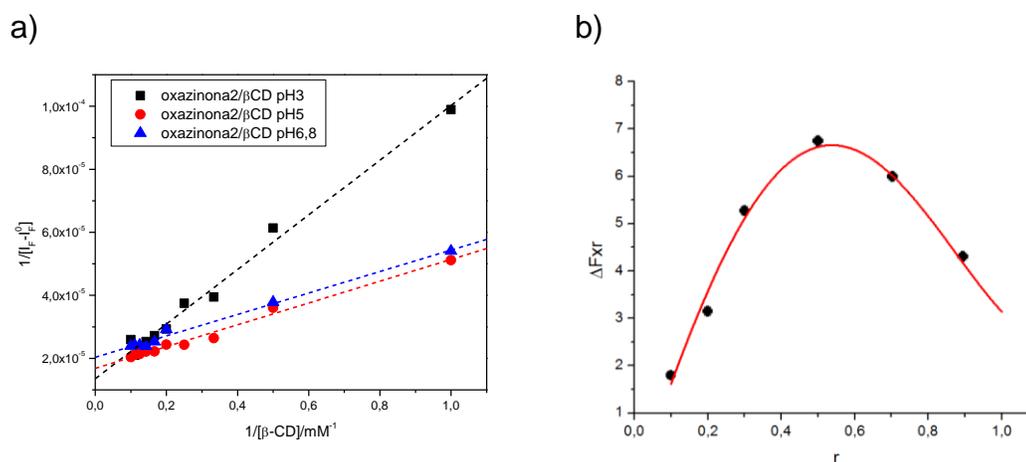


Figura 4.8. a) Gráfico de Benessi-Hildebrand para complejos de inclusión entre la oxazinona **2** y β -CD con estequiometría 1:1, a pH 3, 5 y 6,8 a 298 K. b) Gráfico de Job, para la oxazinona **2** a pH 5 Y 298 K, $r=0,5$.

Las constantes de inclusión calculadas por el método de Benessi-Hildebrand, a distintas temperaturas y pHs, junto con los parámetros termodinámicos se incluyen en la Tabla 4.4. Los datos de la Tabla 4.4, muestran que las constantes de inclusión K son mayores a 100 M^{-1} y aumentan a medida que el pH aumenta, lo que indica que el proceso de formación del complejo de inclusión está más favorecido termodinámicamente a pH 6,8. También se puede apreciar que la constante de inclusión a distintos pHs, disminuye con el aumento de la temperatura, lo que se asocia con un proceso inclusión dirigido por fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas y efecto hidrofóbico.

Tabla 4.4. Constante de Inclusión para complejos oxazinona **2**/β-ciclodextrina, con estequiometría 1:1 y parámetros termodinámicos en condiciones estándar determinados a distintos pHs.

	T/K	K/M ⁻¹	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	ΔH° (kcal·mol ⁻¹)	ΔS° (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T ΔS° (kcal·mol ⁻¹)
pH3	298	156	-2,99±0,3	-4,73±0,4	-5,50±1,7	-1,64±0,4
	303	145				
	308	125				
	313	107				
pH5	298	486	-3,66±0,8	-7,68±0,7	-13,5±2,1	-4,02±0,6
	303	387				
	308	319				
	313	119				
	318	33				
pH6,8	298	597	-3,78±0,5	-9,50±0,3	-19,2±1,5	-5,72±0,3
	303	467				
	313	424				
	318	176				

Los valores de entalpía son negativos a distintos pHs, consecuentes con un proceso de inclusión exotérmico. Además, a altas temperaturas la constante de inclusión disminuye, lo que se interpreta considerando que es probable que exista una disminución en la fuerza de las interacciones tipo puentes de hidrógeno que estabilizan el complejo de inclusión. Los valores de entropía obtenidos a distintos pHs, también son negativos, lo que se asocia con un pequeño aporte del efecto hidrofóbico a la estabilización del complejo de inclusión. Los resultados, permiten concluir que el proceso de formación del complejo de inclusión es principalmente controlado por la entalpía y determina el cambio en la energía libre de Gibbs compatible con un proceso de inclusión espontáneo y favorecido a pHs altos.

CAPÍTULO 5:

Aplicaciones

5.1 Generación de luz blanca en fase sólida

El desarrollo de nuevos materiales capaces de emitir luz blanca tiene un gran potencial de aplicación en el desarrollo de diodos orgánicos emisores de luz (*organic light emitting diode*), OLED. Estos nuevos materiales se basan en la mezcla de diferentes moléculas orgánicas fluorescentes, las cuales cuando emiten son capaces de cubrir todo el espectro electromagnético UV-visible.

Hasta hace algunos años, experimentalmente se determinó que los naftoxazoles que presentan como sustituyente el grupo quinolina, muestran espectros de fluorescencia que abarcan todo el rango visible (emisión de luz blanca) cuando se encuentran en mezclas de solventes polares próticos que tienen altos valores del parámetro de acidez como trifluoroetanol (TFE) y hexafluoroetanol (HFE) y un co-solvente aprótico polar básico como dimetilsulfóxido (DMSO), Figura 5.1.

La fluorescencia blanca observada en estos compuestos, en mezclas TFE-DMSO, proviene de un solapamiento de dos bandas del espectro de emisión, la banda de mayor energía corresponde a la emisión desde el estado localmente excitado (máximo a 443 nm) y la banda de menor energía se asocia a la emisión desde un complejo en el estado excitado que involucra la transferencia intermolecular de protones desde el solvente TFE hacia el átomo de nitrógeno del grupo quinolina.¹¹⁵⁻¹¹⁷

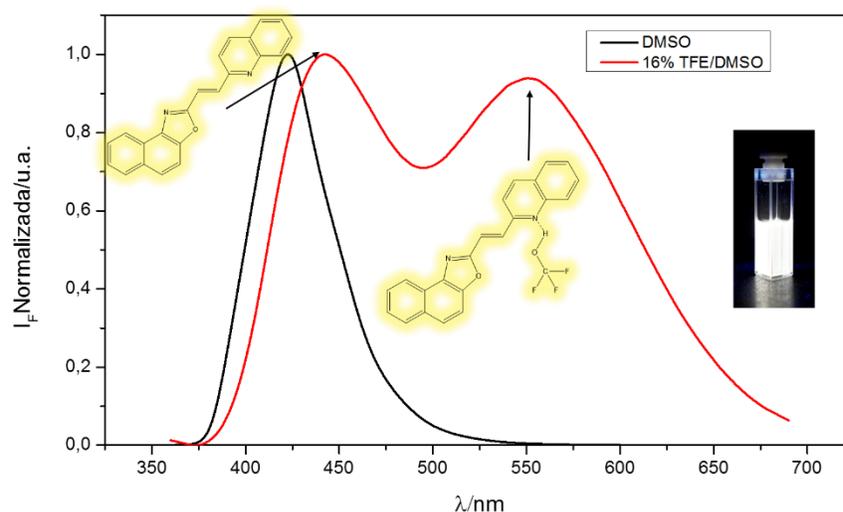


Figura 5.1. Espectros de emisión de fluorescencia normalizada, para el naftoxazol **13**, donde el color negro corresponde al espectro en dimetilsulfóxido (DMSO) y el color rojo corresponde a una mezcla entre trifluoroetanol (TFE) y DMSO al 16%. En la figura de la derecha se muestra la emisión de luz blanca.

La fluorescencia dual observada para los naftoxazoles que presentan quinolina en su estructura, podría conducir a importantes aplicaciones en el diseño de “OLED’s” si se encuentra un comportamiento análogo en fase sólida, con éste propósito se decidió incorporar las moléculas estudiadas en esta tesis a ciclodextrina, ya que el pKa de la β - y γ -ciclodextrina es de 12,02 y 12,08 respectivamente^{118,119} y el TFE, solvente que posee la acidez suficiente para protonar el estado excitado de la molécula tiene un pKa=12,8.¹²⁰ Ninguna de las ariloxazinonas y la mayoría de los ariloxazoles, presentaron emisión de luz blanca en medio acuoso, cuando forman complejos de inclusión con β - o γ -ciclodextrina. De acuerdo a los antecedentes experimentales, discutidos anteriormente, se eligió el naftoxazol **13** (2-[(E)-2-quinolin-2-il-vinil]nafto[1,2-d][1,3]oxazol) (Figura 5.2), para llevar a cabo esta aplicación, debido a que ésta molécula una constante de inclusión mayor que su análogo estructural el naftoxazol **12** cuando se incluye tanto en γ - como β -ciclodextrina (Tabla AN. 3.4), consecuentemente, la afinidad de esta molécula es mayor y por lo tanto facilita el desarrollo del experimento.

Experimentalmente se determinó que el naftoxazol **13**, que cuando se encuentra en TFE puro se observa un máximo de emisión a 460 nm, mientras que en una mezcla al 16% v/v TFE-DMSO presenta emisión de luz blanca y el espectro de emisión muestra dos máximos a 450 nm y 572 nm (Figura 5.1). Además el naftoxazol **13**, tiene rendimientos cuánticos de fluorescencia cercanos a la unidad en solventes tanto polares como apolares (Tabla AN. 3.1) y un tiempo de vida de fluorescencia de 2,42 ns.¹⁰⁴ Cuando el naftoxazol **13**, es solubilizado en una mezcla TFE/DMSO 16% v/v, el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye a 0,31;¹⁰⁴ corroborando que la aparición de la segunda banda de menor energía, en el espectro de emisión, corresponde a un estado emisivo diferente.

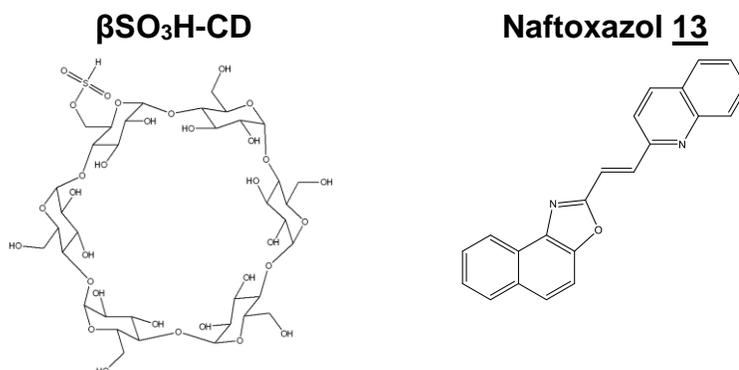


Figura 5.2. Estructura química de la β -ciclodextrina modificada con un grupo ácido sulfónico (izquierda) y del naftoxazol **13** (derecha).

Para generar luz blanca en fase sólida, los experimentos se realizaron primeramente en agua, donde se formó el complejo de inclusión entre el naftoxazol **13** y β - o γ -ciclodextrina, en ambos casos se obtuvo complejos con estequiometría 1:1 y constantes de afinidad de 515 y 1006 M⁻¹ respectivamente (Tabla 5.1), pero en ninguno de los casos se observó la formación de la segunda banda de emisión a menor energía (Figura AN 3.3), a pesar de que el pKa de la β - y γ -ciclodextrina es menor que el solvente TFE. Los resultados de dinámica molecular muestran que la formación del puente de hidrógeno entre los hidroxilos de la β -ciclodextrina y el átomo de nitrógeno de la quinolina es

una interacción débil en el tiempo (Figura AN 3.6), además los resultados de los cálculos de orbitales naturales de enlace, dan evidencia de una interacción orbitalaria estabilizante de baja energía entre el átomo de nitrógeno del anillo quinolina del naftoxazol **13** y el átomo de oxígeno grupo hidroxilo de la β -ciclodextrina (Tabla AN 3.10). Consecuentemente, en el excitado no se aprecia la emisión de luz blanca en solución.

Con el objetivo de conseguir fluorescencia blanca, a los complejos de inclusión entre el naftoxazol **13**, con la β - o γ -ciclodextrina, se agregó trifluoroetanol ($pK_a=12,43$) y hexafluoroisopropanol ($pK_a=9,3$) como co-solventes, pero no se obtuvo la emisión de luz blanca. Probablemente la inclusión de la molécula fluorescente en el macrociclo, impide las interacciones de ésta con el co-solvente y en consecuencia la emisión desde el estado de transferencia de protones no es observada.

Como los experimentos anteriores no dan cuenta de la generación de luz blanca se decidió utilizar una ciclodextrina modificada con un grupo que sea altamente ácido como el ácido sulfónico, por ejemplo el ácido metilsulfónico presenta un pK_a 1,6 (Figura 5.1).

Tabla 5.1. Longitud máxima de emisión ($\lambda_{máx}^{emis}$) en nanómetros y constantes de inclusión para el complejo de inclusión entre el naftoxazol **13** en β -, γ - y βSO_3H -ciclodextrina, en medio acuoso con estequiometría 1:1 y condiciones estándar (T=298K).

NAFTOXAZOL	$\lambda_{máx}^{emis}/nm$ complejo	K (M ⁻¹)
13-β	464	515 \pm 5,9
13-γ	496	1006 \pm 5,2
13-βSO_3H	467	210 \pm 4,3
	557	

En solución los espectros de absorción del naftoxazol **13**, presentan un comportamiento espectroscópico relevante, sus coeficientes de absorción molar

son altos, por ejemplo en etanol es de $47721 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y su máximo de absorción se encuentra a 377nm . En agua no fue posible determinar su coeficiente de absorción molar, debido a la poca solubilidad que presenta la molécula, pero su máximo de absorción se desplaza a 381 nm . Cuando esta molécula es incluida en $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, se observa un aumento en la intensidad de absorción a medida que la concentración de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina aumenta (Figura 5.3), encontrándose que el máximo de absorción permanece constante a 412nm .

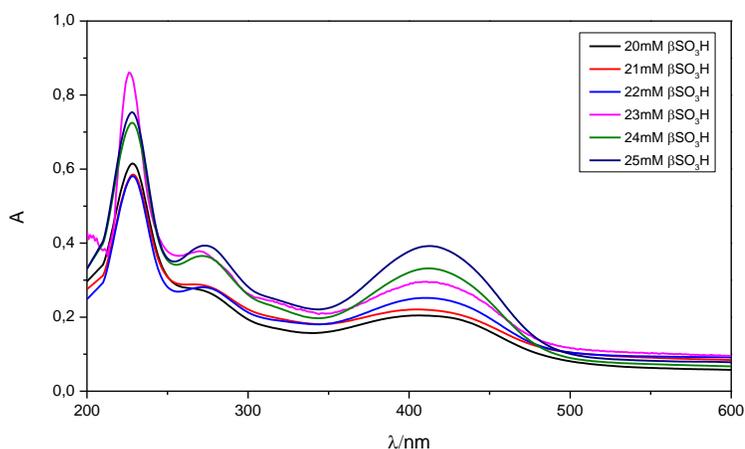


Figura 5.3. Espectros de absorción en medio acuoso a distintas concentraciones de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, para el naftoxazol **13**.

Los espectros de emisión del complejo de inclusión formado por el naftoxazol **13** y la $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, en medio acuoso y en medio sólido, muestran la aparición de una nueva banda de emisión con un gran desplazamiento a longitudes de onda mayores a partir de una concentración de 21 mM de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina (Figura 5.4). Esta banda correspondería a un nuevo estado emisor, con un máximo de emisión en medio acuoso de 467 nm y 547 nm para la primera y segunda banda, respectivamente. Mientras que en medio sólido los máximos son desplazados hipsocrómicamente a 440nm y 522nm respectivamente, debido a que ya no está la interacción con el agua.

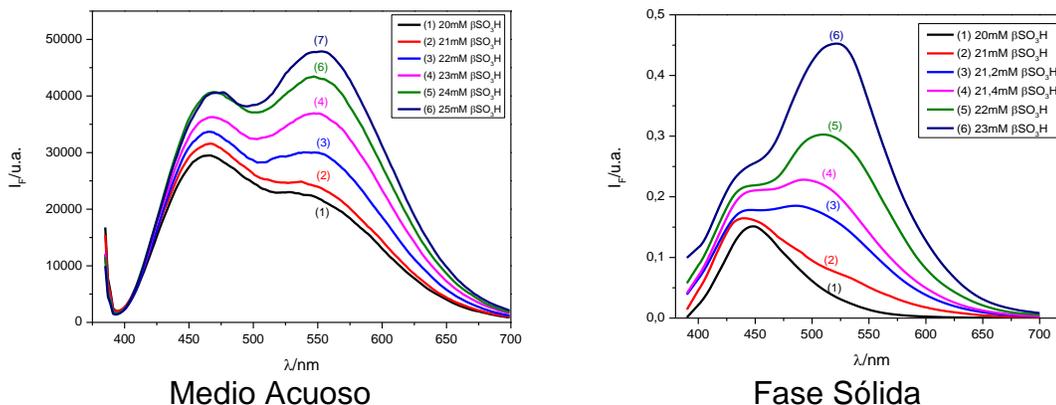


Figura 5.4. Espectros de emisión a distintas concentraciones de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, en medio acuoso (izquierda) y en fase sólida (derecha), para el naftoxazol **13**.

A partir de la Figura 5.4 se observa que en medio acuoso y con una concentración de 23 mM de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, las dos bandas de emisión se igualan en intensidad, mientras que en fase sólida este efecto ocurre a una concentración de 21,2 mM de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina. El comportamiento observado, se puede entender en términos de la formación de un complejo de estado basal de transferencia de protones. Éste proceso se origina a partir de la inclusión de la molécula fluorescente en la cavidad $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, donde se forma una interacción entre el átomo de hidrógeno del sulfonato de la $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina con el átomo de nitrógeno de la quinolina, la cual no es directamente proporcional a la cantidad de $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina que se utiliza para formar el complejo de inclusión.

Con el propósito de confirmar si la banda de emisión, resulta de la excitación del complejo de estado basal de transferencia de protones o el proceso ocurre en el estado excitado, se compararon los espectros de absorción y emisión del naftoxazol **13**, cuando éste se incluye en $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina y en presencia de 0,3 M de ácido sulfúrico, empleando acetonitrilo y trifluoroetanol como solventes (Figura 5.5 a y b). Se observa en el espectro de emisión un máximo a 550 nm en soluciones acuosas $\beta\text{SO}_3\text{H}$ -ciclodextrina, el cual se desplaza a 525 nm en el sólido. En la solución ácida, el naftoxazol **13**

debería estar totalmente protonado en el estado basal. En acetonitrilo los máximos de absorción y emisión del naftoxazol **13** aparecen a 374 y 438 nm, respectivamente (Figura 5.5 a). Con ácido agregado, la banda de menor energía, en el espectro de absorción, se encuentra a 436 nm y el máximo del espectro de emisión se presenta a 615 nm, mientras que en el complejo de inclusión, el máximo de absorción se desplaza a 415 nm y la emisión muestra dos bandas con los máximos a 450 y 570 nm (Figura 5.5 a).

Cuando el solvente es trifluoroetanol, el espectro de absorción del naftoxazol **13** tiene el máximo a 375 nm, pero la banda de emisión se desplaza significativamente hacia el rojo apareciendo a 580 nm (Figura 5.5 b). En presencia de ácido, los máximos de absorción y emisión coinciden con los obtenidos en acetonitrilo en presencia de ácido. El complejo naftoxazol **13**- β SO₃H-ciclodextrina disuelto en trifluoroetanol, tiene máximos de absorción y emisión similares a los observados en acetonitrilo, aunque en la emisión se observa una pequeña contribución de la banda de mayor energía que aparece alrededor de 450 nm.

Éstos resultados se pueden interpretar de la siguiente manera, el compuesto puro en acetonitrilo decae emitiendo fotones desde el estado singulete excitado, mientras que en trifluoroetanol decae desde un estado excitado de menor energía posiblemente producido por transferencia de protones desde el solvente al singulete excitado ya que, la banda de emisión tiene la forma y el máximo coincidente con los observados en soluciones acidificadas con ácido sulfúrico. Es importante destacar que el espectro de absorción es idéntico al observado en el solvente no prótico acetonitrilo. Cuando forma complejos de inclusión con β SO₃H-ciclodextrina, el comportamiento observado es mimilar al encontrado en soluciones ácidas y posiblemente la banda fluorescencia de menor energía resulta de la excitación

directa de un complejo de estado basal formado por transferencia de proton desde el grupo sulfonato ácido al nitrógeno del sustituyente quinolina.

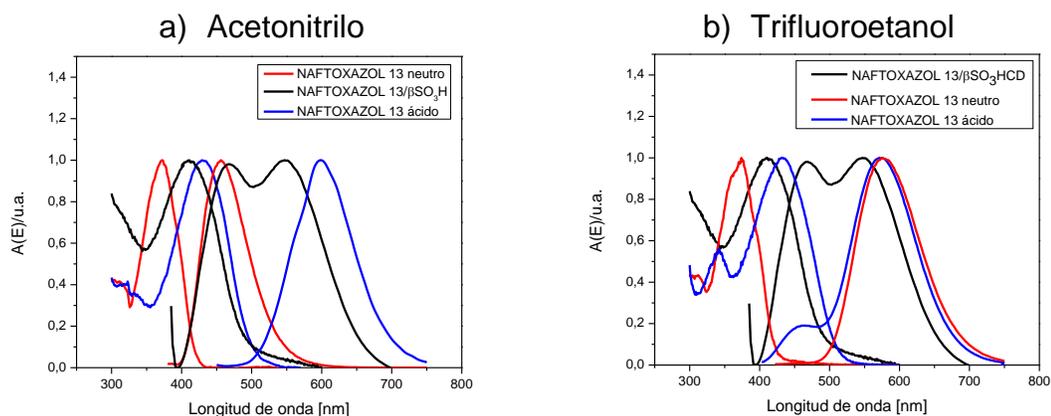


Figura 5.5. Espectros de absorción y emisión del naftoxazol **13**, en soluciones con β SO₃HCD neutras y en soluciones de ácido sulfúrico 0,3 M en a) acetonitrilo y b) trifluoroetanol.

Los valores incluidos en la Tabla 5.2 muestran el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) a 467 nm para el naftoxazol **13** libre y formando complejos de inclusión con β SO₃H-ciclodextrina a concentraciones de 20, 21, 22, 23, 24 y 25 mM. De acuerdo a los resultados se observa el aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia a altas concentraciones de β SO₃H-ciclodextrina. A partir de esta observación es posible deducir que tanto el estado protonado como el estado localmente excitado, modifican su probabilidad de decaer por la vía de la emisión de fluorescencia.

Tabla 5.2. Rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F), en medio acuoso a 467 nm, fracciones molares para el estado excitado correspondiente al tiempo de vida 1 (\bar{x}_{τ_1}) y tiempo de vida 2 (\bar{x}_{τ_2}) y tiempos de vida en nanosegundos (ns) para el estado localmente excitado (τ_1) y para el estado excitado de transferencia de protones (τ_2), para el naftoxazol **13** incluido en β SO₃H-ciclodextrina.

β SO ₃ H-ciclodextrina/mM	ϕ_F	\bar{x}_{τ_1}	\bar{x}_{τ_2}	τ_1 /ns	τ_2 /ns	χ^2
0	0,06	-	-	2,9±1,5	-	0,92
20	0,16	0,57	0,43	2,9±0,5	10,0±1,5	0,98
21	0,18	0,58	0,42	2,9±1,8	10,4±2,0	1,00
22	0,22	0,53	0,47	2,9±1,0	10,6±0,5	0,90
23	0,28	0,49	0,51	2,9±1,3	10,8±1,3	0,93
24	0,35	0,48	0,52	2,9±0,4	11,2±1,5	0,95
25	0,41	0,46	0,54	2,9±0,5	10,9±1,0	0,96

En la Tabla 5.2 también se encuentran los valores de tiempos de vida de fluorescencia para el complejo de inclusión, formado entre el naftoxazol **13** y la β SO₃H-ciclodextrina. Los resultados muestran que el tiempo de vida del estado localmente excitado (τ_1) es de 2,9 ns y no se ve afectado por la cantidad de β SO₃H-ciclodextrina que exista en solución. Además, el tiempo de vida del estado excitado correspondiente a la transferencia intermolecular protones (τ_2) es de aproximadamente 10 ns y aumenta a altas concentraciones de β SO₃H-ciclodextrina.

5.2 Detección de oxígeno molecular singulete

El oxígeno es el tercer elemento más abundante del universo y el más frecuente en la corteza terrestre. El oxígeno molecular es de vital importancia para el desarrollo de la vida ya que juega un importante rol en procesos biológicos como la fotosíntesis y la respiración celular.

Es sabido que el oxígeno molecular difiere de la mayoría de las moléculas que se encuentran en la naturaleza, debido a que tiene un estado basal triplete de capa abierta y dos estados excitados de multiplicidad singulete que poseen baja energía $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_{+g}$. El tiempo de vida del estado $^1\Sigma_{+g}$ es menor que el del estado $^1\Delta_g$, por lo tanto cuando se habla del estado excitado del oxígeno molecular, se refiere al estado $^1\Delta_g$, comúnmente llamado oxígeno molecular singulete.

El oxígeno molecular singulete, juega un importante rol en procesos fisiológicos y es capaz de oxidar a un sin número de moléculas.^{121,122} En los últimos años el estudio de los mecanismos de reacción del oxígeno singulete con moléculas orgánicas y su comportamiento en sistemas biológicos han permitido su aplicación en terapias para el tratamiento del cáncer, como lo es la terapia fotodinámica.¹²² Debido a la microheterogeneidad de los sistemas biológicos, la capacidad de detectar y cuantificar al oxígeno molecular singulete se ha transformado en un gran desafío. Por esta razón, el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes y quimioluminiscentes, han sido propuestas como detectores de oxígeno molecular singulete, debido principalmente a la elevada sensibilidad y selectividad que estas poseen.

Con el propósito de desarrollar nuevas sondas fluorescentes capaces de detectar oxígeno molecular singulete en medio acuoso se han seleccionado moléculas derivadas de furano. Considerando que, los compuestos derivados del furano reaccionan eficientemente con oxígeno molecular singulete, se seleccionó el naftoxazol **15** para ser estudiado como sonda fluorescente de

oxígeno molecular singlete en medio acuoso. El naftoxazol **15** presenta rendimientos cuánticos de fluorescencia bajos, del orden de 0,02 a 0,07 en solventes polares como acetonitrilo o metanol y un rendimiento cuántico de fluorescencia entre 0,1 y 0,4 en solventes apolares (Tabla AN 3.1). Este comportamiento se puede explicar por medio de un mecanismo de desactivación intramolecular del estado excitado del naftoxazol, el cual se produce debido a un proceso de transferencia parcial de carga desde el grupo furano al naftoxazol.

Debido a la baja solubilidad del naftoxazol **15** en agua, se decidió incluirlo en β -ciclodextrina, encontrándose una constante de inclusión de $K_{1:1}$ de 640 M^{-1} . También es importante señalar que los resultados de *docking* y de dinámica molecular muestran que el naftoxazol **15** es incluido en la β -ciclodextrina posicionando al grupo furano fuera de la cavidad y orientándolo hacia los hidroxilos secundarios (Figura AN 3.6). Esta ubicación de la molécula dentro de la β -ciclodextrina, permite que el grupo furano pueda interactuar fácilmente con el oxígeno molecular singlete generado, basándose en que los derivados de furano reaccionan eficientemente con oxígeno molecular singlete, a través de la formación de intermediarios endoperóxidos¹²³ (Figura 5.5).

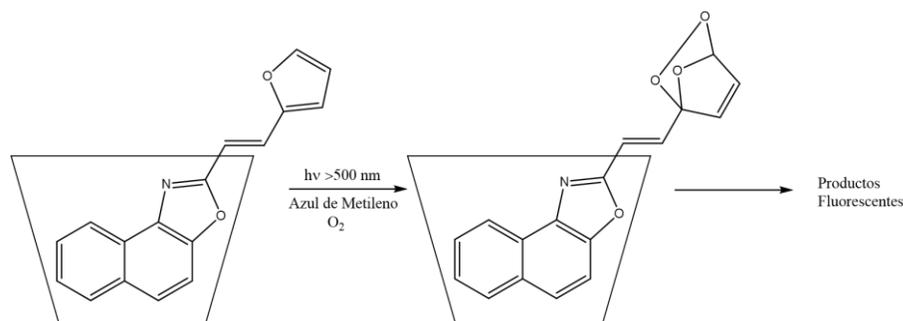
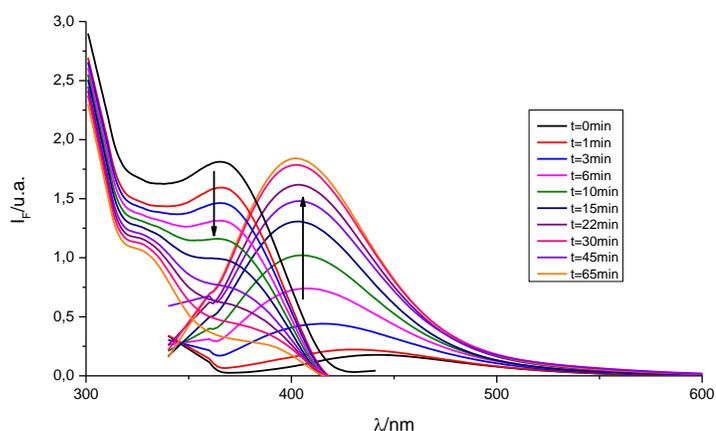


Figura 5.6. Esquema de reacción del complejo de inclusión, formado entre el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina, cuando el furano reacciona con oxígeno molecular singlete.

Cuando el complejo de inclusión formado entre el naftoxazol **15** y β -ciclodextrina, es irradiado en agua, con luz visible en presencia de un sensibilizador de oxígeno molecular singulete, como azul de metileno, se observa que a medida que el tiempo de irradiación aumenta, lo que muestra que la intensidad de la banda de absorción disminuye indicando pérdida de la conjugación de la molécula, espectro izquierdo Figura 5.6, mientras que en el espectro de emisión (derecha) comienza a aparecer la fluorescencia típica del naftoxazol y a su vez la intensidad de fluorescencia aumenta significativamente, lo cual permite concluir que los productos de la reacción con oxígeno molecular singulete son más fluorescentes que el naftoxazol **15** incluido en β -ciclodextrina.



t/min	0	1	3	6	10	15	22	30	45	65
$\frac{F_{402}/A_{365}}{F_{402}^0/A_{365}^0}$	1	2	7	13	21	33	48	63	97	139

Figura 5.7. Evolución de los espectros de absorción y fluorescencia del complejo de inclusión formado entre el naftoxazol **15** y 10 mM β -ciclodextrina. Luego de irradiar el azul de metileno en agua con una lámpara halógena de 50 W, a través de un filtro de 500 nm. En la Tabla se incluye el aumento relativo de la fluorescencia (F) a 402 nm de los productos de reacción corregidos por el cambio en la absorbancia (A) a 365 nm en el tiempo (min).

A lo largo de los años se ha hecho un gran esfuerzo en diseñar, sintetizar y caracterizar sondas fluorescentes para detectar especies reactivas de oxígeno. Una de las sondas fluorescentes para la detección de oxígeno

excitado, que ha llamado la atención en los últimos años es la “Singlet Oxygen Sensor Green” (SOSG), la cual ha sido comercializada por Invitrogen/Molecular Probes, este sensor de oxígeno singulete es altamente selectivo y no presenta ningún tipo de respuesta sensible a los radicales hidroxilo o superóxido. La estructura de esta sonda fluorescente se ha mantenido en secreto industrial, pero por comparación con otros sensores se ha llegado a la conclusión de que SOSG incluye un derivado de fluoresceína y un grupo dimetilantraceno.^{124,125,126} SOSG emite una débil fluorescencia azul, cuando es excitada a 372 y 393 nm se observa un máximo de emisión a 395 y 416 nm, respectivamente. En presencia de oxígeno singulete, emite fluorescencia verde similar a la fluoresceína (excitación/máximo de emisión \approx 504/525 nm).¹²⁷ Experimentalmente se determinó en agua deuterada que la sonda SOSG aumenta la emisión de fluorescencia en un 43%.

Se determinó experimentalmente que el rendimiento cuántico de fluorescencia del naftoxazol **15** medido usando sulfato de quinina como actinómetro luego de reaccionar con oxígeno excitado, en una solución 10 mM de β -ciclodextrina y en metanol es 0,7 y 0,43, respectivamente.²² La literatura reporta que SOSG en una mezcla de agua deuterada/metanol (97/3), tiene un rendimiento cuántico de 0,52.²² Este resultado muestra que el naftoxazol **15** incluido en β -ciclodextrina, tiene mejores propiedades fotofísicas para detectar oxígeno molecular singulete, que cuando está en metanol, o que la sonda SOSG en agua deuterada/metanol (97/3).

Como el oxígeno molecular singulete reacciona con el complejo de inclusión formado por el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina, se determinó la constante de desactivación del oxígeno molecular singulete. Para ello se midió la velocidad de decaimiento de la emisión infrarroja del oxígeno excitado utilizando métodos resueltos en el tiempo. A partir de mediciones del oxígeno molecular singulete en ausencia y presencia de desactivante, y usando la

ecuación de Stern-Volmer, se obtuvo las constantes de desactivación en agua deuterada como solvente, calculadas empleando la pendiente de gráficos de la constante de decaimiento del oxígeno excitado versus la concentración de la sonda de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$k_d = k_d^0 + k_q[S] \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Donde k_d^0 , es la constante de velocidad de decaimiento del oxígeno molecular singulete en ausencia de aditivos, k_d es la constante de velocidad de decaimiento del oxígeno molecular singulete en presencia de desactivante y k_q es la constante de velocidad total de desactivación de oxígeno molecular singulete.

Tabla 5.3. Tiempos de vida, χ^2 y constante de desactivación del oxígeno excitado a distintas concentraciones de naftoxazol **15**, incluido en 10 mM de β -ciclodextrina, en agua deuterada.

[Naftoxazol 15]/ 10 ⁻⁴ M	τ /ns	χ^2	$k_d/10^7\text{s}^{-1}$
0	52,9±1,8	0,92	1,89±0,06
1,15	39,5±4,0	0,98	2,54±0,26
1,53	35,2±2,5	1,01	2,85±0,20
1,92	35,3±1,1	0,90	2,83±0,09
2,30	32,6±2,3	0,99	3,07±0,25
2,69	30,9±0,5	0,96	3,24±0,05
3,07	29,3±0,1	0,95	3,42±0,01

Los resultados obtenidos se incluyen en la Figura 5.7 y muestran una correlación lineal entre la concentración de complejo de inclusión con la constante de velocidad de desactivación del oxígeno molecular singulete. La constante de desactivación (k_d), se obtiene a partir de los tiempos de vida del oxígeno molecular singulete, los cuales disminuyen cuando la concentración de naftoxazol **15** aumenta (Tabla 5.3). Por lo tanto el naftoxazol **15** incluido en β -ciclodextrina, es capaz de desactivar eficientemente al oxígeno excitado, en agua deuterada.

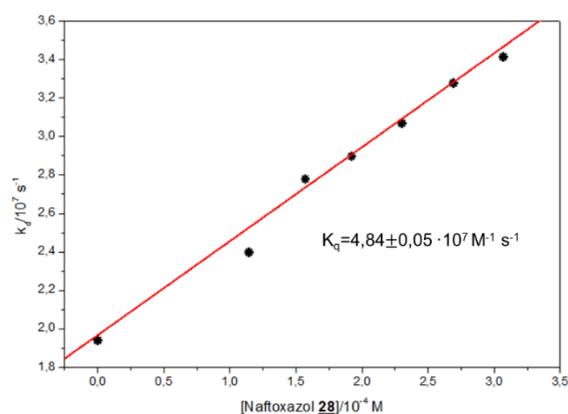


Figura 5.8: Gráfico de Stern-Volmer para la reacción entre el complejo de inclusión formado por el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina (10 mM) con el oxígeno molecular singlete, en agua deuterada.

Existen compuestos aromáticos que reaccionan con el oxígeno molecular singlete principalmente a través de la vía química para producir el correspondiente 9,10-endoperóxido no fluorescente, el 9,10-Difenilantraceno y el 9,10-dimetilantraceno reaccionan con oxígeno molecular singlete con constantes de velocidad $k_q=2 \cdot 10^7 - 9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $1,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, en solventes orgánicos y en agua.¹²⁸⁻¹³² La constante de desactivación de oxígeno excitado en el sistema naftoxazol **15**/ β -ciclodextrina es de $4,84 \pm 0,05 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en agua deuterada y $k_q=1,07 \pm 1,54 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura AN 3.11). Por lo tanto el naftoxazol **15** desactiva al oxígeno excitado, en el orden de magnitud de los compuestos aromáticos 9,10-difenilantraceno y 9,10-dimetilantraceno, cuando se encuentra en agua deuterada.

CAPITULO 6

Conclusiones

Los derivados ariloxazinonas y ariloxazoles forman complejos de inclusión con β -ciclodextrina. Específicamente los naftoxazoles **12** y **13** son incluidos en γ -ciclodextrina y el naftoxazol **13** forma compuestos de inclusión con SO_3H - β -ciclodextrina.

La formación de los complejos de inclusión de ariloxazinonas y ariloxazoles con β -ciclodextrina, permitió aumentar la solubilidad en fase acuosa y fue posible estudiar su comportamiento fotofísico. En general se observaron, para los complejos de inclusión formados, que las posiciones de los máximos de emisión presentan corrimientos hipsocrómicos, respecto a los máximos de emisión de las moléculas no-complejadas, este comportamiento se debe principalmente al carácter apolar de la cavidad de las ciclodextrinas.

Todos los complejos de inclusión estudiados tienen estequiometría 1:1, de acuerdo a la ecuación de Benessi-Hildebrand y al método de solubilidad de fases. Las constantes de inclusión obtenidas se encuentran en el orden de 10^2 M^{-1} . Los valores del cambio de energía libre, muestran que la formación de los complejos de inclusión es favorecida termodinámicamente, por lo que tanto las ariloxazinonas como los ariloxazoles son moléculas afines para formar complejos de inclusión con β -ciclodextrina.

Para las oxazinonas **2**, **9** y **10**, la constante de inclusión disminuye con el aumento de temperatura y el proceso de inclusión es exotérmico. Además, los valores del cambio de entropía son negativos ($\Delta S^\circ < 0$), lo cual indica que el proceso de inclusión es controlado por la entalpía y consecuentemente son las interacciones oxazinona/ β -ciclodextrinas las que estabilizan al complejo de inclusión.

Las oxazinonas **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** y **8**, presentaron un aumento de la constante de inclusión a temperaturas altas y el proceso de inclusión es endotérmico. Se observó además, que los cambios de entropía son positivos ($\Delta S^\circ > 0$), y para estos compuestos el proceso de inclusión es controlado por la entropía y por lo tanto el efecto hidrofóbico permite la inclusión.

Los arilnaftoxazoles **11**, **13- γ** y **14**, tienen valores de entalpía ($\Delta H^\circ > 0$) y entropía ($\Delta S^\circ > 0$) positivos, por lo tanto el proceso de inclusión es endotérmico y controlado por la entropía. Finalmente el arilnaftoxazol **12** incluido en β -ciclodextrina tiene entalpía negativa ($\Delta H^\circ < 0$) y entropía positiva ($\Delta S^\circ > 0$), como ΔH° aporta más a la estabilidad del complejo que $T\Delta S^\circ$, el proceso de inclusión está controlado por la entalpía.

Los estudios de anclaje molecular (*docking*) para las oxazinonas y ariloxazoles cuando forman complejos de inclusión con β -ciclodextrina con estequiometría 1:1, concordaron con los resultados experimentales e indican que las interacciones, principalmente de puentes de hidrogeno, favorecen la inclusión de la molécula dentro de la β -ciclodextrina y aportan en la estabilización del complejo de inclusión.

La dinámica molecular para cada complejo de inclusión muestra que las moléculas permanecen dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina y no se observan cambios en la configuración del complejo durante 10 ns.

Los cálculos termodinámicos, permiten concluir que MM/PBSA, es un buen método para predecir las moléculas (ariloxazinonas y ariloxazoles) que presentan mayor afinidad con la β -ciclodextrina. También, los resultados obtenidos por esta metodología correlacionan positivamente con los experimentales.

Se determinó que cuando naftoxazol **13** forma complejos de inclusión con SO_3H - β -ciclodextrina, presenta un amplio espectro de emisión que abarca gran

parte del espectro electromagnético visible, obteniéndose luz blanca en medio acuoso y en fase sólida. Este comportamiento se debe a un proceso de transferencia intermolecular de protones, que involucra el protón del grupo sulfonato de la ciclodextrina modificada, con el átomo de nitrógeno del sustituyente quinolina del naftoxazol **13**.

El complejo de inclusión entre el naftoxazol **15** y la β -ciclodextrina reacciona en medio acuoso con oxígeno molecular singulete, generando compuestos fluorescentes y por lo tanto es propuesto como una posible sonda fluorescente para la detección de oxígeno molecular singulete en agua.

Bibliografía

1. Kurkov, Sergey V. y Thorsteinn Loftsson, **2013**, Cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics* 453(1): 167-180.
2. Fujishima, N., Kusaka, K., Umino, T., Urushinata, T. y Terumi, K., **2001**, Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. Japanese Patent JP, 136, 898.
3. Bhardwaj R., Dorr RT, Blanchard J., **2000**, Approaches to Reducing Toxicity of Parenteral Anticancer Drug Formulations Using Cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54:233-239.
4. Holland L., Rizzi G., Malton P., **1999**, Cosmetic compositions comprising cyclic oligosaccharides and fragrance. PCT International Application WO 67,716.
5. Lezcano, M., Al-Soufi, W., Novo, M., Rodríguez-Núñez, E. y Tato, J. V., **2002**, Complexation of several benzimidazole-type fungicides with α - and β -cyclodextrins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1):108-112.
6. Dufossé, L., Souchon, I., Feron, G., Latrasse, A. y Spinnler, H. E., **1999**, In Situ Detoxification of the Fermentation Medium during γ -Decalactone Production with the Yeast *Sporidiobolus salmonicolor*. *Biotechnology Progress*, 15(1):135-139.
7. Hedges A. R., **1998**, Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical Review*, 98:2035-2044.
8. Davis M. E. y Brewster M. E., **2004**, Cyclodextrin-based Pharmaceutics: Past, Present and Future. *Nature Review*, 3:1023-1035.
9. Gan, Y., Zhang, Y., Xiao, C., Zhou, C. y Zhao, Y., **2011**, A novel preparation of methyl- β -cyclodextrin from dimethyl carbonate and β -cyclodextrin. *Carbohydrate Research*, 346(3):389-392.

10. Jain, A. S., Date, A. A., Pissurlenkar, R. R., Coutinho, E. C. y Nagarsenker, M. S., **2011**, Sulfobutyl ether β -Cyclodextrin (SBE7 β -CD) carbamazepine complex: preparation, characterization, molecular modeling, and evaluation of in vivo anti-epileptic activity. *AAPS PharmSciTech*, 12(4):1163-1175.
11. Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannell, L. y Uekama, K., **1986**, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 29(1):73-82.
12. C. N. Murthy y K. E. Geckeler, **2001**, The Water-soluble β -cyclodextrin–[60]fullerene Complex. *Chemical Communication*:13, 1194-1195.
13. Noël, S., Léger, B., Ponchel, A., Philippot, K., Denicourt-Nowicki, A., Roucoux, A. y Monflier, E., **2014**, Cyclodextrin-based systems for the stabilization of metallic (0) nanoparticles and their versatile applications in catalysis. *Catalysis Today*, 235:20-32.
14. Matsuzawa, Y., Tamura, S. I., Matsuzawa, N. y Ata, M., **1994**, Light stability of a β -cyclodextrin inclusion complex of a cyanine dye. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions*, 90(23):3517-3520.
15. Roy, D., Mondal, S. K., Sahu, K., Ghosh, S., Sen, P. y Bhattacharyya, K., **2005**, Temperature dependence of anisotropy decay and solvation dynamics of coumarin 153 in γ -cyclodextrin aggregates. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(33):7359-7364.
16. Butterfield M. T., Agbaria A. Rezik y Warner M. Isiah, **1996**, Extraction of Volatile PAHs from Air by Use of Solid Cyclodextrin. *Analytical Chemistry*, 68:1187-1190.
17. Bicchì, C., Blumberg, L. M., Rubiolo, P. y Cagliero, C., **2014**, General retention parameters of chiral analytes in cyclodextrin gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, 1340:121-127.
18. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. y Khar, R. K., **2005**, Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2):329-357.

19. Lemp, E., Cañete, A., Günther, G., Pizarro, N. y Zanocco, A. L., **2008**, Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by aryloxazinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199(2):345-352.
20. Nonell, S., Ferreras, L. R., Cañete, A., Lemp, E., Günther, G., Pizarro, N. y Zanocco, A. L., **2008**, Photophysics and photochemistry of naphthoxazinone derivatives. *The Journal of organic chemistry*, 73(14): 5371-5378.
21. Curitol, M., Ragas, X., Nonell, S., Pizarro, N., Encinas, M. V., Rojas, P. y Zanocco, A. L., **2013**, Solvent and media effects on the photophysics of naphthoxazole derivatives. *Photochemistry and photobiology*, 89(6):1327-1334.
22. Ruiz-González, R., Zanocco, R., Gidi, Y., Zanocco, A. L., Nonell, S. y Lemp, E., **2013**, Naphthoxazole-Based Singlet Oxygen Fluorescent Probes. *Photochemistry and photobiology*, 89(6):1427-1432.
23. Fayed, T. A., **2004**, Probing of Micellar and Biological Systems Using 2-(p-dimethylaminostyryl) benzoxazole: An Intramolecular Charge Transfer Fluorescent Probe. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 236:171-177.
24. Åstrand, P. O., Sommer-Larsen, P., Hvilsted, S., Ramanujam, P. S., Bak, K. L. y Sauer, S. P., **2000**, Five-membered rings as diazo components in optical data storage devices: an ab initio investigation of the lowest singlet excitation energies. *Chemical Physics Letters*, 325(1):115-119.
25. Chou, P. T., Cooper, W. C., Clements, J. H., Studer, S. L. y Chang, C. P., **1993**, A comparative study. The photophysics of 2-phenylbenzoxazoles and 2-phenylbenzothiazoles. *Chemical physics letters*, 216(3):300-304.
26. Tanaka, K., Kumagai, T., Aoki, H., Deguchi, M. y Iwata, S., **2001**, Application of 2-(3, 5, 6-trifluoro-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) benzoxazole

and-benzothiazole to fluorescent probes sensing pH and metal cations. *The Journal of organic chemistry*, 66(22):7328-7333.

27. Quaranta, A., Carturan, S. M., Marchi, T., Kravchuk, V. L., Gramegna, F., Maggioni, G. y Degerlier, M., **2010**, Optical and scintillation properties of polydimethyl-diphenylsiloxane based organic scintillators. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 57(2):891-900.
28. Vincze, Á., Halasz, L., Solymosi, J., Ágai, B., Kása, I., Molnar, A. y Sáfrány, Á., **2007**, Development of an extractive-scintillating chromatographic resin for the detection of radioactive isotopes. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 273(3):615-619.
29. Reiser, A., Leyshon, L. J., Saunders, D., Mijovic, M. V., Bright, A., y Bogie, J., **1972**, Fluorescence of aromatic benzoxazole derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 94(7):2414-2421.
30. Valle, J. C., Kasha, M. y Catalán, J., **1997**, Spectroscopy of Amplified Spontaneous Emission Laser Spikes in Phenyloxazoles. Prototype classes". *The Journal of Physical Chemistry A*, 101:3260-3272.
31. Guzow, K., Szabelski, M., Karolczak, J. y Wiczak, W., **2005**, Solvatochromism of 3-[2-(aryl) benzoxazol-5-yl] alanine derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 170(3):215-223.
32. Guzow, K., Szabelski, M., Malicka, J., Karolczak, J. y Wiczak, W., **2002**, Synthesis and photophysical properties of 3-[2-(pyridyl) benzoxazol-5-yl]-L-alanine derivatives. *Tetrahedron*, 58(11):2201-2209.
33. Guzow, K., Szmigiel, D., Wróblewski, D., Milewska, M., Karolczak, J. y Wiczak, W., **2007**, New fluorescent probes based on 3-(2-benzoxazol-5-yl) alanine skeleton—synthesis and photophysical properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*:187(1), 87-96.

34. Park, K. H., Lim, J. T., Song, S., Lee, Y. S., Lee, C. J. y Kim, N., **1999**, Nonlinear optical polymers with novel benzoxazole chromophores: V. Linear and crosslinked polyurethanes using nitrothiophene and nitrophenol as electron acceptors. *Reactive and Functional Polymers*, 40(2):177-184.
35. Hsu, S. L.-C. y Chen, W.-C. **2002**, A novel Positive Photosensitive Polybenzoxazole Precursor for Microelectronic Applications. *Polymer*, 43:6743-6750.
36. Hong, H. W. y Chen, T. M., **2007**, Effect of Substituents on the Photoluminescent and Electroluminescent Properties of Substituted Cyclometalated Iridium (III) Complexes. *Materials Chemistry and Physics*, 101:170-176.
37. Guzow, K., Milewska, M. y Wiczak, W., **2005**, Solvatochromism of 3-[2-(4-diphenylaminophenyl) benzoxazol-5-yl] Alanine Methyl Ester: A New Fluorescence Probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61:1133-1140.
38. Park, S., Kwon, J. E., Kim, S. H., Seo, J., Chung, K., Park, S. Y. y Park, S. Y., **2009**, A white-light-emitting molecule: frustrated energy transfer between constituent emitting centers. *Journal of the American Chemical Society*, 131(39):14043-14049.
39. Wang, S. L., Yeh, T. W. y Ho, T. I., **2006**, Photophysics and Excited-State Proton Transfer of 2'-hydroxy-2-trans-styrylquinoline. *Chemical Physics Letters*, 418:397-401.
40. Midden, W. R. y Wang, S. Y., **1983**, Singlet Oxygen Generation for Solution Kinetics: Clean and Simple. *Journal of the American Chemical Society*, 105:4129-4135.
41. Aubry, J. M., Mandard-Cazin, B., Rougee, M. y Bensasson, R. V., **1995**, Kinetic Studies of Singlet Oxygen [4+ 2]-cycloadditions with Cyclic 1, 3-

- dienes in 28 Solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 117:9159-9164.
42. Kim, S. H., Gwon, S. Y., Bae, J. S. y Son, Y. A., **2011**, The Synthesis and Spectral Properties of a Stimuli-Responsive D- π -A Charge Transfer Dye. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78:234-237.
43. de Silva, A. P., Fox, D. B., Moody, T. S. y Weir, S. M., **2001**, The development of molecular fluorescent switches. *TRENDS in Biotechnology*, 19(1):29-34.
44. Scypinski, S. y Drake, J. M., **1985**, Photophysics of coumarin inclusion complexes with cyclodextrin. Evidence for normal and inverted complex formation. *The Journal of Physical Chemistry*, 89:2432-2435.
45. Le Bris, M. T., **1985**, Synthesis and properties of some 7-dimethylamino-1, 4-benzoxazin-2-ones. *Journal of heterocyclic chemistry*, 22(5):1275-1280.
46. Zhang, H., Zhang, H., Qu, C., Bai, L. y Ding, L., **2007**, Fluorimetric and mass spectrometric study of the interaction of β -cyclodextrin and osthole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 68(3):474-477.
47. Dondon, R. y Fery-Forgues S., **2001**, Inclusion Complex of Fluorescent 4-Hydroxycoumarin Derivatives with Native β -Cyclodextrin: Enhanced Stabilization Induced by the Appended Substituent. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:10715-10722.
48. Abderrazzak Douhal, **2006**, Chemical, Physical and Biological Aspects of Confined Systems, *Cyclodextrin Materials Photochemistry, Photophysics and Photobiology*, Amsterdam, Elsevier, 321p.
49. Connors, K. A., **1997**, The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*, 97(5):1325-1358.

50. Mura P., **2014**, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101:238-250.
51. Benesi H.A. y Hildebrand H. J., **1949**, A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society*, 71:2703-2707.
52. Abdel-Shafi, A. A., **2007**, Inclusion Complex of 2-naphthylamine-6-sulfonate with β -cyclodextrin: Intramolecular Charge Transfer Versus Hydrogen Bonding Effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66:1228-1236.
53. Higuchi, T. y Connors K.A., **1965**, Phase Solubility Techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4:117-212.
54. Hamai Sanyo, **2006**, Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Benzoquinolines in Aqueous Solution, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 79:1039-1045.
55. Onnainty, R., Schenfeld, E. M., Quevedo, M. A., Fernández, M. A., Longhi, M. R. y Granero, G. E., **2012**, Characterization of the hydrochlorothiazide: β -cyclodextrin inclusion complex. Experimental and theoretical methods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(1):206-217.
56. Yan, C., Xiu, Z., Li, X., Teng, H. y Hao, C., **2007**, Theoretical study for quercetin/ β -cyclodextrin complexes: quantum chemical calculations based on the PM3 and ONIOM2 method. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 58(3-4):337-344.
57. Mark, A. E., van Helden, S. P., Smith, P. E., Janssen, L. H. y van Gunsteren, W. F., **1994**, Convergence properties of free energy calculations: Alpha.-cyclodextrin complexes as a case study. *Journal of the American Chemical Society*, 116(14):6293-6302.

58. Chen Wei y Gilson K. M., **2004**, Calculation of Cyclodextrin Binding Affinities: Energy, Entropy, and Implications for Drug Design. *Biophysical Journal*, 87:3035-3049.
59. Liu Lei, and Qing-Xiang Guo, **2004**, Use of Quantum Chemical Methods to Study Cyclodextrin Chemistry. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 50:95-103.
60. Gschwend, Daniel A., Andrew C. Good, and Irwin D. Kuntz., **1996**, Molecular Docking Towards Drug Discovery. *Journal of Molecular Recognition*, 9:175-186.
61. A. Kukol, **2008**, *Molecular Modeling of Proteins*. Hatfield UK, Humana Press, 365-366.
62. Still WC, Tempczyk A, Hawley RC, Hendrickson T., **1990**, Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 112:6127-6129.
63. Gohlke H, Kiel C, Case DA., **2003**, Insights Into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-Ralgds Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 330:891-913.
64. Weiser, J., Shenkin, P. S. y Still, W. C., **1999**, Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *Journal of Computational Chemistry*, 20:217-230.
65. Loftsson, T., Masson, M. y Brewster, M. E., **2004** Self-association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical sciences*, 93:1091-1099.
66. Loukas, Y. L., **1997**, Multiple Complex Formation of Fluorescent Compounds with Cyclodextrins: Efficient Determination and Evaluation of The Binding Constant with Improved Fluorometric Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101:4863-4866.

67. Moffett, R. B., **1966**, 2H-1, 4-Benzoxazin-2-ones. *Journal of medicinal chemistry*, 9:475-478.
68. Zajac, M.; Hrobárik, P.; Magdolen, P.; Foltínová, P.; Zahradník, P., **2008**, Donor- π -acceptor Benzothiazole-Derived Dyes with an Extended Heteroaryl-Containing Conjugated System: Synthesis, DFT Study and Antimicrobial Activity. *Tetrahedron*, 64:10605-10618.
69. Wu, J., Du, X., Ma, J., Zhang, Y., Shi, Q., Luo, L. y Hu, D., **2014**, Preparation of 2, 3-dihydroquinazolin-4 (1 H)-one derivatives in aqueous media with β -cyclodextrin-SO₃H as a recyclable catalyst. *Green Chemistry*, 16(6):3210-3217.
70. Tayade, Y. A., Patil, D. R., Wagh, Y. B., Jangle, A. D. y Dalal, D. S., **2015**, An efficient synthesis of 3-indolyl-3-hydroxy oxindoles and 3, 3-di (indolyl) indolin-2-ones catalyzed by sulfonated β -CD as a supramolecular catalyst in water. *Tetrahedron Letters*, 56(5):666-673.
71. Eaton, D. F., **1988**, Reference materials for fluorescence measurement. *Pure and Applied Chemistry*, 60:1107-1114.
72. Crosby, G.A. y J.N. Demas, **1971**, Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *The Journal of Physical Chemistry*, 75:991-1024.
73. Adachi, M., Mikami, B., Katsube, T. y Utsumi, S., **1998**, Crystal structure of recombinant soybean β -amylase complexed with β -cyclodextrin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31):19859-19865.
74. Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.

- Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, , T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**, (Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998).
75. Jacquemin, D., Wathelet, V., Perpète, E. A. y Adamo, C., **2009**, Extensive TD-DFT Benchmark: Singlet-Excited States of Organic Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5:2420-2435.
76. Bagno A., Rastrelli F. y Saielli G., **2006**, Toward the Complete Prediction of the ¹H and ¹³C NMR Spectra of Complex Organic Molecules by DFT Methods: Application to Natural Substances. *Chemistry-a European Journal*, 12:5514-5525.
77. Guthrie, J. P., **2001**, Use of DFT Methods for the Calculation of the Entropy of Gas Phase Organic Molecules: An Examination of the Quality of Results from a Simple Approach. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105:8495-8499.
78. Tirado-Rives, J. y Jorgensen, W. L., **2008**, Performance of B3LYP Density Functional Methods for a Large Set of Organic Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4:297-306.
79. Rablen, P. R., Lockman, J. W. y Jorgensen, W. L., **1998**, Ab Initio Study of Hydrogen-Bonded Complexes of Small Organic Molecules with Water. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102:3782-3797.
80. D.A. Case, J.T. Berryman, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J.

- Wang, R.M. Wolf, X. Wu, D.M. York and P.A. Kollman, **2015**, AMBER 2015, University of California, San Francisco.
81. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. y Kollman, P. A., **1993**, A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: the RESP Model. *The Journal of Physical Chemistry*, 97:10269-10280.
82. Dupradeau, F. Y., Pigache, A., Zaffran, T., Savineau, C., Lelong, R., Grivel, N. y Cieplak, P., **2010**, The REd. Tools: Advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(28), 7821-7839.
83. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. y Olson, A. J., **1998**, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14):1639-1662.
84. Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M. y Kollman, P. A., **1996**, A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules, *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117:5179-5197. *Journal of the American Chemical Society*, 118(9):2309-2309.
85. Kirschner, K. N., Yongye, A. B., Tschampel, S. M., González-Outeiriño, J., Daniels, C. R., Foley, B. L. y Woods, R. J., 2008, GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. Journal of Computational Chemistry*, 29(4):622-655.
86. Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K., **1996**, VMD: Visual Molecular Dynamics". *Journal of Molecular Graphics*, 14:33-38.
87. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A. y Case D. A., **2004**, Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry*, 25:1157-1174.

88. Hou T., Wang J., Li Y. y Wang W., **2010**, Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51:69-82.
89. Foster J. P.; Weinhold F., **1980**, Natural Hybrid Orbitals. *Journal of American Chemical Society*, 102:7211-7218.
90. Reed A. E.; Weinhold F, **1983**, Natural Bond Orbital Analysis of Near-Hartree–Fock Water Dimer. *Journal of Chemical Physics*, 78:4066-4073.
91. Reed A. E., Weinstock R. B., Weinhold, F, **1985**. Natural population analysis. *Journal of Chemical Physics*, 83:735-746.
92. NBO 6.0, E. D. Glendening, J. K. Badenhoop, A. E. Reed, J. E. Carpenter, J. A. Bohmann, C. M. Morales, C. R. Landis, and F. Weinhold, **2013**, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison.
93. Álvaro Cañete, **2003**, Síntesis y Estudio de las Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de Oxazinonas Fusionadas a Anillos Aromáticos, Tesis Doctorado en Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 143p.
94. Cyrański M. y Tadeusz Marek Krygowski, **1996**. Separation of the Energetic and Geometric Contributions to the Aromaticity of π -electron Carbocyclics. Part V. Analysis of the Aromatic Character of aza-analogues of Benzenoid Hydrocarbons. *Tetrahedron*, 52(43):13795-13802.
95. Krygowski Tadeusz Marek y Michal Cyrański, **1996**, Separation of the energetic and geometric contributions to the aromaticity. Part IV. A general model for the π -electron systems. *Tetrahedron*, 52(30):10255-10264.
96. Tadeusz Marek Krygowski y Ksawery Cyranski M., **2001**, Structural aspects of aromaticity. *Chemical Reviews*, 101(5), 1385-1420.

97. Van Duuren Benjamin L, **1963**, Effects of the Environment on the Fluorescence of Aromatic Compounds in Solution. *Chemical Reviews* 63(4):325-354.
98. Dahiya, P., Kumbhakar, M., Mukherjee, T. y Pal, H., **2005**, Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes. *Chemical Physics Letters*, 414(1):148-154.
99. Samanta, A. y Fessenden, R. W., **2000**, Excited-state Dipole Moment of 7-Aminocoumarins as Determined from Time-Resolved Microwave Dielectric Absorption Measurements. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104:8577-8582.
100. Lopez Arbeloa, T., Lopez Arbeloa, F., Tapia, M. J. y Lopez Arbeloa, I., **1993**, Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(18):4704-4707.
101. Hamai, S., **2004**. Effects of Cyclodextrins on the Fluorescence of 2-Methylnaphth [2, 3-d] oxazole in Aqueous Solution. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 77(8):1459-1464.
102. Krishnamoorthy, G. y Dogra, S. K., **1999**. Dual fluorescence of 2-(4'-N, N-dimethylaminophenyl) benzimidazole: effect of β -cyclodextrin and pH. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 123:109-119.
103. Bayliss, Noel S. y Elon G. McRae, **1954**, Solvent effects in organic spectra: dipole forces and the Franck–Condon principle. *The Journal of Physical Chemistry*, 58(11):1002-1006.
104. Gidi Yasser, **2011**, Síntesis y Estudio Fotofísico de Derivados Vinílicos del Naftoxazol, memoria de químico, Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 124p.

105. Rettig W., Vogel M., Lippert E. y Otto H., **1986**, The dynamics of adiabatic photoreactions as studied by means of the time structure of synchrotron radiation. *Chemical physics*, 108(3):381-390.
106. Chagnenet P., Plaza P., Martin M. M.y Meyer Y. H., **1997**, Role of intramolecular torsion and solvent dynamics in the charge-transfer kinetics in triphenylphosphine oxide derivatives and DMABN. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(44):8186-8194.
107. Del Valle, E. M., **2004**, Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9):1033-1046.
108. Niya A Todorova y Schwarz Frederick P., **2007**, The role of water in the thermodynamics of drug binding to cyclodextrin. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 39(7):1038-1048.
109. Wagner, B. D., **2009**, The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems. *Molecules*,14(1):210-237.
110. Rekharsky, M. V. y Inoue, Y., **1998**, Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical reviews*, 98(5):1875-1918.
111. Ross, P. D. y Rekharsky, M. V., **1996**, Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. *Biophysical journal*,71(4):2144-2154.
112. Biedermann, F., Nau, W. M. y Schneider, H. J., **2014**, The Hydrophobic Effect Revisited—Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(42):11158-11171.
113. Reyes, C. M.y Kollman, P. A., **2000**, Structure and Thermodynamics of RNA-Protein Binding: Using Molecular Dynamics and Free Energy Analyses to Calculate the Free Energies of Binding and Conformational Change. *Journal of molecular biology*, 297:1145-1158.

114. Chen W., Chang C. E. y Gilson M. K., **2004**, Calculation of Cyclodextrin Binding Affinities: Energy, Entropy, and Implications for Drug Design. *Biophysical Journal*, 87:3035-3049.
115. Park, S., Kwon, J. E., Kim, S. H., Seo, J., Chung, K., Park, S. Y. y Park, S. Y., **2009**, A white-light-emitting molecule: frustrated energy transfer between constituent emitting centers. *Journal of the American Chemical Society*, 131(39):14043-14049.
116. Wang, S. L., Yeh, T. W. y Ho, T. I., **2006**, Photophysics and excited-state proton transfer of 2'-hydroxy-2-trans-styrylquinoline. *Chemical physics letters*, 418(4):397-401.
117. Jayaramulu, K., Kanoo, P., George, S. J. y Maji, T. K., **2010**, Tunable emission from a porous metal-organic framework by employing an excited-state intramolecular proton transfer responsive ligand. *Chemical Communications*, 46(42):7906-7908.
118. Gelb, R. I., Schwartz, L. M., Bradshaw, J. J. y Laufer, D. A., **1980**, Acid dissociation of cyclohexaamylose and cycloheptaamylose. *Bioorganic Chemistry*, 9(3):299-304.
119. Gelb, R. I., Schwartz, L. M. y Laufer, D. A., **1982**, Acid dissociation of cyclooctaamylose. *Bioorganic Chemistry*, 11(3):274-280.
120. Kesavan, V., Bonnet-Delpon, D. y Bégué, J. P., **2000**, Fluoro alcohol as reaction medium: one-pot synthesis of β -hydroxy sulfoxides from epoxides. *Tetrahedron Letters*, 41(16):2895-2898.
121. Redmond R. W. y Kochevar I. E., **2006**, Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review. *Photochemistry and Photobiology*, 82(5):1178-1186.
122. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O. y Korbélik, M., **2011**, Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4):250-281.

123. Gollnick K. y Griesbeck A., **1985**, Singlet oxygen photooxygenation of furans: Isolation and reactions of (4+ 2)-cycloaddition products (unsaturated sec.-ozonides). *Tetrahedron*, 41(11):2057-2068.
124. Pedersen, S. K., Holmehave, J., Blaikie, F. H., Gollmer, A., Breitenbach, T., Jensen, H. H. y Ogilby, P. R., **2014**, Aarhus Sensor Green: A Fluorescent Probe for Singlet Oxygen. *The Journal of organic chemistry*, 79(7):3079-3087.
125. Wu, H., Song, Q., Ran, G., Lu, X. y Xu, B., **2011**, Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1):133-141.
126. Umezawa, N., Tanaka, K., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. y Nagano, T., **1999**, Novel fluorescent probes for singlet oxygen. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(19):2899-2901.
127. Kim, S., Fujitsuka, M. y Majima, T., **2013**, Photochemistry of singlet oxygen sensor green. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(45):13985-13992.
128. Corey, E. J. y Taylor, W. C., **1964**, A study of the peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 86(18):3881-3882.
129. Usui, Y., **1973**, Determination of quantum yield of singlet oxygen formation by photosensitization. *Chemistry Letters*, 2(7):743-744.
130. Wilkinson, F. y Brummer, J. G., **1981**, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10(4):809-999.
131. Wilkinson, F. y Brummer, J. G., **1981**, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10(4):809-999.

132. Wilkinson, F., Helman, W. P. y Ross, A. B., **1995**, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 24(2):663-677.

ANEXO:

PARTE I: GENERALIDADES

PARTE II: ARILOXAZINONAS

PARTE III: ARILOXAZOLES

ANEXO PARTE I: GENERALIDADES

AN 1.1: Docking

Para cada uno de los complejos de inclusión, se procedió a determinar la conformación más estable del complejo de inclusión formado entre las ariloxazinonas y ariloxazoles con β -ciclodextrina. Dado que los resultados experimentales dan cuenta, de que la estequiometría del complejo de inclusión es de tipo 1:1, los cálculos de docking se realizaron considerando esa geometría.

Para discriminar la conformación más estable se empleó como criterio aquella pose que tuviera menor puntaje de *docking*. Las Tabla AN 1.6 y AN 2.5, muestran los puntajes de *docking* para cada complejo de inclusión, de un total de total de 200 ciclos por cálculo, encontrándose que las energías de *docking* son similares en magnitud y se encuentran en el rango de -3,0 a -5,3 kcal/mol.

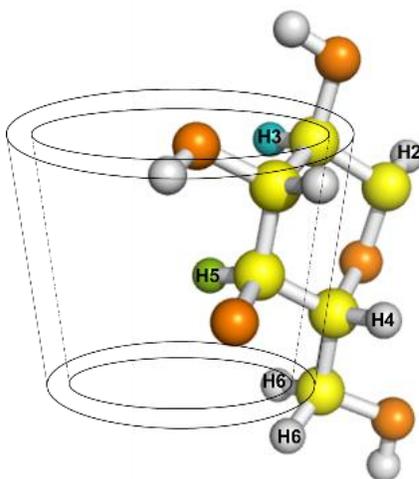


Figura AN 1.1. Representación de la β -ciclodextrina. Los colores representan en amarillo: carbono; blanco, verde y celeste: hidrógeno y anaranjado: oxígeno.

Para distinguir los grupos de la β -ciclodextrina que interactúan con las moléculas huésped se clasificaron los grupos hidroxilos en primarios y secundarios (Figura 5.1). Los grupos hidroxilos primarios, constituyen el radio de cavidad de menor tamaño, mientras que los grupos hidroxilos secundarios conforman el radio de cavidad de mayor tamaño.

AN 1.2: Dinámica Molecular

Los cálculos computacionales de dinámica molecular representan una aproximación del comportamiento de un sistema en el tiempo. Las simulaciones usadas comprenden una etapa de minimización, equilibrio y producción. Durante 10 ns, se estudió el comportamiento de los complejos de inclusión de oxazinonas y naftoxazoles con β -ciclodextrina.

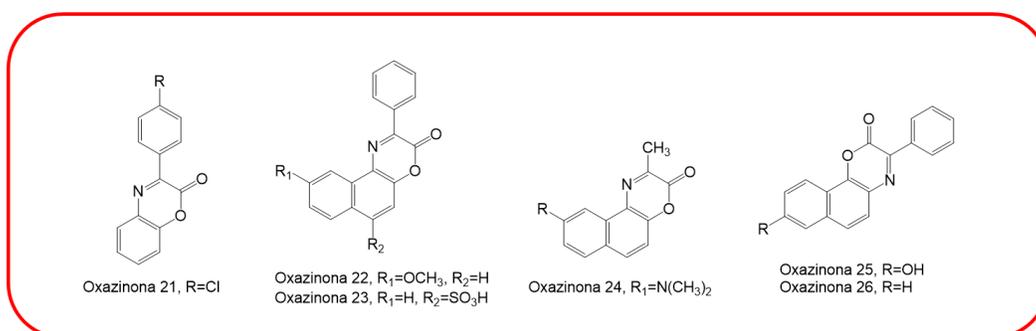
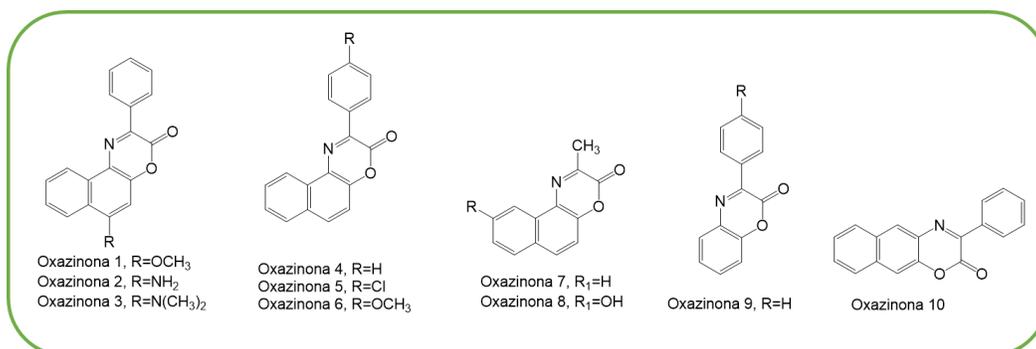
Para analizar el comportamiento de las oxazinonas y naftoxazoles en β -ciclodextrina se analizó el parámetro RMSD (raíz de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas) en el tiempo. RMSD, mide la desviación de las coordenadas en las que se encuentran los átomos, respecto a una coordenada de referencia. RMSD=0 indica que no existe una desviación del objetivo respecto a la referencia, es decir hay una superposición perfecta. El RMSD, es definido como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^N [m_i \cdot (X_i - Y_i)^2]}{M}} \quad (\text{Ecuación AN 1.1})$$

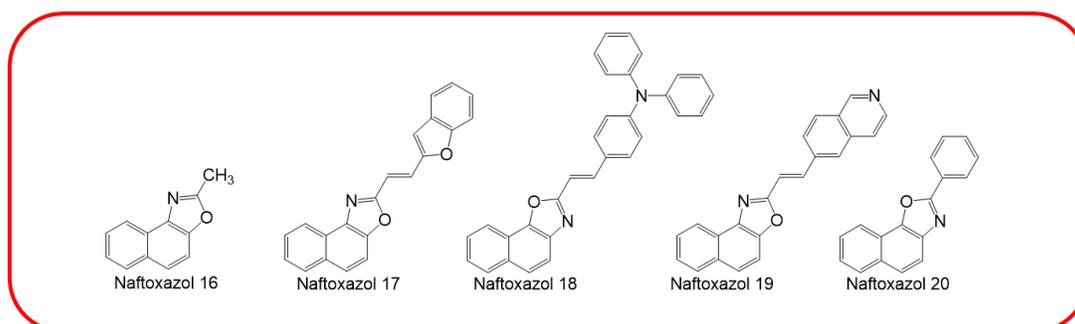
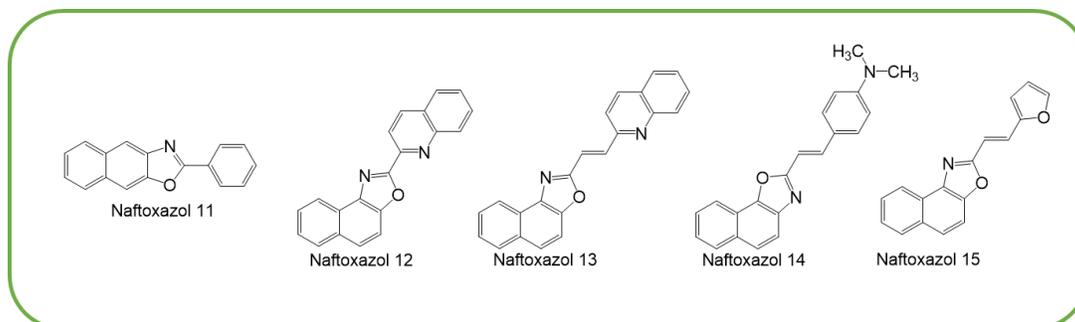
Donde N es el número de átomos, m_i es la masa del átomo i, X_i es el vector de coordenadas para el átomo objetivo i, Y_i es el vector de coordenadas para el átomo de referencia i y M es la masa total.

Los RMSD calculados para las oxazinonas y naftoxazoles durante los 10ns de dinámica fueron comparados respecto a la estructura inicial con que comenzó la etapa de producción de la dinámica.

AN 1.3: Estructura molecular de las ariloxazinonas. Recuadro verde: ariloxazinonas incluidas en la tesis, recuadro rojo: ariloxazinonas medidas pero no incluidas en la tesis.



AN 1.4: Estructura molecular de las ariloxazoles. Recuadro verde: ariloxazoles incluidas en la tesis, recuadro rojo: ariloxazoles medidas pero no incluidas en la tesis.



AN 1.5. Longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$), de las ariloxazinonas (**21** al **26**) y ariloxazoles (**16** al **20**) en solventes con distinta constante dieléctrica, ϵ (benceno, acetonitrilo y agua) y en β - y/o γ -ciclodextrina.

Molécula	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ Benceno ($\epsilon=2,3$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ Acetonitrilo ($\epsilon=41,1$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ Agua ($\epsilon=80,0$)	$\lambda_{m\acute{a}x}^{emis}/nm$ complejo
16-β	343	341	337	339
17-β	443	441	432	454
18-γ	460	516	510	493
19-β	456	460	474	448
20-β	376	386	394	390
21-β	424	422	438	440
22-β	487	523	494	492
23-β	-	480	484	488
24-β	559	643	466	468
25-β	488	502	506	508
26-β	478	490	510	498

AN 1.6. Constantes de inclusión (K) y parámetros termodinámicos en condiciones estándar, para las ariloxazinonas (**21** a **26**) y ariloxazoles (**16** a **20**) incluidas en β - y/o γ -ciclodextrina.

Molécula	K (M ⁻¹)	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)	ΔH° (kcal·mol ⁻¹)	ΔS° (cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	T ΔS° (kcal·mol ⁻¹)
16-β	20±6,2	-1,8±0,3	-3,7±1,0	-6,4±0,2	-1,9±0,6
17-β	142±5,6	-2,9±0,5	2,6±0,3	18,7±1,0	5,6±0,3
18-γ	104±5,5	-3,4±0,2	-12,8±2,1	-31,3±1,5	-9,3±0,4
19-β	450±5,5	-3,6±0,3	15,3±1,5	63,5±1,7	18,9±0,4
20-β	881±5,9	-4,0±0,3	6,6±0,4	35,5±1,5	10,6±0,6
21-β	309±0,4	-3,2±0,2	-21,8±1,8	-0,06±0,02	-18,6±0,1
22-β	139±0,2	-2,9±0,1	-22,1±1,6	-64,5±1,4	-19,2±0,4
23-β	847±0,4	-3,9±0,2	-19,7±1,3	-52,7±2,0	-15,7±0,6
24-β	92±0,4	-2,7±0,2	3,9±0,4	22,2±1,0	6,6±0,3
25-β	378±0,4	-2,7±0,2	-45,7±2,0	-144±1,5	-42,9±0,4
26-β	308±0,2	-3,5±0,3	-11,7±1,0	-27,5±1,5	-8,2±0,4

PARTE II: ARILOXAZINONAS

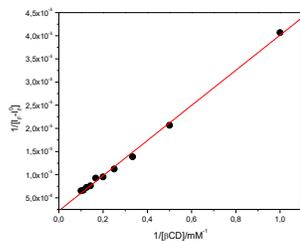
AN 2.1. Rendimientos Cuánticos de fluorescencia para las oxazinonas **1-10**, en solventes representativos de una escala de polaridad (ϵ =constante dieléctica).

Oxazinona	ϕ_F			
	Hexano ^a $\epsilon=1,88$	Benceno $\epsilon=2,3$	CH ₃ CN $\epsilon=41,1$	CH ₃ OH $\epsilon=33$
<u>1</u>	0,06	0,33	0,52	0,65
<u>2</u>	0,50	0,68	0,60	0,47
<u>3</u>	0,72	0,52	0,46	0,15
<u>4</u>	0,12	0,46	0,56	0,50
<u>5</u>	0,28	0,59	0,60	0,65
<u>6</u>	0,10	0,38	0,37	0,31
<u>7</u>	0,04	0,18	0,51	0,56
<u>8</u>	--	0,40	0,14	<,0003
<u>9</u>	--	< 0,003	< 0,003	<0,006
<u>10</u>	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003

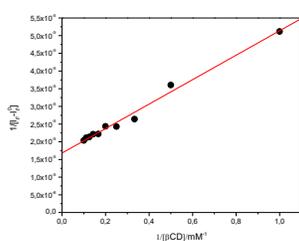
^a Datos tomados de Tesis doctoral Álvaro Cañete.

AN 2.2. Gráficos de Benesi-Hildebrand para complejos de inclusión con estequiometría 1:1, formados entre oxazinonas y β -ciclodextrina, a 298K.

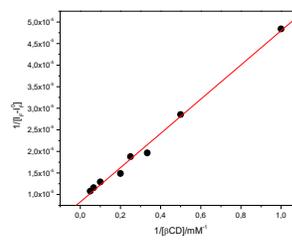
oxazinona 1



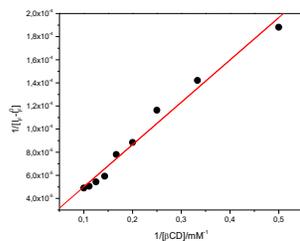
oxazinona 2



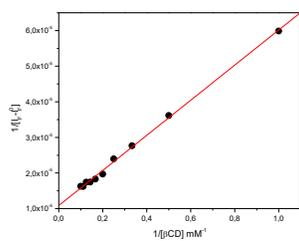
oxazinona 3



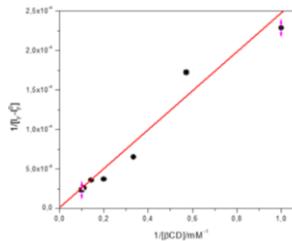
oxazinona 6



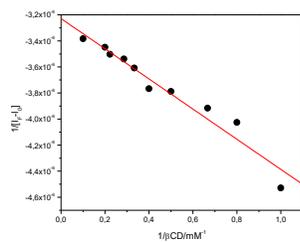
oxazinona 7



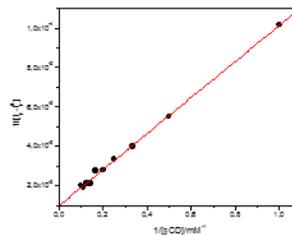
oxazinona 8



oxazinona 9

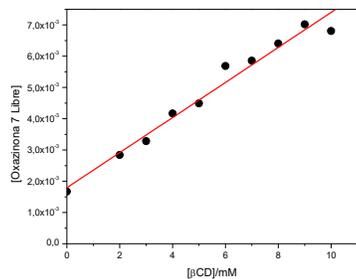


oxazinona 10

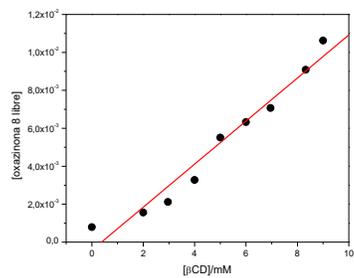


AN 2.3. Gráficos del método de solubilidad de fases. Concentración libre de oxazinona versus concentración de β -ciclodextrina, para complejos de inclusión con estequiometría 1:1 a 298 K.

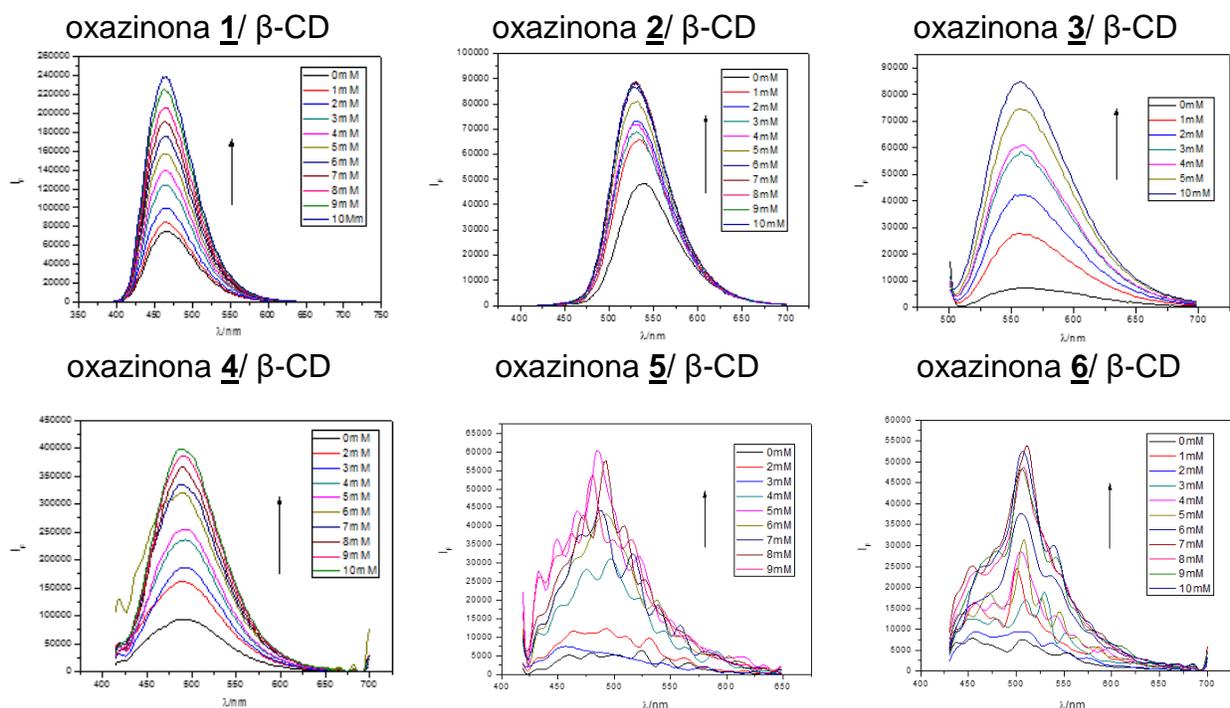
Oxazinona 5



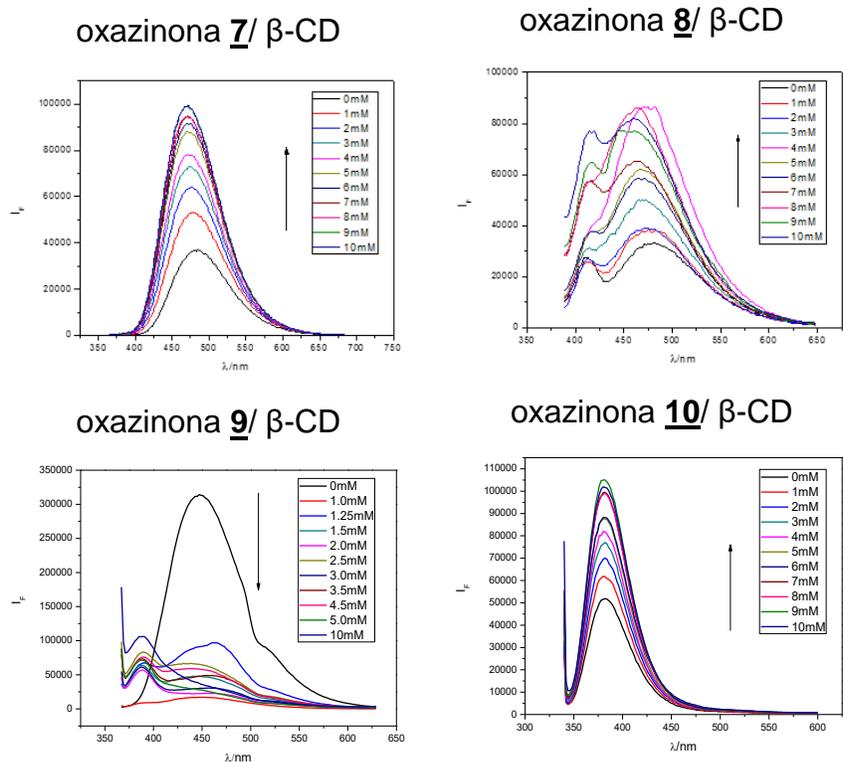
Oxazinona 6



AN 2.4. Espectros de emisión de fluorescencia (I_F) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de β -CD, de 0-10mM para los complejos de inclusión entre las oxazinonas **1-10** en β -CD, a temperatura 298K.



*La flecha indica el aumento de la intensidad de fluorescencia, para cada complejo de inclusión.

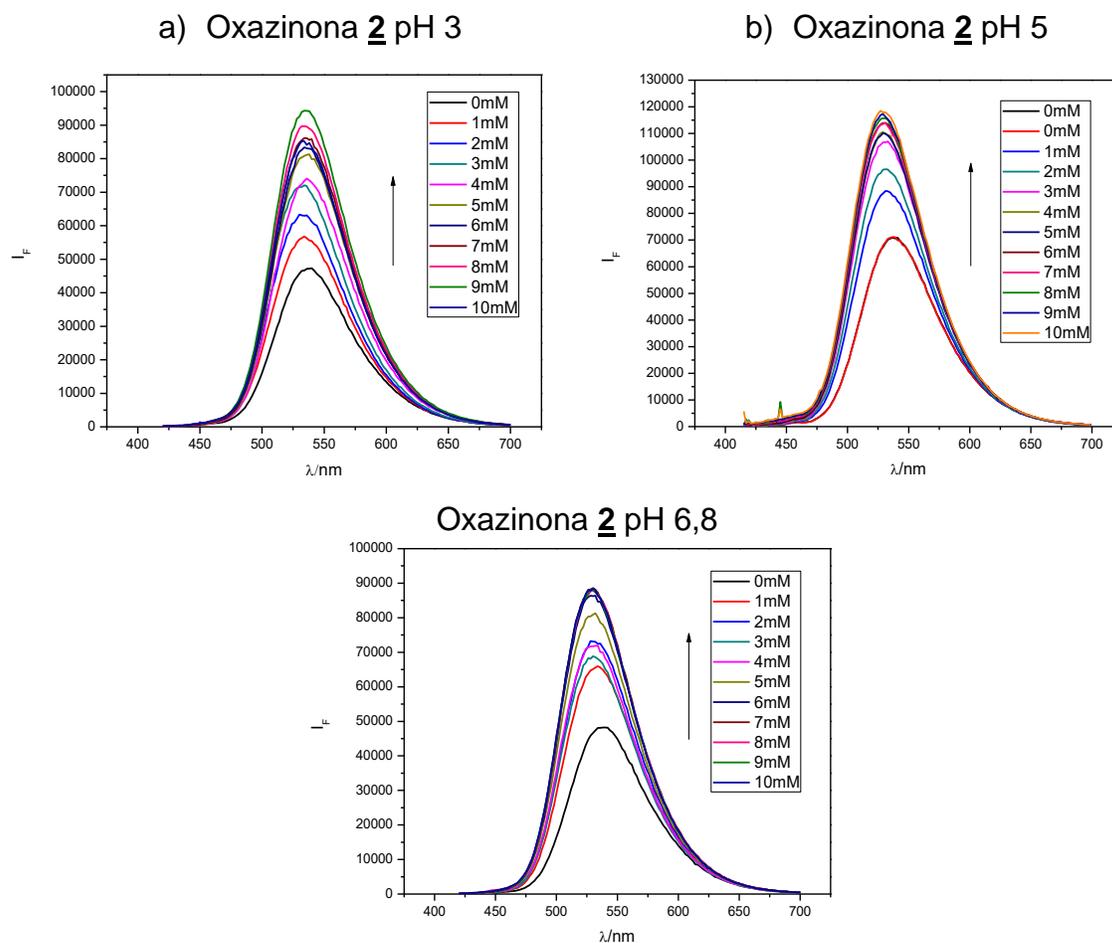


*La flecha indica el aumento de la intensidad de fluorescencia, para cada complejo de inclusión.

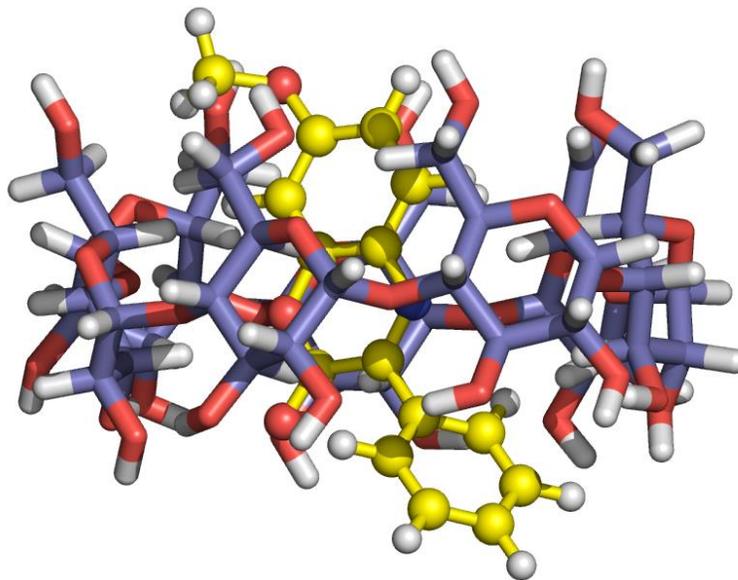
AN 2.5. Constantes de Inclusión a distintas temperaturas, para las oxazinonas **1-10** con estequiometría 1:1.

Oxazinona	T/K	K/M ⁻¹	Oxazinona	T/K	K/M ⁻¹	Oxazinona	T/K	K/M ⁻¹
<u>1</u>	293	1	<u>2</u>	298	486	<u>3</u>	288	552
	298	58		303	387		293	604
	303	154		308	319		303	1241
	308	287		313	119		308	2089
	313	968		318	33		313	2191
<u>4</u>	293	499	<u>5</u>	293	84	<u>6</u>	293	10
	298	515		298	238		298	36
	303	624		303	759		303	50
	308	979		308	2987		308	57
	-	-		313	3643		313	107
<u>7</u>	218	220	<u>8</u>	293	30	<u>9</u>	288	801
	303	568		298	46		298	279
	308	2014		303	-		303	463
	318	3838		308	177		313	332
<u>10</u>	298	107						
	303	96						
	308	73						
	318	65						

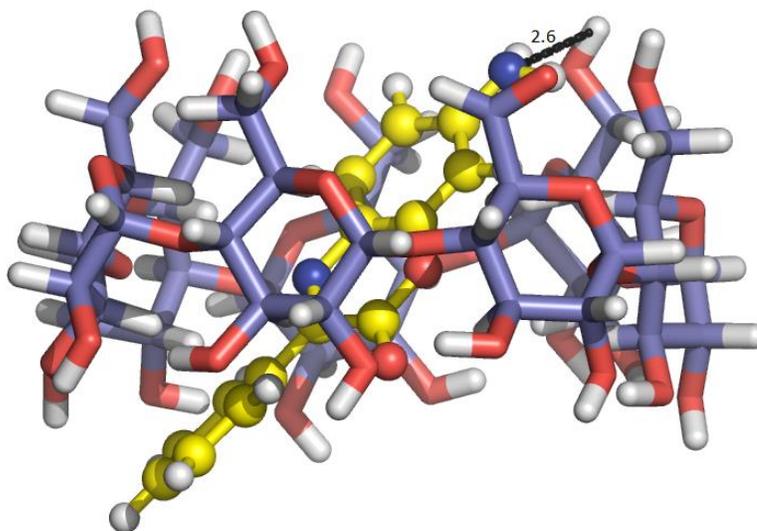
Figura 2.6. Espectros de emisión de fluorescencia versus concentración de β -ciclodextrina, para el complejo de inclusión oxazinona 2/ β -CD a pH 3, pH 5 y pH 6,8, temperatura 298K.



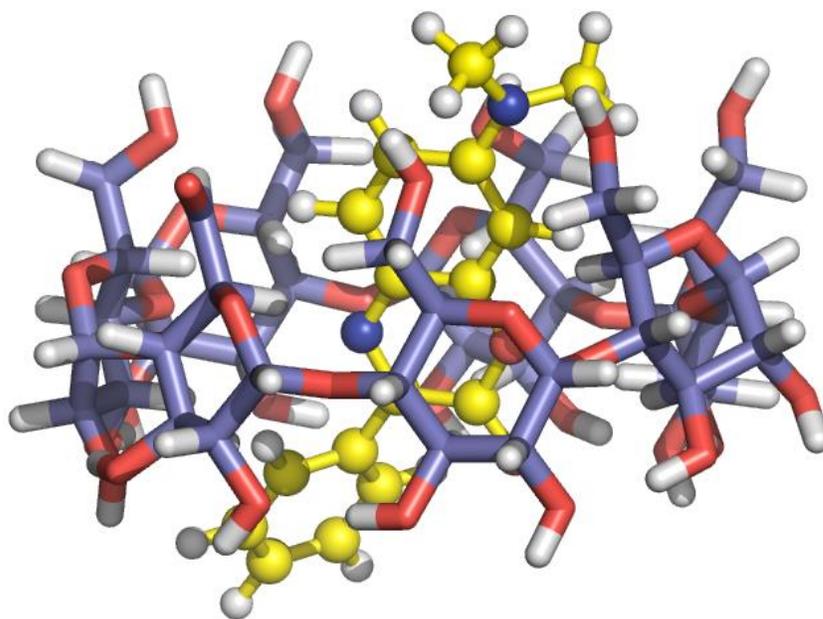
AN 2.6. Representación de los modelos obtenidos por *docking* para los complejos de inclusión entre β -ciclodextrina (azul) y las oxazinonas 1-10 (amarillo). Para destacar los heteroátomos se emplearon los colores blanco para el átomo de hidrógeno, rojo para el átomo de oxígeno, azul para el átomo de nitrógeno, anaranjado para el átomo de azufre y verde para el átomo de cloro.



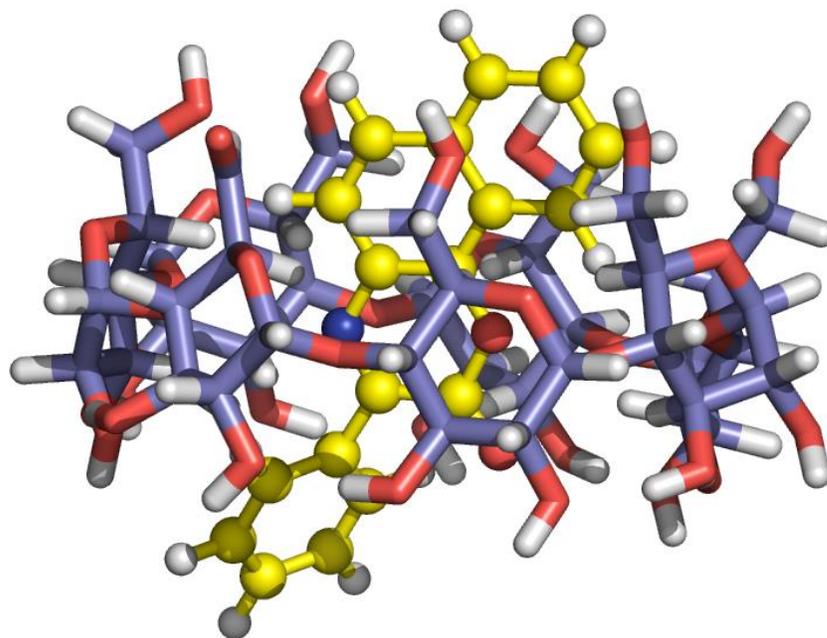
Oxazinona 1



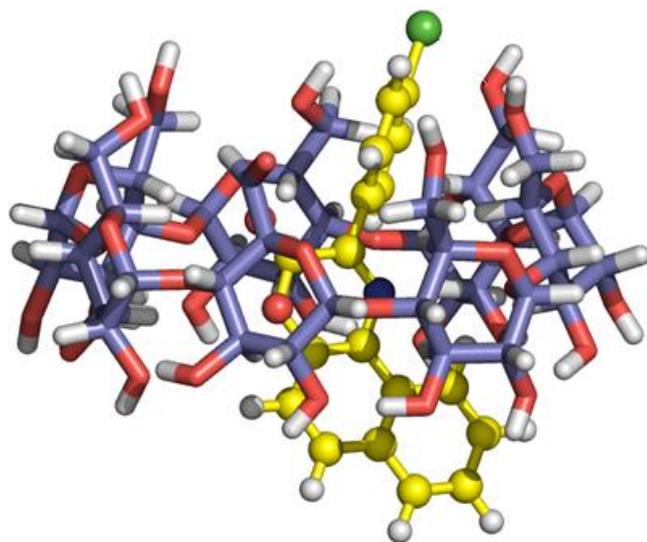
Oxazinona 2



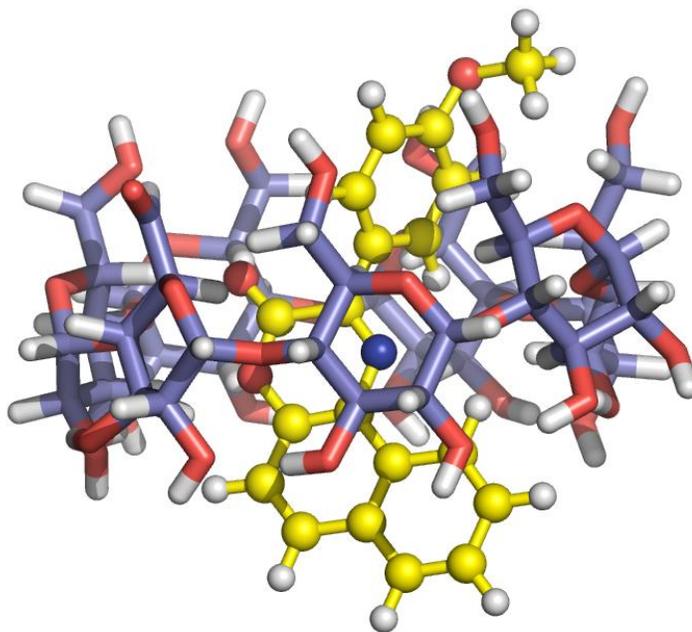
Oxazinona 3



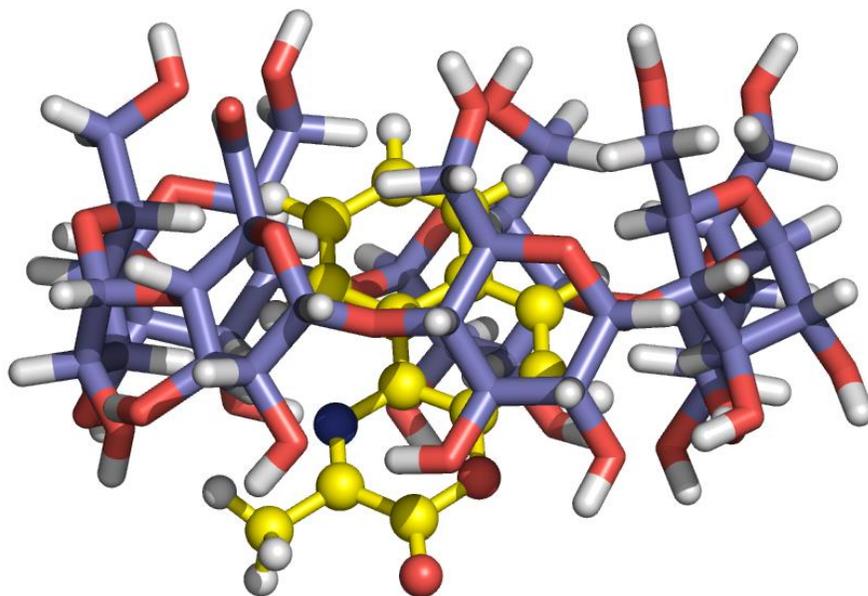
Oxazinona 4



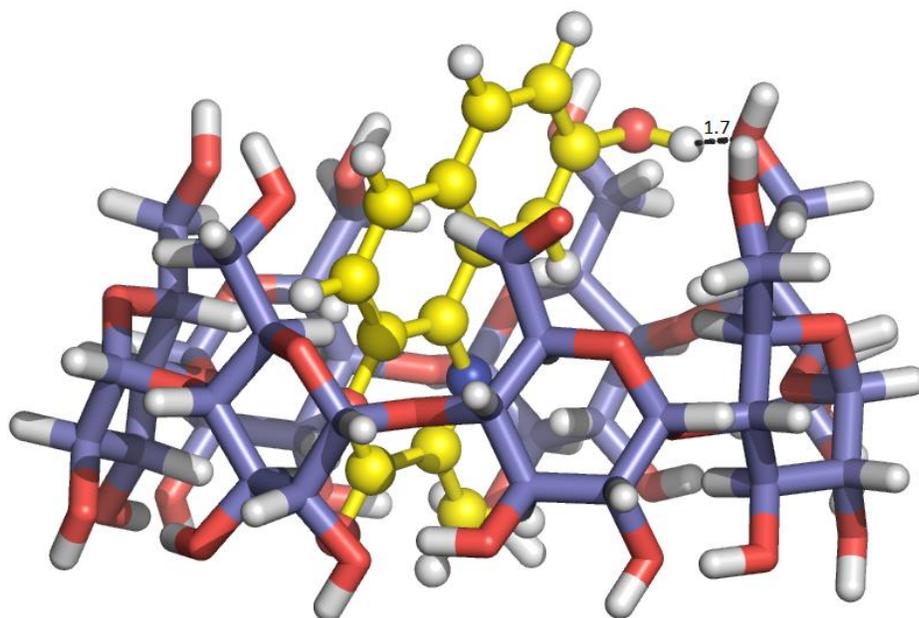
Oxazinona 5



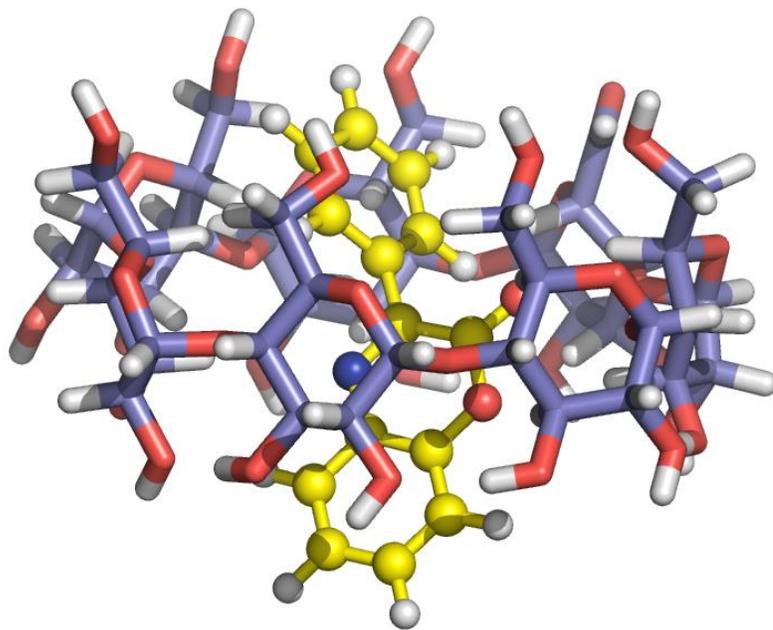
Oxazinona 6



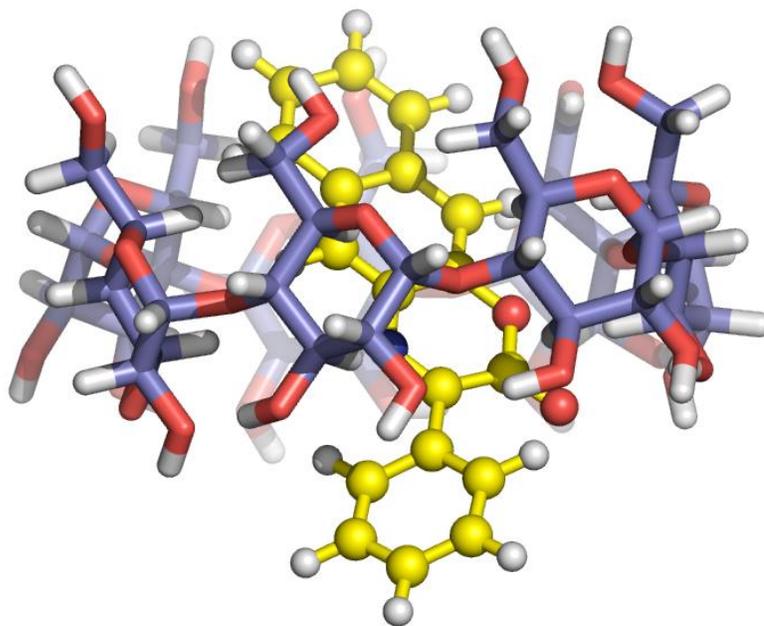
Oxazinona 7



Oxazinona 8



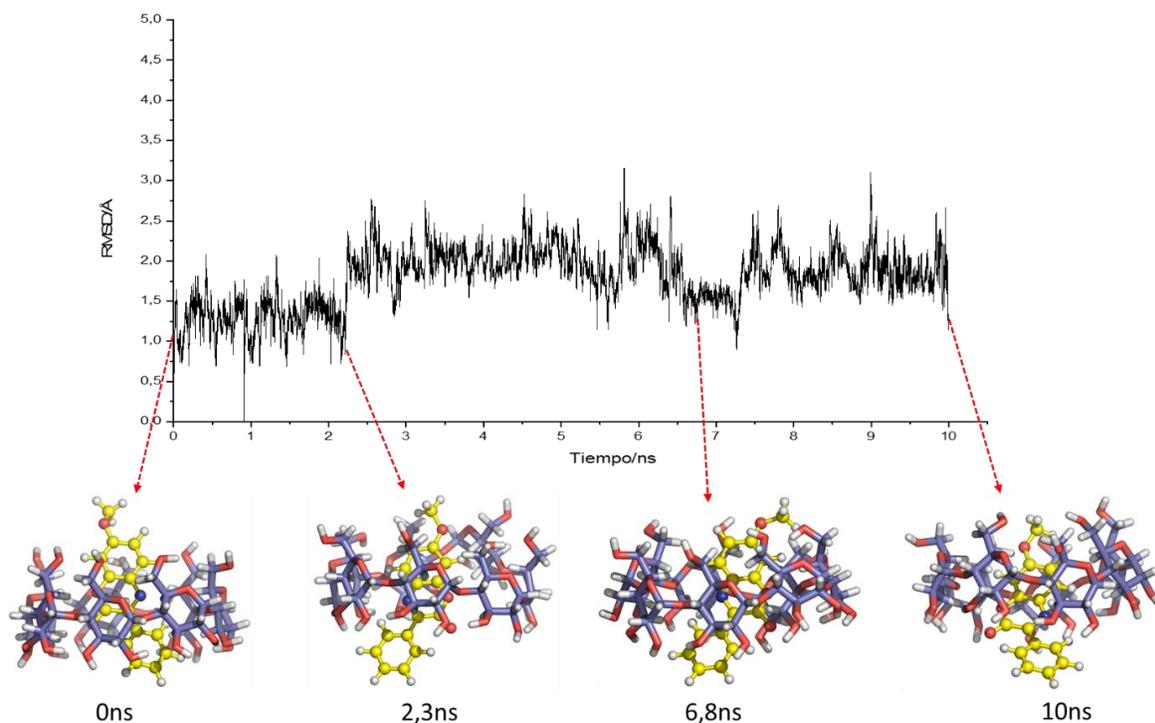
Oxazinona 9



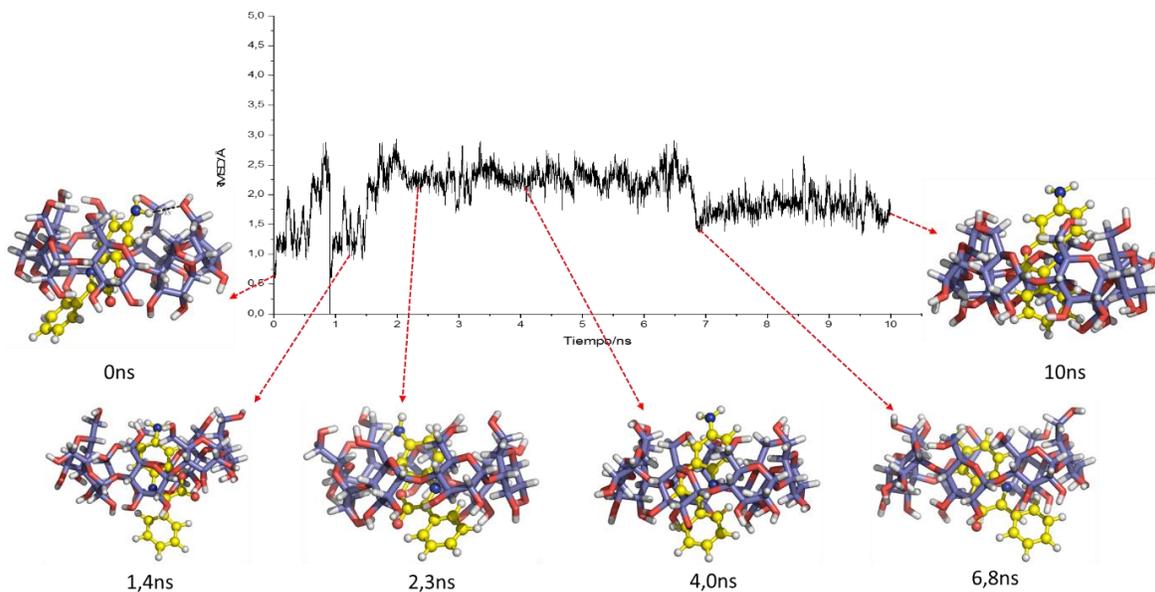
Oxazinona 10

AN 2.7. RMSD versus tiempo (10 ns) obtenidos a partir de los resultados de dinámica molecular, para los complejos de inclusión formados por ariloxazinonas y β -ciclodextrina. Durante 10 ns.

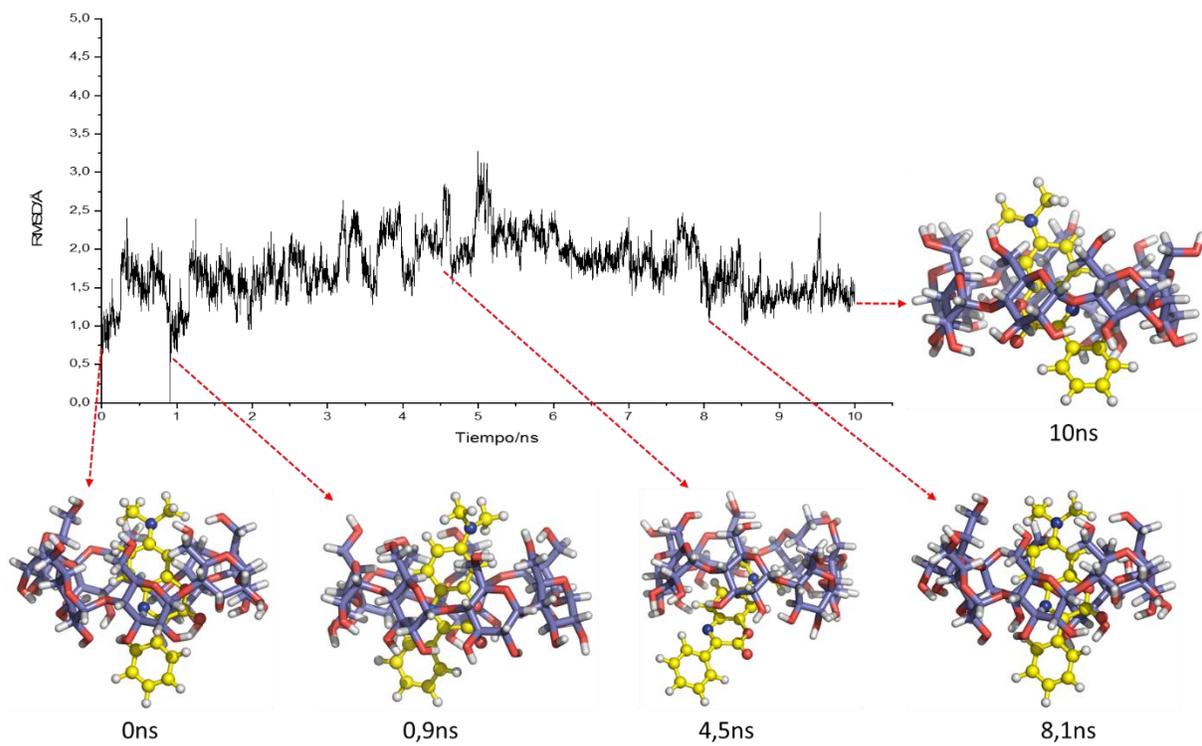
Oxazinona 1



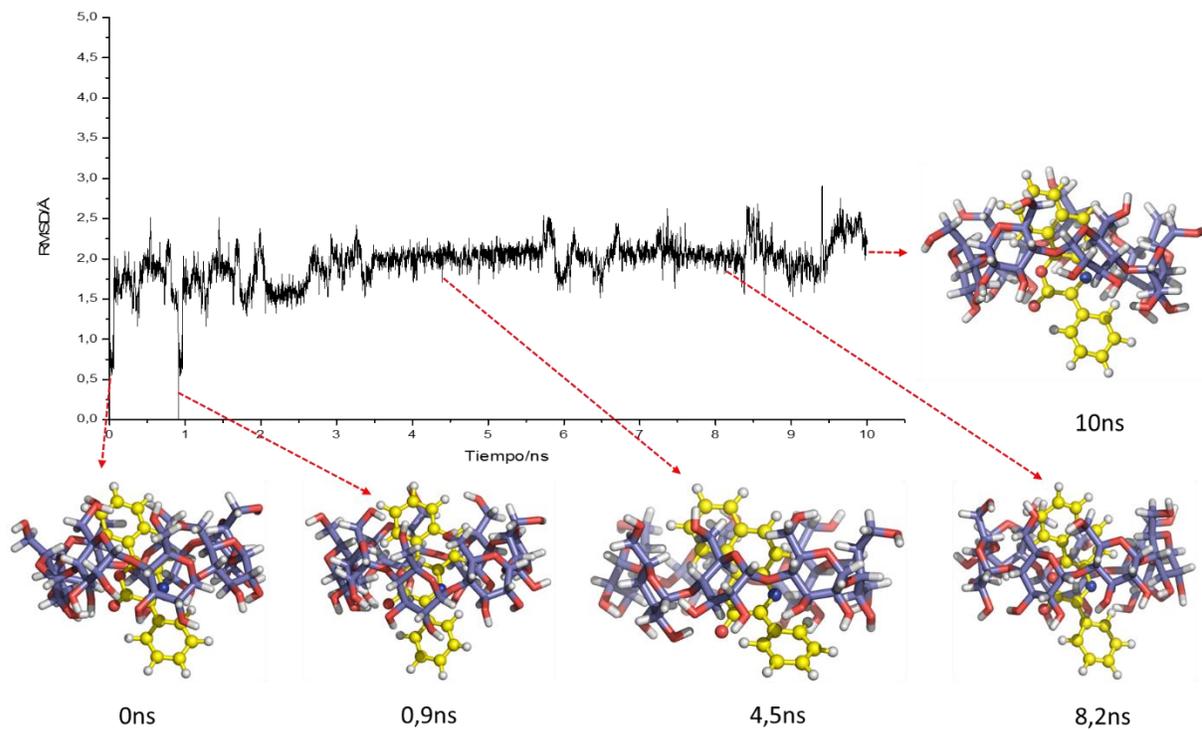
Oxazinona 2



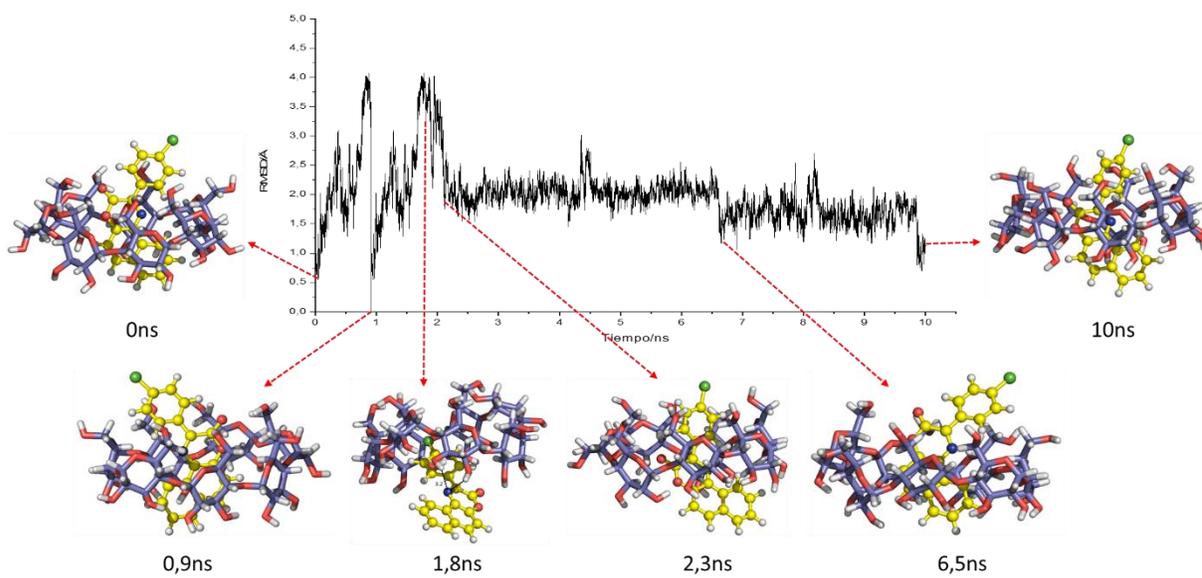
Oxazinona 3



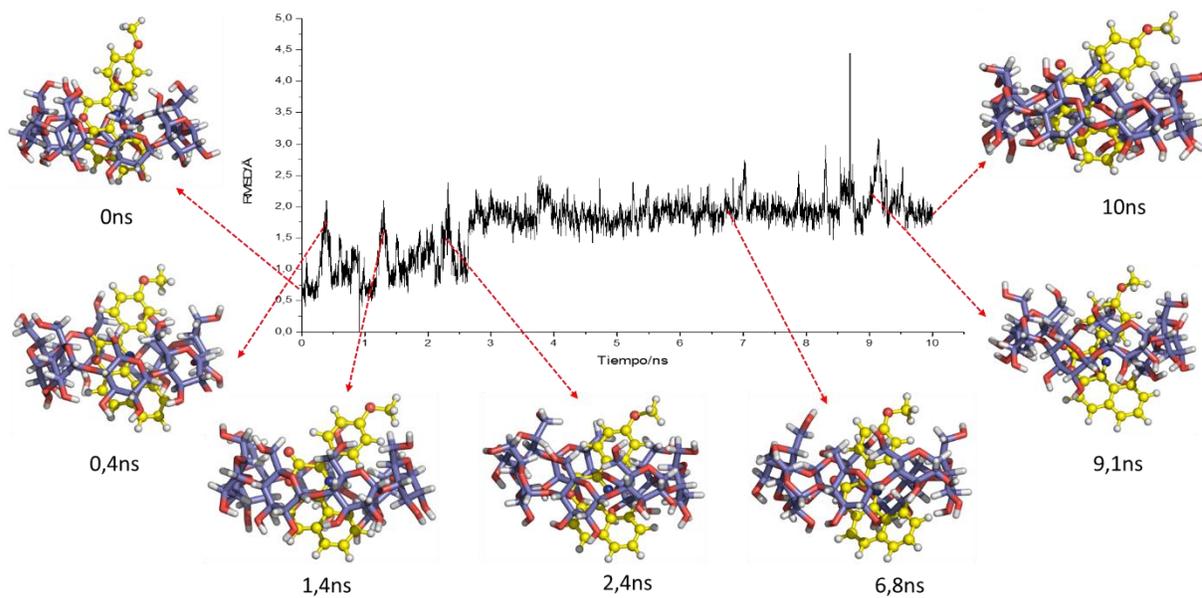
Oxazinona 4



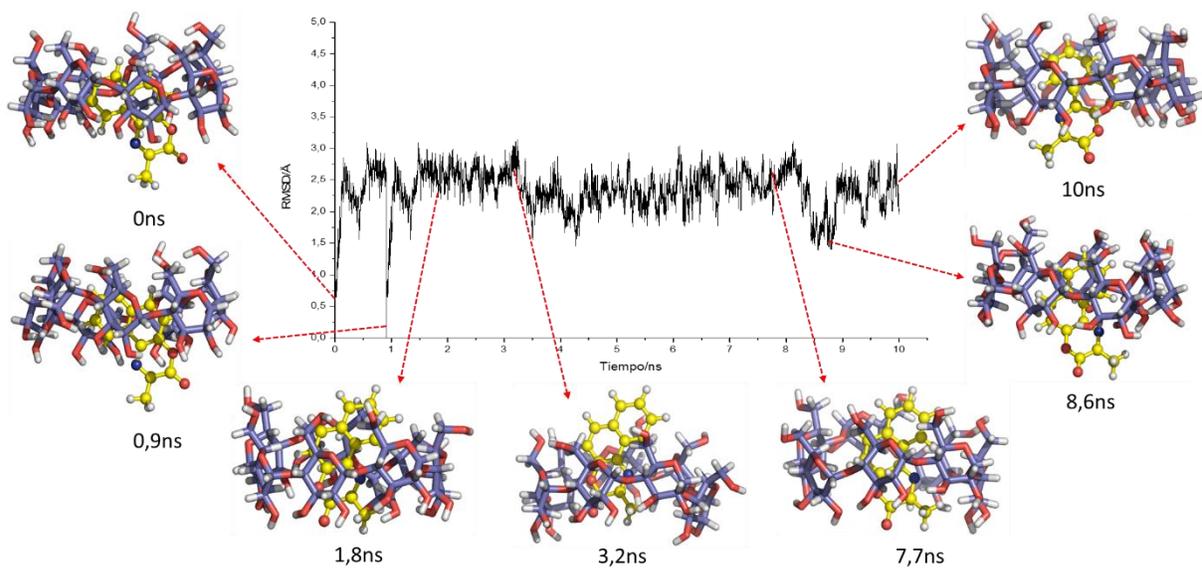
Oxazinona 5



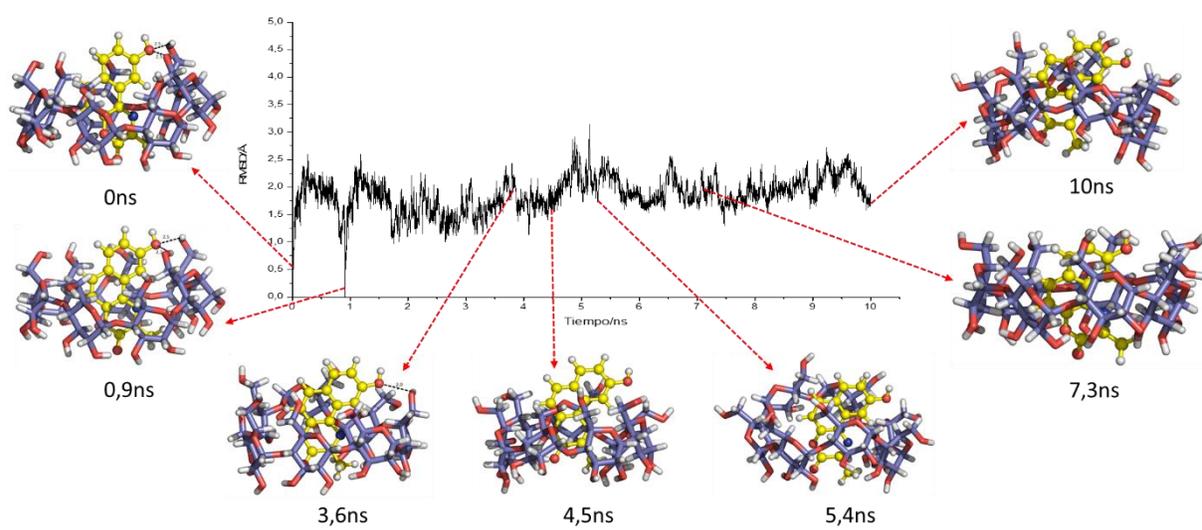
Oxazinona 6



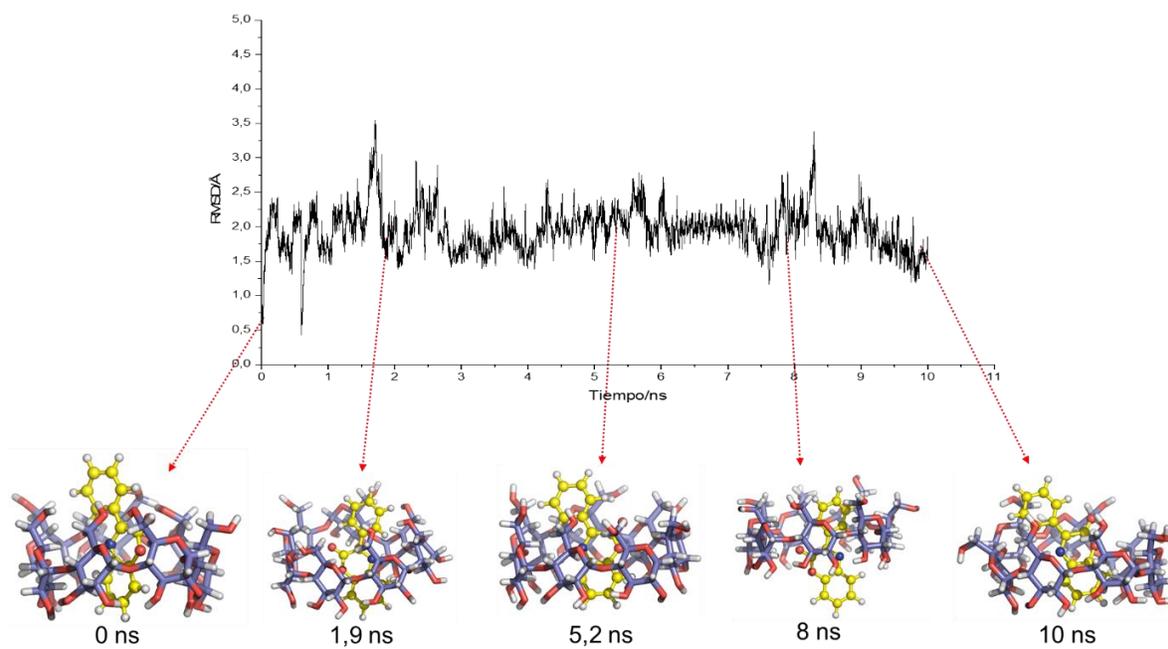
Oxazinona 7



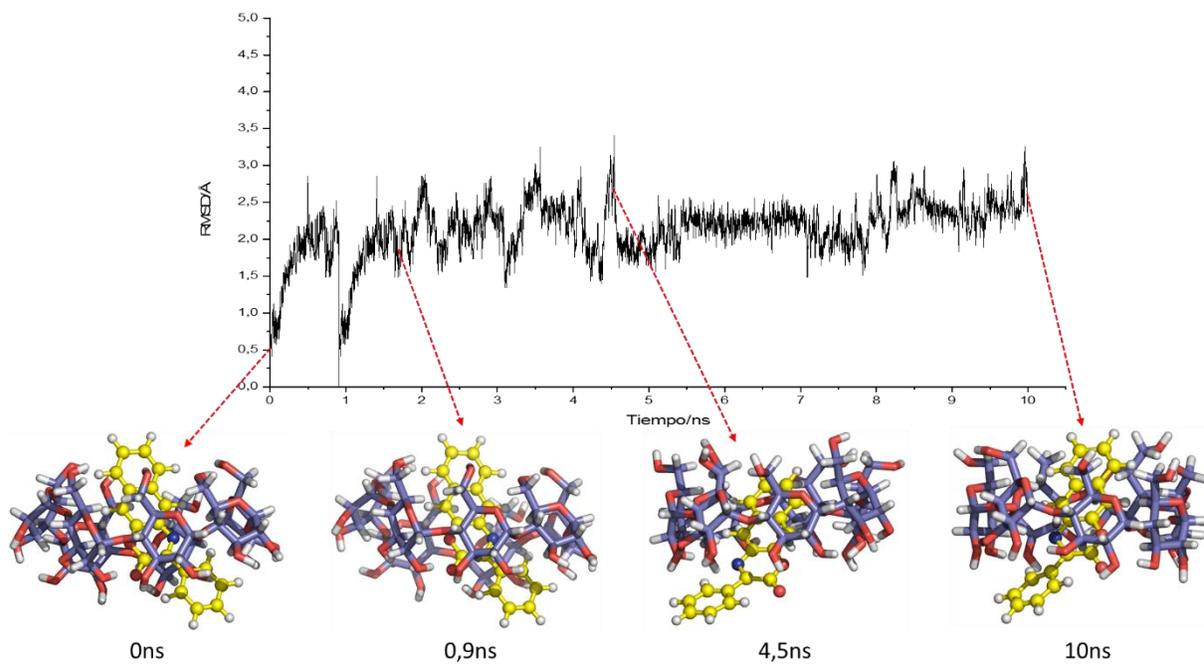
Oxazinona 8



Oxazinona 9



Oxazinona 10



AN 2.8. RMSD promedio durante 10 ns obtenidos a partir de los resultados de dinámica molecular, para los complejos de inclusión formados por ariloxazinonas y β -ciclodextrina. Durante 10 ns

Oxazinona	RMSD promedio / Å
<u>1</u>	1,79±0,38
<u>2</u>	2,01±0,40
<u>3</u>	1,77±0,38
<u>4</u>	1,96±0,27
<u>5</u>	1,98±0,51
<u>6</u>	1,73±0,74
<u>7</u>	2,35±0,34
<u>8</u>	1,86±0,32
<u>9</u>	1,95±0,31
<u>10</u>	2,13±0,38

AN 2.9. Resultados obtenidos para los estudios de descomposición energética a partir de trayectorias moleculares. Cálculos realizados por el método de Mecánica Molecular de Superficie Generalizada de Born a temperatura 298K. Las energía están en kcal/mol, donde VDW, corresponde al componente de las interacciones de van der Waals, ELECT, corresponde a las interacciones electrostáticas y ΔG_{total} , es la energía del proceso de formación del complejo. EGB y ESURF, son las contribuciones de energía libre de solvatación calculadas por el método. ΔG_{gas} y ΔG_{solv} , corresponden a la energía de interacción en fase gas y energía de solvatación respectivamente.

Oxazinona	VDW	EEL	EGB	ESURF	ΔG_{gas}	ΔG_{solv}	ΔG_{total}
<u>1</u>	-26,0	-7,3	16,0	-2,5	-33,4	13,5	-19,8
<u>2</u>	-24,0	-13,4	-21,1	-2,6	-37,4	18,5	-18,9
<u>3</u>	-26,9	-18,2	22,4	-2,6	-45,1	19,8	-25,3
<u>4</u>	-28,0	-9,8	18,2	-2,7	-37,8	15,4	-22,4
<u>5</u>	-31,1	-11,9	18,9	-3,1	-43,0	15,8	-27,2
<u>6</u>	-32,7	-5,7	17,3	-3,2	-38,4	14,2	-24,2
<u>7</u>	-22,6	-8,1	13,5	-2,2	-30,7	11,3	-19,4
<u>8</u>	-24,3	-17,6	21,5	-2,5	-41,9	19,1	-22,9
<u>9</u>	-21,8	-11,7	17,2	-2,2	-33,5	14,9	-18,5
<u>10</u>	-28,5	-10,9	20,8	-2,8	-39,4	18,0	-21,3

AN 2.10. Resultados obtenidos para los estudios de descomposición energética a partir de trayectorias moleculares. Cálculos realizados por el método de Mecánica Molecular de Superficie Generalizada de Poisson-Boltzman a temperatura 298K. Las energía están en kcal/mol, donde VDW, corresponde al componente de las interacciones de van der Waals, EEL, corresponde a las interacciones electrostáticas y ΔG_{total} , es la energía del proceso de formación del complejo. EPB contribución de energía libre de solvatación calculadas, ENPOLAR y ENDISPER contribución apolar de energía libre de solvatación calculada por el modelo. ΔG_{gas} y ΔG_{solv} corresponden a la energía de interacción en fase gas y energía de solvatación respectivamente.

Oxazinona	VDW	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	ΔG_{gas}	ΔG_{solv}	ΔG_{total}
<u>1</u>	-26,0	-7,3	18,7	-15,5	28,6	-33,4	31,8	-1,6
<u>2</u>	-24,0	-13,4	-59,7	-15,8	27,5	-37,4	-47,9	-8,5
<u>3</u>	-26,9	-18,2	25,1	-17,8	30,0	-45,4	37,3	-7,9
<u>4</u>	-28,0	-9,8	20,3	-17,2	31,1	-37,8	34,1	-3,7
<u>5</u>	-31,1	-11,9	21,5	-19,1	32,8	-43,1	35,2	-7,8
<u>6</u>	-32,7	-5,7	20,3	-18,5	33,7	-38,4	35,6	-2,8
<u>7</u>	-22,6	-8,1	15,9	-14,3	23,9	-30,7	25,6	-5,1
<u>8</u>	-24,3	-17,6	21,5	-16,1	27,7	-41,9	33,1	-8,9
<u>9</u>	-21,8	-11,7	17,3	-14,4	25,5	-33,5	28,4	-5,1
<u>10</u>	-28,5	-10,9	19,4	-17,8	29,5	-39,4	31,2	-8,2

AN 1.11. Resultados obtenidos a partir de los cálculos de Natural Bond Orbital (NBO). Se seleccionaron las interacciones con energía $E(2) > 1,00$ Kcal/mol.

Oxazinona 1

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
oxazinona <u>1</u> donor y β -ciclodextrina aceptor		
LP (2) O159	RY (5) O42	0,1
LP (1) O160	BD* (1) O47-H48	11,3
LP (2) O160	BD* (1) O47-H48	6,2
LP (2) O173	BD* (1) O81-H82	7,0

Oxazinona 2

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β -ciclodextrina donor y oxazinona <u>2</u> aceptor		
LP (2) O41	BD* (1) C150-H151	1,1
LP (2) O83	BD* (1) N171-H173	13,1
LP (1) O104	BD* (1) N171-H172	2,4
LP (2) O104	BD* (1) N171-H172	11,4
LP (2) O133	BD* (1) C161-H162	1,0
BD (1) C28-H 29	BD* (1) C168-H170	1,4
BD (1) O83-H 84	BD* (1) N171-H173	1,0
BD (1) C119-H120	BD* (1) C155-H156	1,4
BD (1) C131-H132	BD* (1) C161-H162	2,6
oxazinona <u>2</u> donor y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O157	BD* (1) C119-H120	2,4
LP (1) O158	BD* (1) C112-H113	1,4
LP (2) O158	BD* (1) C112-H113	2,2
BD (2) C147-O158	BD* (1) C131-H132	1,1
BD (2) C154-C155	BD* (1) C98-H99	1,7
BD (1) C155-H156	BD* (1) C98-H99	1,2

BD (1) C155-H156	BD* (1) C119-H120	2,1
BD (2) C160-C161	BD* (1) C7-H8	3,0
BD (1) C161-H162	BD* (1) C131-H132	2,2
BD (1) C168-H170	BD* (1) C28-H29	4,0

Oxazinona 3

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β-ciclodextrina donator y oxazinona <u>3</u> aceptor		
LP (2) O39	BD* (1) C174-H177	1,3
oxazinona <u>3</u> donator y β-ciclodextrina aceptor		
LP (1) O160	BD* (1) O 47-H48	7,0
LP (2) O160	BD* (1) O 47-H48	2,5
LP (1) N173	BD* (1) O 81-H82	6,4
BD (2) C149-O160	BD* (1) O 47-H48	1,4
BD (2) C165-C166	BD* (1) O9-H10	1,1

Oxazinona 4

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β-ciclodextrina donator y oxazinona <u>4</u> aceptor		
LP (1) O59	BD* (1) C161-H162	2,6
LP (1) O80	LV (1) C150	1,5
LP (1) O101	BD* (1) C153-H154	1,8
LP (2) O101	BD* (1) C153-H154	1,6
LP (2) O113	BD* (1) C175-H176	2,1
BD (1) C 54-H 55	BD* (1) C155-H156	4,5
BD (1) C111-H112	BD* (1) C177-H178	3,2
oxazinona <u>4</u> donator y β-ciclodextrina aceptor		
LP (1) N164	BD* (1) C138-H139	1,1
LP (1) O167	BD* (1) O 46-H 47	4,1

LP (1) O167	BD* (1) C 48-H 49	2,2
LP (2) O167	BD* (1) C 48-H 49	1,5
BD (1) C155-H156	BD* (1) C 54-H 55	4,4
BD (2) C166-O167	BD* (1) C 48-H 49	1,4
BD (1) C177-H178	BD* (1) C111-H112	4,3

Oxazinona 5

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β -ciclodextrina donator y oxazinona <u>5</u> aceptor		
LP (2) O60	BD* (1) C165-H177	1,3
oxazinona <u>5</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O161	BD*(1) O144-H145	7,6
BD (2) C164-C165	BD*(1) O 81-H82	2,0

Oxazinona 6

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
oxazinona <u>6</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O161	BD* (1) C139-H140	1,1
BD (2) C165-C166	BD* (1) O 81-H82	3,1

Oxazinona 7

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β -ciclodextrina donator y oxazinona <u>7</u> aceptor		
LP (1) O39	BD* (1) C165-H166	1,2
LP (1) O63	BD* (1) C154-H155	1,3
oxazinona <u>7</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
BD (2) C154-C156	BD* (1) C91-H92	1,3

Oxazinona 8

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β -ciclodextrina donator y oxazinona <u>8</u> aceptor		
LP (1) O81	BD* (1) O170-H171	1,7
LP (2) O81	BD* (1) O170-H171	15,6
LP (1) O145	BD* (1) C152-H153	1,0
oxazinona <u>8</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O170	BD* (1) O60-H61	2,2
LP (2) O170	BD* (1) O60-H61	8,9
BD (2) C150-C152	BD* (1) C13-H14	1,1

Oxazinona 9

Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
β -ciclodextrina donator y oxazinona <u>9</u> aceptor		
LP (2) O47	BD* (1) C152-H153	1,8
oxazinona <u>9</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O161	BD* (1) C139-H140	2,7
BD (2) C150-C152	BD* (1) C28-H29	1,6
BD (2) C166-C167	BD* (1) C76-H77	1,1

Oxazinona 10

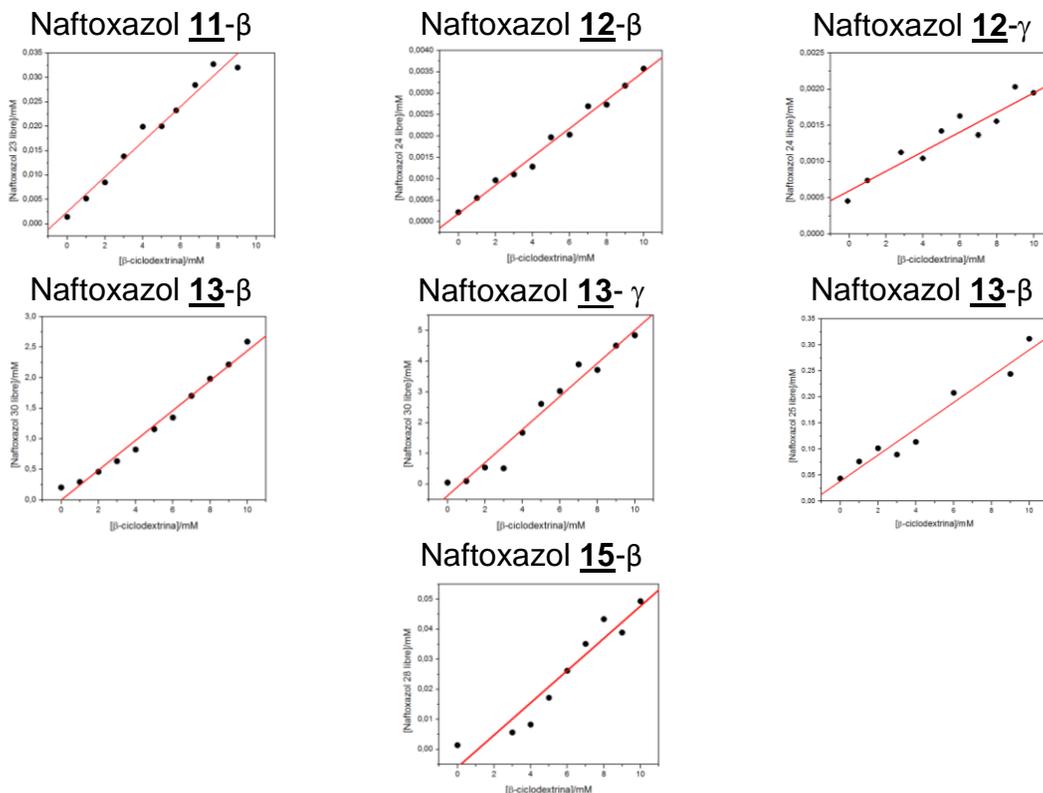
Donor	Aceptor	E(2)/Kcal/mol
oxazinona <u>10</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) O165	BD* (1) C49-H50	2,0
LP (1) O168	BD* (1) O47-H48	9,5
LP (2) O168	BD* (1) O47-H48	4,1
BD (2) C167-O168	BD* (1) O47-H48	1,9
BD (2) C176-C178	BD* (1) C7-H8	2,4

PARTE III: ARILOXAZOLES

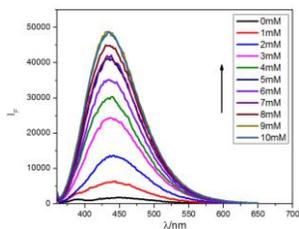
AN 3.1. Rendimientos Cuánticos de fluorescencia para los naftoxazoles **11-15**, en solventes representativos de una escala de polaridad (ϵ =constante dieléctrica).

Naftoxazol	Φ_F			
	Hexano ^a $\epsilon=1,88$	Benceno $\epsilon=2,3$	CH ₃ CN $\epsilon=41,1$	CH ₃ OH $\epsilon=33$
11	0,98	1,00	0,89	0,78
12	1,00	1,00	0,75	0,58
13	1,03	1,00	0,80	0,80
14	0,037	0,035	0,022	0,019
15	0,445	0,098	0,017	0,014

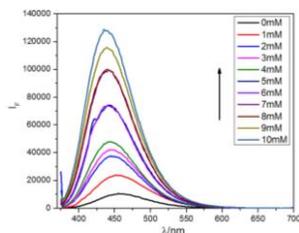
AN 3.2. Gráficos del método de solubilidad de fases. Concentración libre de naftoxazol versus concentración de β - y/o γ -ciclodextrina, para complejos de inclusión con estequiometría 1:1 a 298 K.



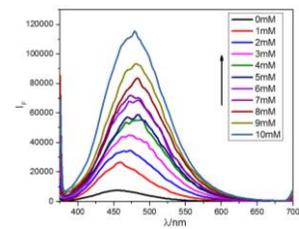
AN 3.3. Espectros de emisión de fluorescencia (I_f) versus longitud de onda (λ , nm) a distintas concentraciones de ciclodextrina, de 0 a 10mM para los complejos de inclusión entre los naftoxazoles **11** al **15** en β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, según corresponda, a temperatura 298K.



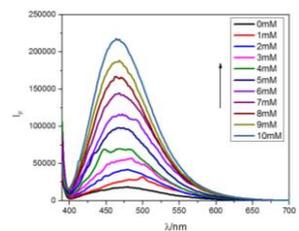
Naftoxazol **11** en β -CD



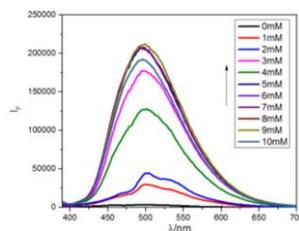
Naftoxazol **12** en β -CD



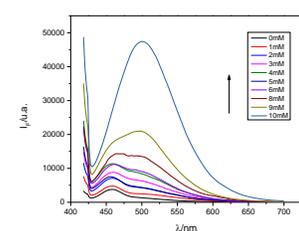
Naftoxazol **12** en γ -CD



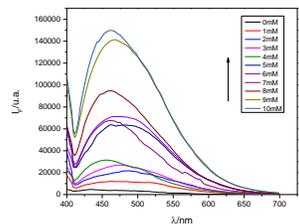
Naftoxazol **13** en β -CD



Naftoxazol **13** en γ -CD



Naftoxazol **14** en β -CD



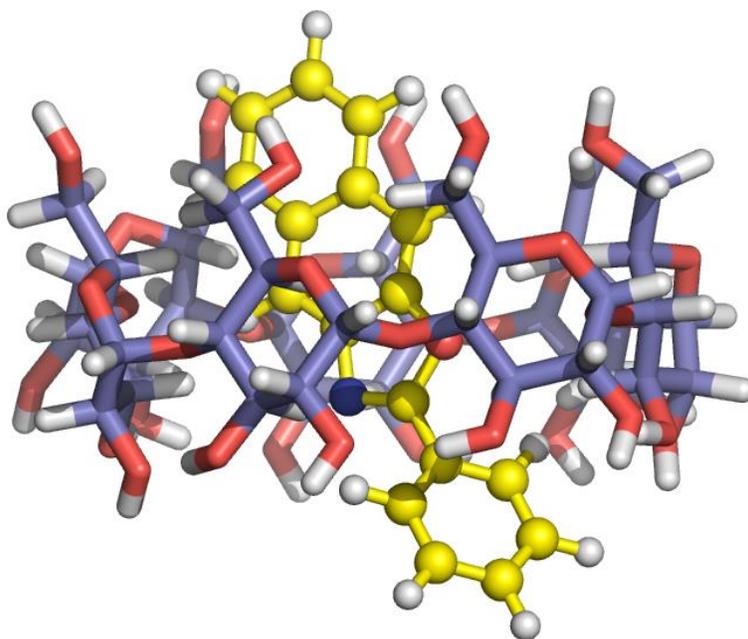
Naftoxazol **15** en β -CD

*La flecha indica el aumento de la intensidad de fluorescencia, para cada complejo de inclusión.

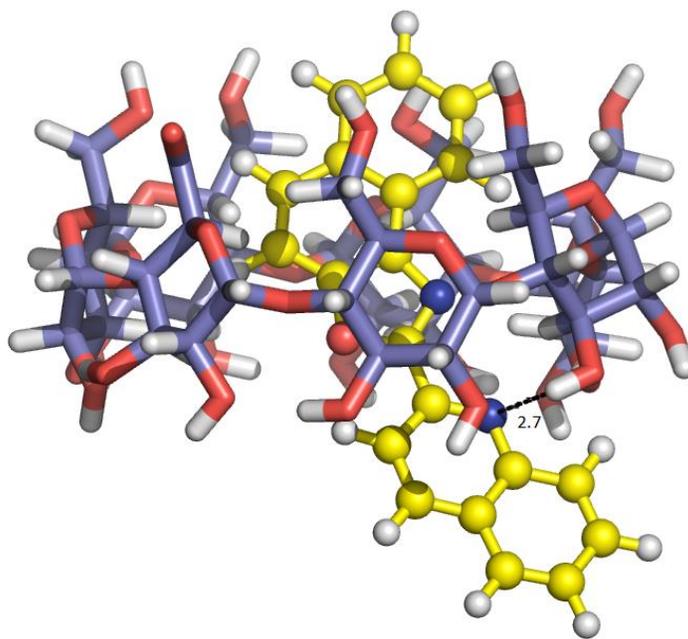
AN 3.4. Constantes de Inclusión a distintas temperaturas, para las los complejos de inclusión de naftoxazoles **11-15**, con estequiometría 1:1.

Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹	Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹	Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹
11-β	293	221	12-β	293	340	12-γ	293	107
	298	268		298	326		298	133
	303	279		303	322		303	139
	308	294		308	215		308	131
	313	315		313	254		313	175
Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹	Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹	Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹
13-β	293	499	13-γ	293	1108	14-β	293	253
	298	515		298	1006		298	329
	303	-		303	2571		303	456
	308	501		308	2635		308	118
	313	176		313	1740		313	443
Naftoxazol	T/K	K/M ⁻¹						
15-β	293	422						
	298	640						
	303	656						
	308	661						
	313	695						

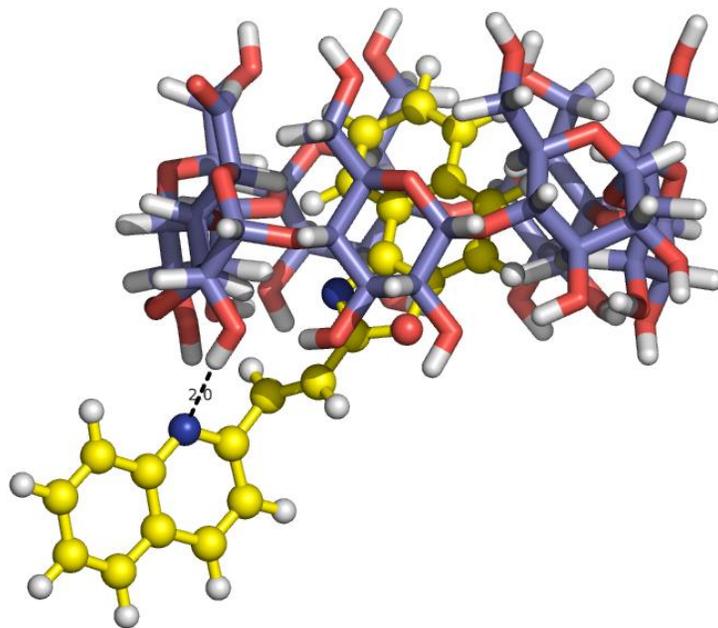
AN 3.5. Representación de los modelos obtenidos por *docking* para los complejos de inclusión entre β -ciclodextrina (azul) y las naftoxazoles **11-15** (amarillo). Para destacar los heteroátomos se emplearon los colores blanco para el átomo de hidrógeno, rojo para el átomo de oxígeno y azul para el átomo de nitrógeno.



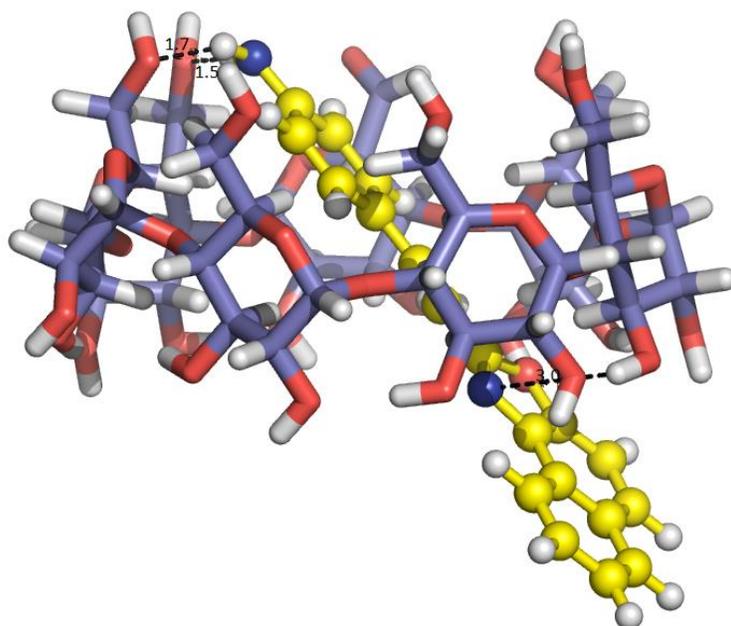
Naftoxazol **11**



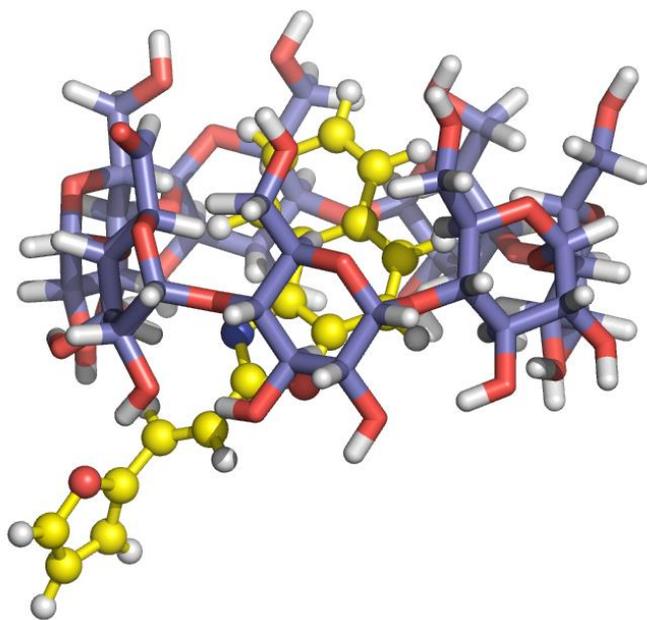
Naftoxazol **12**



Naftoxazol 13



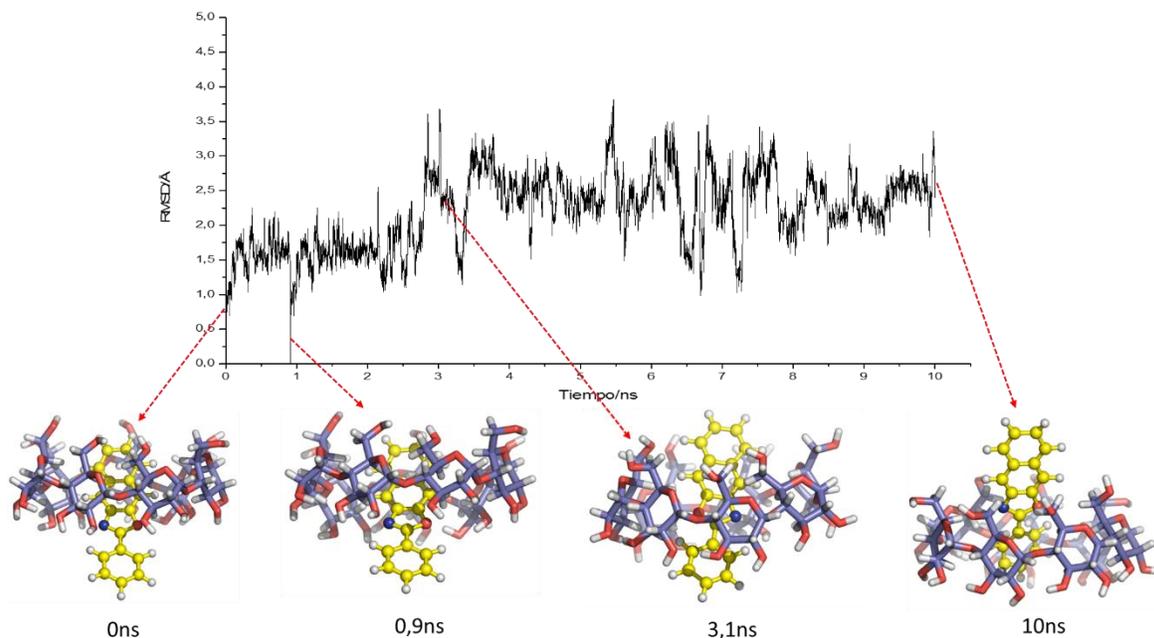
Naftoxazol 14



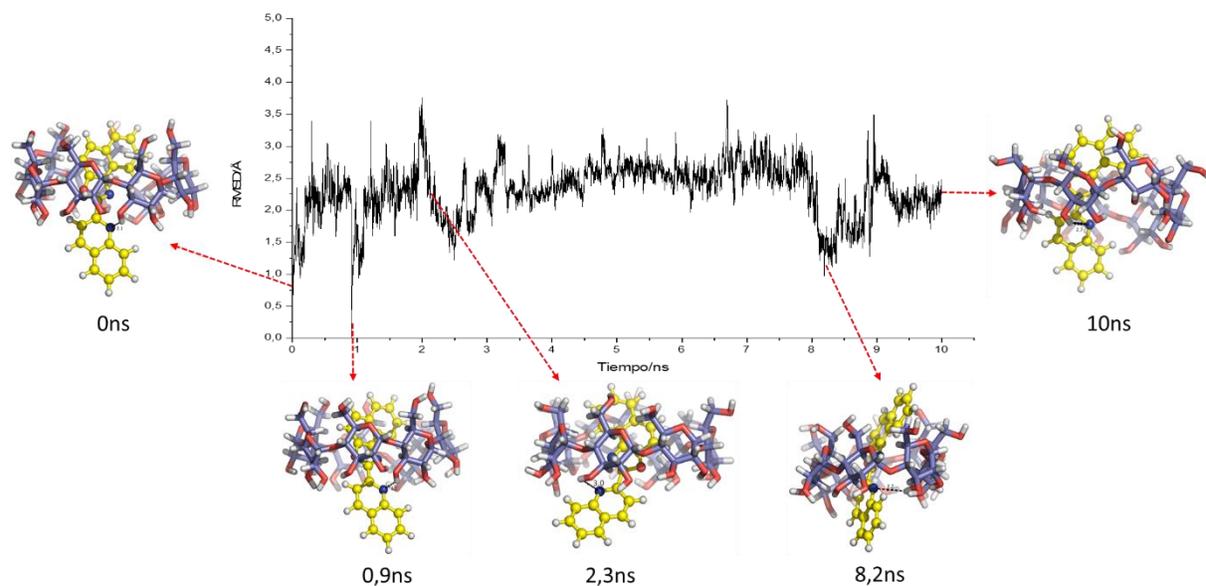
Naftoxazol 15

AN 3.6. RMSD durante 10 ns obtenidos a partir de los resultados de dinámica molecular, para los complejos de inclusión formados por ariloxazoles y β -ciclodextrina. Durante 10 ns.

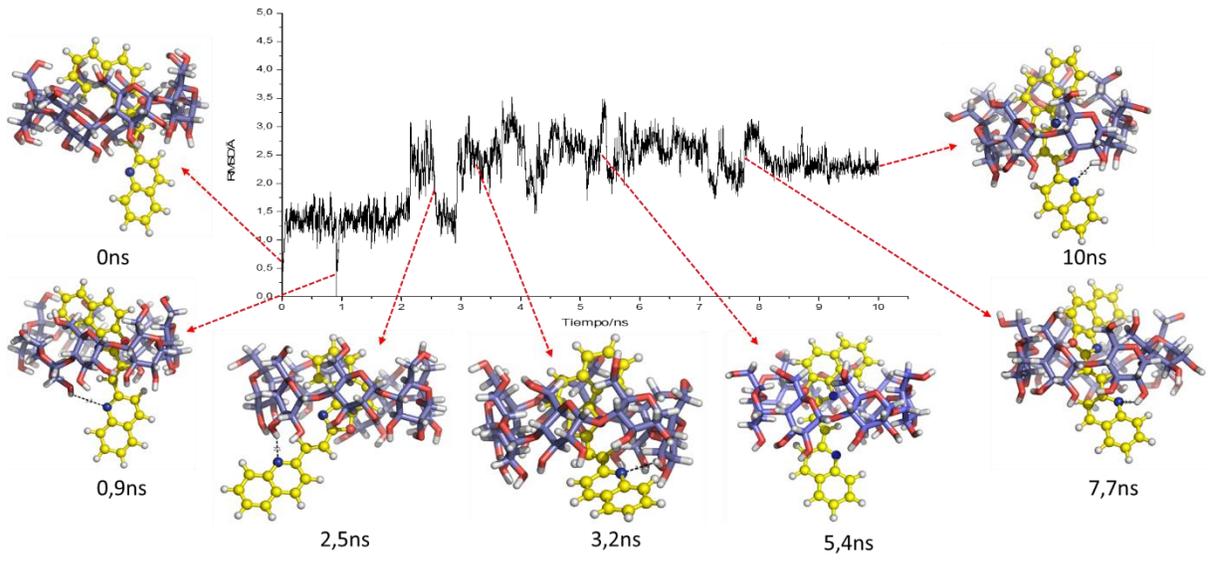
Naftoxazol 11



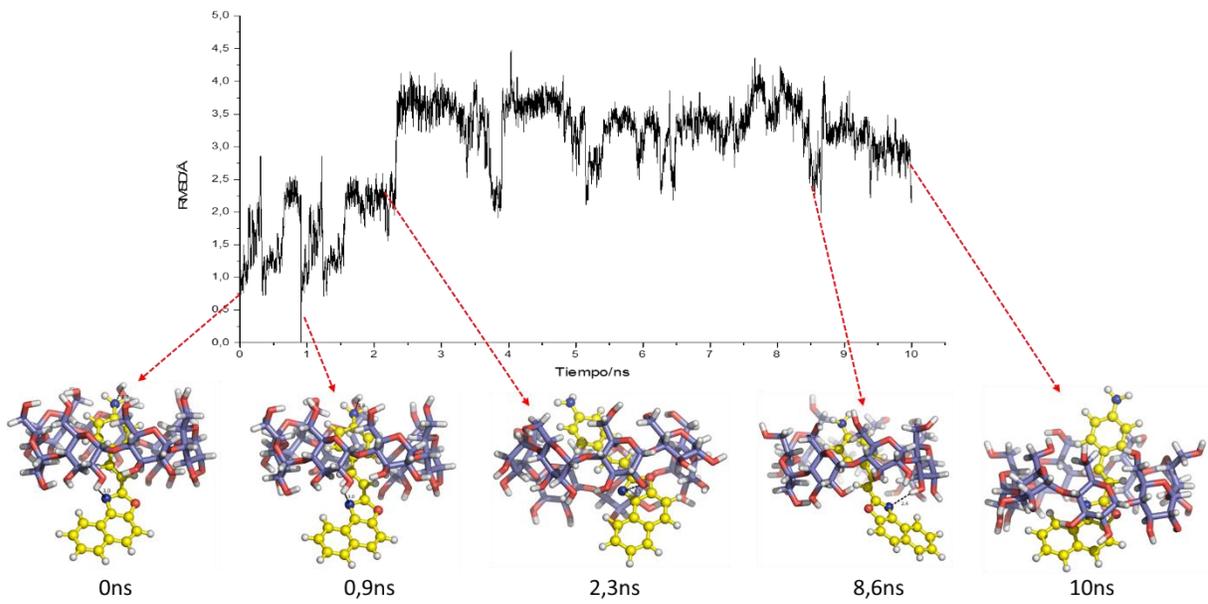
Naftoxazol 12



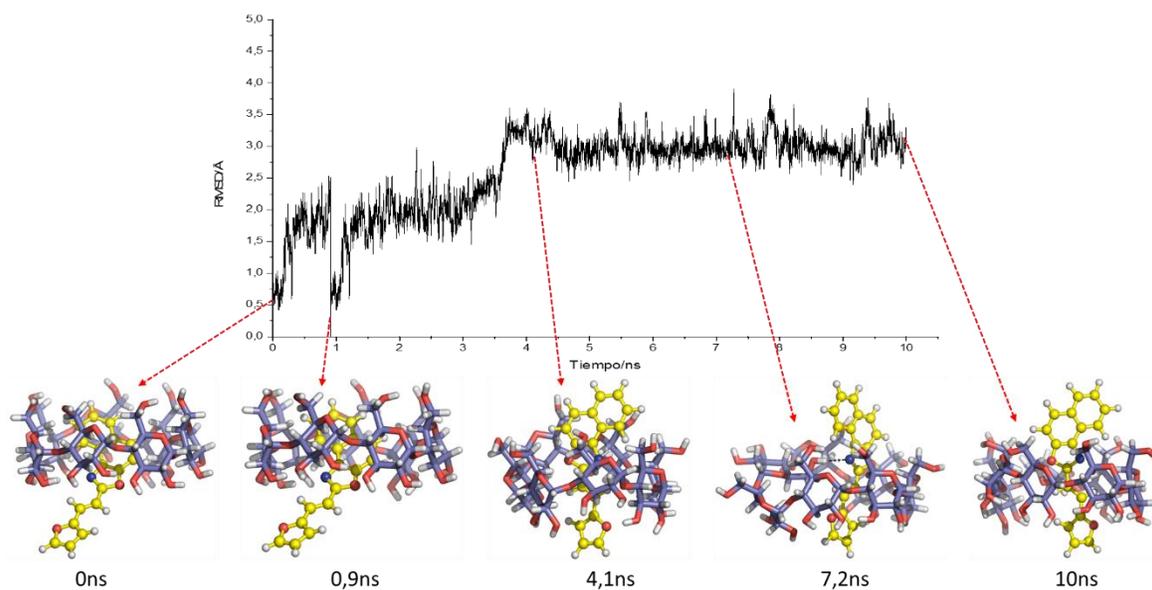
Naftoxazol 13



Naftoxazol 14



Naftoxazol 15



AN 3.7. RMSD promedio durante 10 ns obtenidos a partir de los resultados de dinámica molecular, para los complejos de inclusión formados por naftoxazoles y β -ciclodextrina.

Naftoxazol	RMSD promedio / Å
<u>11</u>	$2,20 \pm 0,54$
<u>12</u>	$2,31 \pm 0,42$
<u>13</u>	$2,20 \pm 0,56$
<u>14</u>	$2,96 \pm 0,80$
<u>15</u>	$2,59 \pm 0,67$

AN 3.8. Resultados obtenidos para los estudios de descomposición energética a partir de trayectorias moleculares. Cálculos realizados por el método de Mecánica Molecular de Superficie Generalizada de Born a temperatura 298K. Las energía están en kcal/mol, donde VDW, corresponde al componente de las interacciones de van der Waals, EEL, corresponde a las interacciones electrostáticas y ΔG_{total} , es la energía del proceso de formación del complejo. EGB y ESURF, son las contribuciones de energía libre de solvatación calculadas por el método. ΔG_{gas} y ΔG_{solv} , corresponden a la energía de interacción en fase gas y energía de solvatación respectivamente.

Naftoxazol	VDW	EEL	EGB	ESURF	ΔG_{gas}	ΔG_{solv}	ΔG_{total}
<u>11</u>	-24,9	-5,8	14,3	-2,2	-30,6	12,2	-18,4
<u>12</u>	-27,9	-8,6	18,8	-2,7	-36,5	16,1	-20,4
<u>13</u>	-28,7	-9,8	19,3	-2,9	-38,5	16,3	-22,2
<u>14</u>	-24,4	-11,7	18,1	-2,7	-36,1	15,4	-20,7
<u>15</u>	-25,8	-5,5	14,0	-2,5	-31,2	11,5	-19,7

AN 3.9. Resultados obtenidos para los estudios de descomposición energética a partir de trayectorias moleculares. Cálculos realizados por el método de Mecánica Molecular de Superficie Generalizada de Poisson-Boltzman a temperatura 298K. Las energía están en kcal/mol, donde VDW, corresponde al componente de las interacciones de van der Waals, ELECT, corresponde a las interacciones electrostáticas y ΔG_{total} , es la energía del proceso de formación del complejo. EPB contribución de energía libre de solvatación calculadas, ENPOLAR y ENDISPER contribución apolar de energía libre de solvatación calculada por el modelo. ΔG_{gas} y ΔG_{solv} corresponden a la energía de interacción en fase gas y energía de solvatación respectivamente.

Naftoxazol	VDW	EEL	EPB	ENPOLAR	EDISPER	ΔG_{gas}	ΔG_{solv}	ΔG_{total}
<u>11</u>	-24,8	-5,8	15,9	-14,6	27,6	-30,6	28,9	-1,7
<u>12</u>	-27,9	-8,6	21,7	-17,0	30,3	-36,5	34,9	-1,6
<u>13</u>	-28,7	-9,8	20,7	-18,2	31,4	-38,5	33,9	-4,6
<u>14</u>	-24,4	-11,7	18,7	-16,8	27,7	-36,1	29,6	-6,5
<u>15</u>	-25,8	-5,5	15,4	-16,1	28,1	-31,2	27,4	-3,8

AN 3.10. Resultados obtenidos a partir de los cálculos de Natural Bond Orbital (NBO). Se seleccionaron las interacciones con energía $E(2) > 1,00$ kcal/mol.

Naftoxazol 11

Donor	Aceptor	E(2)/kcal/mol
β -ciclodextrina donador y naftoxazol <u>11</u> aceptor		
LP (2) O63	BD* (1) C154-H155	1,4
BD (1) C49-H50	BD* (1) C160-H161	2,1
BD (1) C133-H134	BD* (1) C168-H169	2,9
naftoxazol <u>11</u> donador y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) C152	BD* (1) O39-H40	7,4
LP (1) O165	BD* (1) C13-H14	2,2
BD (2) C154-C156	BD* (1) O81-H82	2,2
BD (1) C160-H161	BD* (1) C49-H50	1,9
BD (2) N164-C166	BD* (1) C28-H29	1,5
BD (2) C167-C168	BD* (1) C7-H8	3,4
BD (1) C168-H169	BD* (1) C133-H134	2,5
BD (1) C176-H177	BD* (1) C28-H29	1,3

Naftoxazol 12

Donor	Aceptor	E(2)/kcal/mol
β -ciclodextrina donador y naftoxazol <u>12</u> aceptor		
LP (1) O63	BD* (1) C158-H159	1,1
LP (2) O63	BD* (1) C158-H159	1,1
LP (1) O110	BD* (1) C168-H170	1,7
LP (2) O110	BD* (1) C168-H170	5,0
LP (1) O126	BD* (1) C148-H149	4,5
LP (2) O126	BD* (1) C148-H149	1,3
LP (1) O144	BD* (1) C150-H151	2,4
LP (2) O144	BD* (1) C150-H151	8,7

BD (1) C76-H77	BD* (1) C158-H159	3,0
naftoxazol <u>12</u> donador y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) N164	BD* (1) C49-H50	1,9
LP (1) N164	BD* (1) C70-H71	2,0
LP (1) O165	BD* (1) C112-H113	2,4
LP (1) N176	BD* (1) O51-H52	4,3
LP (1) N176	BD* (1) C70-H71	1,2
BD (1) C148-H149	BD* (1) C139-H140	1,7
BD (1) C148-H149	RY (1) O126	1,9
BD (2) C148-C150	BD* (1) C118-H119	1,9
BD (2) C152-C153	BD* (1) O102-H103	1,9
BD (2) C156-C162	BD* (1) O 39-H40	1,1
BD (1) C158-H159	BD* (1) C76-H77	5,3
BD (1) C158-H159	RY (1) H77	1,3
BD (2) N164-C166	BD* (1) C49-H50	1,2

Naftoxazol 13

Donor	Aceptor	E(2)/kcal/mol
β -ciclodextrina donador y naftoxazol <u>13</u> aceptor		
LP (2) O16	BD* (1) C164-H166	2,0
LP (1) O129	BD* (1) C170-H172	3,4
LP (2) O129	BD* (1) C148-H149	5,0
LP (2) O142	BD* (1) C164-H166	1,3
BD (1) C68-H69	BD* (1) C157-H160	4,1
BD (1) C74-H75	BD* (1) C158-H162	4,0
BD (1) C137-H138	BD* (1) C156-H167	3,3
BD (1) O142-H143	BD* (1) C164-H166	2,1
naftoxazol <u>13</u> donador y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) N151	BD* (1) C131-H132	2,0

LP (1) C155	BD* (1) C95-H96	1,2
BD (1) C156-H167	BD* (1) C137-H138	4,5
BD (1) C156-H167	RY (1) H138	1,1
BD (2) C157-C159	BD* (1) C89-H90	1,7
BD (1) C157-H160	BD* (1) C68-H69	3,7
BD (1) C158-H162	BD* (1) C74-H75	5,9
BD (1) C158-H162	RY (1) H75	1,2
BD (1) C163-H165	BD* (1) O37-H38	1,2
BD (1) C164-H166	BD* (1) O142-H143	1,2

Naftoxazol 15

Donor	Aceptor	E(2)/kcal/mol
β -ciclodextrina donator y naftoxazol <u>15</u> aceptor		
LP (1) O63	BD* (1) C150-H151	2,0
LP (2) O63	BD* (1) C150-H151	1,1
LP (2) O131	BD* (1) C169-H170	1,3
BD (1) C70-H71	BD* (1) C148-H149	1,5
BD (1) O131-H132	BD* (1) C169-H170	2,1
BD (1) O131-H132	RY (1) H170	1,4
BD (1) C139-H140	BD* (1) C158-H159	1,3
BD (1) O144-H145	BD* (1) C160-H161	3,5
naftoxazol <u>15</u> donator y β -ciclodextrina aceptor		
LP (1) N164	BD* (1) C112-H113	3,7
LP (1) O165	BD* (1) C91-H92	1,3
LP (2) O165	BD* (1) C91-H92	1,7
LP (1) O177	BD* (1) O114-H115	1,9
LP (2) O177	BD* (1) O114-H115	1,1
BD (1) C148-H149	BD* (1) C70-H71	1,6
BD (2) C148-C150	BD* (1) C76-H77	1,8

BD (1) C150-H151	BD* (1) C76-H77	2,1
BD (1) C150-H151	RY (1) O63	1,3
BD (1) C156-H157	BD* (1) O39-H40	1,4
BD (2) C156-C162	BD* (1) O39-H40	4,1
BD (1) C158-H159	BD* (1) C139-H140	2,9
BD (2) C158-C160	BD* (1) C13-H14	1,5
BD (1) C160-H161	BD* (1) O144-H145	3,6
BD (1) C162-H163	BD* (1) O39-H40	2,1
BD (2) N164-C166	BD* (1) C112-H113	1,7
BD (1) C169-H170	BD* (1) O131-H132	1,8

AN 3.11. Tiempos de vida, χ^2 y constante de desactivación del oxígeno excitado a distintas concentraciones de naftoxazol **15**, incluido en 10 mM de β -ciclodextrina, en agua (buffer pH 5).

[Naftoxazol 15]/ 10^{-4} M	τ /ns	χ^2	$k_d/10^7 s^{-1}$
0	56,8	1,05	1,76
1,15	39,5	0,96	3,17
1,53	35,2	1,01	3,34

Del gráfico Stern-Volmer $k_q=1,07 \pm 1,54 \cdot 10^{11} M^{-1}s^{-1}$ (agua)

AN 3.12. Decaimiento de las luminiscencia del oxígeno singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) en agua deuterada, en ausencia y a distintas concentraciones del naftoxazol **15**.

