

UCH-FC
DOC-Q
G 934
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**DISEÑO DE MATRICES SUPRAMOLECULARES DE
CUCURBITURILOS PARA SU USO EN PROCESOS DE
AMPLIFICACIÓN DE FLUORESCENCIA MEDIANTE LA
CREACIÓN DE ARQUITECTURAS MOLECULARES CON
NANOESTRUCTURAS METÁLICAS**

Tesis entregada a la universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al grado de

Doctor en Química

por

Daniel Sebastián Guerra Díaz

Directores de Tesis

Dr. Paul Jara Vergara

Dr. Patricio Iturriaga Vásquez (co-director)

Noviembre 2017

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la escuela de postgrado de la facultad de ciencias que la tesis de doctorado presentada por el candidato

DANIEL SEBASTIÁN GUERRA DÍAZ

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa privada de tesis rendido el día 2 de noviembre de 2017

Director de Tesis:

Dr. Paul Jara Vergara



Co-Director de Tesis

Dr. Patricio Iturriaga



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Antonio Zanocco (presidente)



Dr. Víctor Vargas

Dr. Claudio Saitz

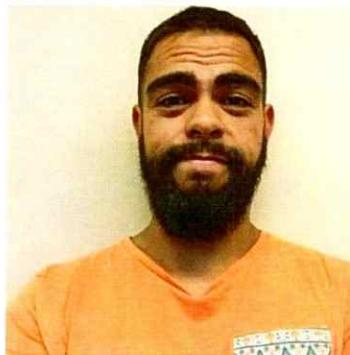
Dr. Ángel Leiva

Me gustaría creer que cuando muera seguiré viviendo, que alguna parte de mi continuará pensando, sintiendo y recordando. Sin embargo, a pesar de lo mucho que quisiera creerlo y de las antiguas tradiciones culturales de todo el mundo que afirman la existencia de otra vida, nada me indica que tal aseveración pueda ser algo más que un anhelo.

[...] Tal vez esta perspectiva me haya proporcionado una pequeña motivación adicional para seguir con vida. El mundo es tan exquisito, posee tanto amor y tal hondura moral, que no hay motivo para engañarnos con bellas historias respaldadas con escasas evidencias. Me parece mucho mejor mirar cara a cara a la Muerte en nuestra vulnerabilidad y agradecer cada día las oportunidades breves y magníficas que brinda la vida.

-Carl Sagan

BIOGRAFÍA



Daniel Sebastián Guerra Díaz nació en Santiago el 23 de noviembre de 1989. Comenzó sus estudios de pregrado en el año 2008 en el Bachillerato de la Universidad de Chile, donde obtuvo el grado de Bachiller en Ciencias Exactas. Continuó sus estudios de Licenciatura en Ciencias en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, obteniendo el grado de Licenciado en Ciencias con Mención en Química en el año 2012. Su trabajo de grado consistió en el estudio de compuestos de inclusión de ciclodextrinas con ácido carboxílicos de cadena larga y la decoración de cristales orgánicos con nanopartículas de plata, en el laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica, con el doctor Paul Jara. En el año 2012, ingresó al programa de Doctorado en Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Bajo la tutela del doctor Paul Jara, desarrolló su trabajo de tesis titulado *“Diseño de matrices supramoleculares de cucurbiturilos para su uso en procesos de amplificación de fluorescencia mediante la creación de arquitecturas moleculares con nanoestructuras metálicas”*.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primera instancia a mi tutor de tesis, Dr. Paul Jara, por darme la oportunidad de trabajar junto a él, por los conocimientos entregados y el tiempo dedicado. También, agradecer al Dr. Patricio Iturriaga, co-tutor de mi tesis, por su ayuda y disposición.

Al Dr. Nicolás Yutronic, por su apoyo incondicional. Por los momentos de alegría entregados. Por creer en mí cuando ni yo mismo lo hacía.

Al Dr. Lyle Isaacs, por su apoyo y su buena disposición, por permitirme trabajar en su laboratorio en la Universidad de Maryland. A todos los compañeros que conocí en esa experiencia, muchas gracias.

A los miembros de la comisión, por sus aportes, sus correcciones y su orientación, gracias a las cuales esta tesis fue llevada a cabo con éxito.

Agradezco a Conicyt por la beca de doctorado nacional, por los fondos de apoyo de tesis entregados para el desarrollo de esta investigación. Agradecer también al proyecto Fondecyt N°1171611 del Dr. Paul Jara.

A los amigos que tuve la oportunidad de conocer en el laboratorio de Síntesis Inorgánica y Electroquímica: Marjorie, Caterina, Sindy, Harold, Bárbara, Juan Pablo, Catalina, y a todos los demás que conocí en este proceso. Muchas gracias por los momentos compartidos, los consejos entregados y las experiencias que vivimos.

A mi familia, mi madre Paula, mis tías Ely y Johana, por su amor incondicional.
A mis primos Allyson, Giovanni, Nicolás, que fueron, son y serán mis hermanos por siempre.

A mi grupo de amigos de la universidad, gracias por los momentos que pasamos y que seguimos compartiendo juntos.

A mi amiga y compañera Tamara, por los años de amistad, por el apoyo incondicional y por las alegrías y penas vividas juntos.

A Manuel, por elegir acompañarme a lo largo de todo este camino.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABLAS	xxx
ABREVIACIONES	xxxii
RESUMEN	xxxiv
ABSTRACT	xxxvi

CAPÍTULO UNO: INTRODUCCIÓN

1.1 Cucurbit[n]urilo	1
1.1.1 Preparación y caracterización	2
1.1.2 Propiedades fundamentales de CB[n]s	4
1.1.3 Cucurbit[7]urilo	5
1.1.4 Cucurbiturilos acíclicos	6
1.2 Interacción macrociclo-fluoróforo	8
1.3 Nanoestructuras metálicas	10
1.4 Amplificación de fluorescencia por superficies metálicas	12
1.5 Hipótesis de trabajo	14

1.6	Objetivos	15
1.6.1	Objetivo General	15
1.6.2	Objetivos específicos	15

CAPÍTULO DOS: PARTE EXPERIMENTAL

2.1	Materiales	17
2.2	Síntesis de compuestos	17
2.2.1	Glicoluril (tetrahidroimidazo[4,5-d]imidazol-2,5(1H,3H)-diona)	17
2.2.2	CB[7]	18
2.2.3	Espectrometría de masas	19
2.2.4	Dimetil glicoluril	20
2.2.5	Diéter tetracíclico de dimetil glicoluril	21
2.2.6	Dímero de glicoluril	21
2.2.7	Metil tetrámero	22
2.2.8	Hidroquinona C4-wall	23
2.2.9	Motor I	23
2.2.10	1,4-dihidroxinaftaleno	24
2.2.11	Naftoquinona C4-wall	25

2.2.12 Motor 2	26
2.3 Auto asociación de motor 2	27
2.3.1 Cálculo de la constante de autoasociación del motor 2 mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones ^1H -RMN	27
2.3.2 Modelo de autoasociación RMN	27
2.4 Fotofísica	29
2.4.1 Espectroscopia UV-Vis	29
2.4.2 Estudios de absorción de los compuestos de inclusión	29
2.4.3 Determinación de las constantes de asociación de los compuestos de inclusión .	30
2.4.3.1 Modelo de asociación 1:1	31
2.4.3.2 Modelo de autoasociación 1:1 / 2:1 matriz:huésped	33
2.4.4 Determinación de la estequiometría de asociación de los compuestos de inclusión	35
2.4.5 Espectroscopia de fluorescencia	36
2.4.5.1 Estudios de emisión de los compuestos de inclusión	36
2.4.5.2 Determinación de las constantes de asociación de los compuestos de inclusión .	37
2.4.5.3 Cálculos de amplificación de fluorescencia en solución	37

2.4.6	Determinación del tiempo de vida de fluorescencia de los compuestos de inclusión	38
2.5	Estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión	38
2.5.1	Rodamina B	38
2.5.2	Tioflavina T	39
2.6	Acoplamiento molecular	39
2.7	Síntesis de nanopartículas de plata	40
2.7.1	Espectroscopia de UV-Vis	40
2.7.2	Dispersión dinámica de luz	40
2.8	Estudios de amplificación de fluorescencia en estado sólido	41
2.8.1	Deposición de los compuestos de inclusión sobre vidrio modificado	41
2.8.2	Microscopía de fuerza atómica	42
2.8.3	Fluorescencia de los compuestos en estado sólido y cálculos de amplificación de fluorescencia	42

**CAPÍTULO TRES: CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE
PROTONES Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR**

3.1	Compuestos de inclusión de rodamina B	44
3.2	Compuestos de inclusión de tioflavina T	52

**CAPÍTULO CUATRO: CONSTANTES DE ASOCIACIÓN DE LOS COMPUESTOS
DE INCLUSIÓN Y CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES DE ABSORCIÓN Y
FLUORESCENCIA DE LOS COLORANTES**

4.1	Constante de auto asociación de M2C4	57
4.2	Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con rodamina B	60
4.3	Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con azul Nilo	68
4.4	Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con tioflavina T	75
4.5	Comentarios finales del capítulo	80

CAPÍTULO CINCO: FLUORESCENCIA EN ESTADO SÓLIDO

5.1	Síntesis, caracterización y depósito de nanopartículas de plata sobre vidrio	85
5.2	Fluorescencia en estado sólido	93
5.2.1	Rodamina B	93
5.2.2	Tioflavina T	100
5.2.3	Azul Nilo	103
5.3	Comentarios finales del capítulo	104

CAPÍTULO SEIS: CONCLUSIÓN	109
--	------------

BIBLIOGRAFÍA	111
---------------------------	------------

ANEXOS

A. Espectros de resonancia magnética de protones, carbono y de masa de los compuestos sintetizados en este estudio	123
B. Estudio de constantes de asociación de los compuestos formados mediante espectroscopia UV-Vis y espectroscopia de fluorescencia	136
C. Método de las variaciones continuas y gráficos de Job de los compuestos de inclusión preparados en este estudio	181
D. Espectros de fluorescencia en estado sólido de los fluoróforos estudiados y de sus compuestos de inclusión sobre vidrio y vidrio modificado con nanopartículas de plata	193

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO UNO

Figura 1.1: Estructuras cristalinas de rayos X de los CB[n]s (n = 5 –10)	2
Figura 1.2: Métodos de purificación de CB[n]s amigables con el medio ambiente, utilizando sales de alquil-, aril- imidazol	3
Figura 1.3: Estructuras químicas de calabadión 1 y calabadión 2	7
Figura 1.4: Caminos de decaimiento fotofísicos para el estado excitado de fluoróforos incluidos en el macrociclo	10

CAPÍTULO DOS

Figura 2.1: Glicoluril	17
Figura 2.2: Cucurbit[7]urilo	18
Figura 2.3: Dimetil glicoluril	20
Figura 2.4: Díeter tetracíclico de dimetil glicoluril	21
Figura 2.6: Dímero de glicoluril	21
Figura 2.7: Metil tetrametro	22
Figura 2.8: Hidroquinona C4-wall	23

Figura 2.9: Motor 1 (M1C4)	23
Figura 2.10: 1,4-dihidroxi-naftaleno	24
Figura 2.11: Naftoquinona C4-wall	25
Figura 2.12: Motor 2 (M2C4)	26
Figura 2.13: MADQUAT (cloruro de poli(2-metacriloxietiltrimetilamonio))	42

CAPÍTULO TRES

Figura 3.1: Esquema de la asignación de hidrógenos de la rodamina B	45
Figura 3.2: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y β -ciclodextrina en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de β -ciclodextrina. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y β -ciclodextrina	46
Figura 3.3: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y CB[7] en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de CB[7]. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y CB[7]	48
Figura 3.4: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y M1C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales	

de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de M1C4. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y M1C4 49

Figura 3.5: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y M2C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y M2C4 .. 51

Figura 3.6: Esquema de la asignación de hidrógenos de la tioflavina T 53

Figura 3.7: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y β -ciclodextrina en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de β -ciclodextrina. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y β -ciclodextrina 53

Figura 3.8: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y CB[7] en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de CB[7]. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y CB[7] 54

Figura 3.9: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y M1C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad

de M1C4. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y M1C4 55

Figura 3.10: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y M2C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y M2C4 .. 56

CAPÍTULO CUATRO

Figura 4.1: Estudio de dilución del M2C4 para determinar la constante de autoasociación mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones ^1H -RMN 58

Figura 4.2: Ajuste de la curva, utilizando la ecuación E1 del modelo de autoasociación, mediante resonancia magnética nuclear de protones, siguiendo el protón a 3,87 ppm de M2C4 en solución de D2O 59

Figura 4.3: Estructura química de la Rodamina B 60

Figura 4.4: Espectros de absorción y fluorescencia normalizados de rodamina B en búfer fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de rodamina 9 μM para el espectro de absorción y 2,5 μM para el de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) 61

Figura 4.5: a) Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con M1C4; b) Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con M1C4 utilizando un modelo de asociación 1:1 (Ecuación E2); c) Ajuste

de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con MIC4 utilizando un modelo de asociación 2:1 matriz:huésped (Ecuación E3)	64
Figura 4.6: Estructura química del azul nilo	68
Figura 4.7: Espectros de absorción y fluorescencia normalizados de azul nilo en búfer fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de azul nilo 20 μ M para el espectro de absorción y 2 μ M para el de fluorescencia (λ_{exc} = 600 nm)	69
Figura 4.8: Estructura química de la tioflavina T	75
Figura 4.9: Espectros de absorción y emisión normalizados de la tioflavina T en búfer fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de tioflavina T 30 μ M para el espectro de absorción y 3 μ M para el de fluorescencia (λ_{exc} = 390 nm)	75

CAPÍTULO CINCO

Figura 5.1: Espectro de extinción de las nanopartículas de plata sintetizadas en este estudio	86
Figura 5.2: Histograma de distribución de tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata sintetizadas en este estudio. El análisis se presenta en triplicado	87
Figura 5.3: Espectro de extinción de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado. Se presentan los espectros de 11 vidrios diferentes, modificados en un mismo baño	89

Figura 5.4: Topografía (10 μm x 10 μm) e histograma de tamaño (Z) de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado con polímero catiónico	91
Figura 5.5: a) Topografía de la superficie (2 μm x 2 μm) e imagen tridimensional de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado con polímero; b) Imagen (120 nm x 120 nm, ampliada) de una sola partícula, imagen tridimensional de la partícula y medición del largo/ancho de ésta. La línea verde representa la longitud medida; c) Imagen de fase (20 μm x 20 μm) de la superficie	92
Figura 5.6: Espectro de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B sobre vidrio (negro) y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata (rojo)	94
Figura 5.7: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B y compuestos de inclusión de ésta sobre A) vidrio sin modificar; B) vidrio modificado con nanopartículas de plata	96
Figura 5.8: Espectro de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T sobre vidrio (negro) y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata (rojo)	101
Figura 5.9: Espectros de fluorescencia de tioflavina T y de sus compuestos de inclusión con M1C4 y M2C4 en sólido, sobre vidrio y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata	103
Figura 5.10: Esquema del vidrio modificado con nanopartículas de plata. Se representa la funcionalización del vidrio con polielectrolito catiónico MADQUAT y las nanopartículas interactuando con la carga positiva de la molécula orgánica	105

ANEXOS

Figura A1: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de glicoluril	123
Figura A2: Espectro de 1H-RMN (400 MHz, D2O) de CB[7]	124
Figura A3: Espectro de masas CB[7], solución 1 mg/mL	125
Figura A4: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de dimetilglicoluril	126
Figura A5: Espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de diéter tetracíclico de dimetilglicoluril	127
Figura A6: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de dímero de glicoluril	128
Figura A7: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de metil tetrámero	129
Figura A8: Espectro 1H-RMN (400 MHz, D2O) de hidroquinona C4-wall. Arriba: Integración de señales; abajo: aumento de resolución para calcular constantes de acoplamiento	130
Figura A9: Espectro 1H-RMN (400 MHz, D2O) de Motor 1	131
Figura A10: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO-d6) de 1,4-dihidroxinaftaleno	132
Figura A11: Espectro 1H-RMN (400 MHz, D2O) de naftoquinona C4-wall. Arriba: Integración de señales; abajo: aumento de resolución para calcular constantes de acoplamiento	133
Figura A12: Espectro 1H-RMN (400 MHz, D2O) de Motor 2	134
Figura A13: Espectro 13C-RMN (126 MHz, D2O) de Motor 2	135

Figura B1: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con β -ciclodextrina	136
Figura B2: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1	137
Figura B3: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con β -ciclodextrina	138
Figura B4: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1	139
Figura B5: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con CB[7]	140
Figura B6: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con CB[7]. Modelo de asociación 1:1	141
Figura B7: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con CB[7]	142
Figura B8: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con CB[7]. Modelo de asociación 1:1	143
Figura B9: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con M1C4	144

Figura B10: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con M1C4. Superior: Modelo de asociación 1:1. Inferior: Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped	145
Figura B11: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con M1C4	146
Figura B12: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con M1C4. Superior: Modelo de asociación 1:1. Inferior: Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped	147
Figura B13: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con M2C4	148
Figura B14: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con M2C4. Modelo de asociación 1:1	149
Figura B15: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con M2C4	150
Figura B16: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con M2C4. Modelo de asociación 1:1	151
Figura B17: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con β -ciclodextrina	152
Figura B18: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1	153

Figura B19: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con β -ciclodextrina	154
Figura B20: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1	155
Figura B21: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con CB[7]	156
Figura B22: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con CB[7]. Modelo de asociación 1:1	157
Figura B23: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con CB[7]	158
Figura B24: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con CB[7]. Modelo de asociación 1:1	159
Figura B25: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con M1C4	160
Figura B26: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con M1C4. Modelo de asociación 1:1	161
Figura B27: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con M1C4	162
Figura B28: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con M1C4. Modelo de asociación 1:1	163

Figura B29: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con M2C4	164
Figura B30: Variación del máximo de absorción a 650 nm en función de la concentración de M2C4 agregado en la titulación	165
Figura B31: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (0,2 μM) con M2C4	166
Figura B32: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con M2C4. Modelo de asociación 1:1	167
Figura B33: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con β -ciclodextrina	168
Figura B34: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia tioflavina T con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped	169
Figura B35: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μM) con CB[7]	170
Figura B36: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1	171
Figura B37: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con CB[7]	172
Figura B38: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped	173

Figura B39: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μM) con M1C4	174
Figura B40: Absorción a 412 nm de tioflavina T en función de la concentración de M1C4 agregado en la titulación espectrofotométrica UV-Vis	175
Figura B41: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con M1C4	176
Figura B42: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped	177
Figura B43: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μM) con M2C4	178
Figura B44: Absorción a 412 nm de tioflavina T en función de la concentración de M2C4 agregado en la titulación espectrofotométrica UV-Vis	179
Figura B45: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con M2C4	180
Figura C1: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@ β -ciclodextrina	181
Figura C2: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@CB[7]	182

Figura C3: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@M1C4	183
Figura C4: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@M2C4	184
Figura C5: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@ β -ciclodextrina	185
Figura C6: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@CB[7]	186
Figura C7: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@M1C4	187
Figura C8: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@M2C4	188
Figura C9: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@ β -ciclodextrina	189
Figura C10: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@CB[7]	190
Figura C11: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@M1C4	191
Figura C12: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@M2C4	192

Figura D1: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B y de los compuestos inclusión de ésta con las matrices supramoleculares en estudio, sobre vidrio sin modificar	193
Figura D2: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@ β -ciclodextrina (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata	194
Figura D3: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@cucurbit[7]uril (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata	195
Figura D4: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@M1C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata	196
Figura D5: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@M2C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo)	

y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata
..... 197

Figura D6: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T y de los
compuestos inclusión de ésta con las matrices supramoleculares en estudio, sobre vidrio
sin modificar 198

Figura D7: Espectros de fluorescencia en estado sólido de tioflavina T (negro), del
compuesto de inclusión tioflavina T@ β -ciclodextrina (azul) sobre vidrio sin modificar.
Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma
tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con
nanopartículas de plata 199

Figura D8: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del
compuesto de inclusión tioflavina T@cucurbit[7]uril (azul) sobre vidrio sin modificar.
Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma
tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con
nanopartículas de plata 200

Figura D9: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del
compuesto de inclusión tioflavina T@M1C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además,
se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo)
y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata
..... 201

Figura D10: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del compuesto de inclusión tioflavina T@M2C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata 202

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO CUATRO

Tabla 4.1: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de rodamina B con las matrices supramoleculares en estudio	62
Tabla 4.2: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de rodamina B en búfer	65
Tabla 4.3: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con rodamina B y las matrices supramoleculares en estudio	66
Tabla 4.4: Índices de refracción y polarizabilidades de distintos microambientes	67
Tabla 4.5: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de azul nilo con las matrices supramoleculares en estudio	71
Tabla 4.6: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de azul nilo en búfer	73
Tabla 4.7: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con azul nilo y las matrices supramoleculares en estudio	74
Tabla 4.8: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de tioflavina T con las matrices supramoleculares en estudio	77

Tabla 4.9: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de tioflavina T en búfer 78

Tabla 4.10: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con tioflavina T y las matrices supramoleculares en estudio 80

CAPÍTULO CINCO

Tabla 5.1: Factores de amplificación de fluorescencia de los distintos compuestos de inclusión de rodamina B con las matrices estudiadas, respecto a la emisión de la misma, en estado sólido 97

ABREVIACIONES

^{13}C-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono 13
^1H-RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones
Å	Unidad de longitud que corresponde a 10^{-10} m
AgNPs	Nanopartículas de plata
CB[n]	cucurbit[n]urilo, n corresponde al número de subunidades de glicoluril que presenta el macrociclo
HCl	Ácido clorhídrico
HNO₃	Ácido nítrico
K_a	Constante de asociación
M1C4	Motor 1
M2C4	Motor 2
NB	Azul Nilo
RhoB	Rhodamina B
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy (Espectroscopía Raman amplificada por superficies)

ThT	Tioflavina T
β-CD	β -ciclodextrina
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
ω	Frecuencia angular

RESUMEN

La amplificación de fluorescencia provocada por metales se refiere al uso de coloides metálicos o a nanopartículas metálicas en sistemas fluorescentes. Ofrece la oportunidad de modificar las propiedades de fluorescencia de los fluoróforos, ya sea en el campo cercano o lejano. Dentro de los beneficios que posee la amplificación de fluorescencia provocada por metales respecto a la técnica tradicional se pueden destacar: el aumento en la eficiencia de la emisión fluorescente, el aumento de la sensibilidad en la detección, la protección del fluoróforo contra el fotoblanqueo, aplicabilidad a casi cualquier molécula, incluyendo cromóforos intrínsecos y extrínsecos.

En esta tesis se investigó la amplificación de fluorescencia en estado sólido, utilizando nanopartículas de plata sobre vidrio modificado, de tres moléculas orgánicas: rodamina B, tioflavina T y azul Nilo. Para separar a las moléculas de la superficie modificada con nanopartículas, se utilizaron cuatro matrices supramoleculares: β -ciclodextrina, cucurbit[7]urilo, y dos derivados de calabadión, con diferente tamaño de la cadena lateral (motor 1 y motor 2). Los compuestos de inclusión de las matrices con los fluoróforos en estudio fueron caracterizados mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) y acoplamiento molecular (*docking*). Posterior a esta caracterización, se estudiaron las constantes de asociación entre los fluoróforos y las matrices, así como también, los cambios en las señales de absorción y emisión de las

moléculas incluidas. Para esto, se llevaron a cabo análisis de espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia.

Para realizar los estudios de amplificación de fluorescencia en estado sólido se modificaron vidrios con polímero policationico MADQUAT, sobre los cuales se depositaron nanopartículas de plata sintetizadas por métodos químicos. La superficie fue caracterizada mediante espectroscopía UV-Vis y microscopía de fuerza atómica. Finalmente, los compuestos de inclusión fueron depositados sobre la superficie modificada con nanopartículas y se estudiaron sus propiedades luminiscentes mediante espectroscopía de fluorescencia en estado sólido. Para rodamina B se observaron dos fenómenos independientes de amplificación de fluorescencia: uno debido a la presencia de la superficie nanoparticulada y otro debido a la inclusión de la molécula en las cavidades de las matrices supramoleculares. Al combinar estos dos efectos, se obtuvieron valores de amplificación de fluorescencia para la molécula incluida en las cuatro matrices diferentes del orden entre 30-60. Para tioflavina T, se obtuvieron amplificaciones de fluorescencia con las matrices acíclicas, sin embargo, se deben llevar a cabo estudios posteriores para determinar el fenómeno. A pesar de esto, el uso de matrices supramoleculares como separadores entre la superficie modificada con nanopartículas de plata y los fluoróforos se presenta como un método eficiente para mejorar las propiedades luminiscentes de colorantes orgánicos.

ABSTRACT

Metal-enhanced fluorescence refers to the use of metal colloids and nanoscale metallic particles in fluorescence systems. It offers the opportunity to modify the basic properties of fluorophores in both near- and far-field fluorescence formats. Benefits of metal-enhanced fluorescence compared to traditional fluorescence include: increased efficiency of fluorescence emission, increased detection sensitivity, protection against fluorophore photobleaching, applicability to almost any molecule, including both intrinsic and extrinsic chromophores.

In this work, we studied the fluorescence enhancement in the solid state, using silver nanoparticles deposited onto the surface of modified glass, of three organic molecules: rhodamine B, thioflavin T and Nile blue. To separate the molecules from the surface we tested four supramolecules: β -cyclodextrin, cucurbit[7]uril, and two calixarene derivatives with different lateral chain length (motor 1 and motor 2). Inclusion complexes of the fluorophores with the supramolecules were characterized by nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) and molecular docking. Then, we determined the association constants of the complexes and studied the changes in the absorption and fluorescence signals of the guests. To do so, UV-Vis and fluorescence analysis were performed.

Glass surface was modified with a cationic polymer (MADQUAT). Then, we proceeded to deposit silver nanoparticles over this modified surface to perform solid state fluorescence analysis. The surface was characterized by UV-Vis spectroscopy and atomic force microscopy. Finally, inclusion complexes were deposited over the silver nanoparticles modified surface and their luminescent properties were studied by solid state fluorescence spectroscopy. For rhodamine B we observed two independent behaviors of fluorescence enhancement: the first due to the presence of silver nanoparticles surface and the second due to the inclusion of the fluorophore inside the supramolecules' cavity. These two effects were combined to obtain enhancements with a factor of 30-60. For thioflavin T, we observed enhancements with the acyclic matrixes, however, more studies are needed to explain this behavior. Despite this, the approach of using supramolecular matrixes as separators between the surface and the fluorophore is presented as an efficient method to improve fluorescence properties of fluorescent probes.

1

Introducción

1.1 Cucurbit[n]urilo

Cucurbit[6]urilo (CB[6]) es un compuesto hexamérico macropolicíclico sintetizado mediante la condensación, catalizada por ácido, de glicoluril y formaldehído. Su nombre se debe a su parecido a una calabaza que pertenece a la familia Cucurbitaceae, y a un “cucurbit” que corresponde un recipiente conectado a la parte inferior de un alambique, sistema utilizado por los alquimistas para destilar¹.

Su síntesis fue reportada por primera vez en el año 1905², pero su naturaleza química y su estructura fueron desconocidas hasta el año 1981 en que Mock *et al.*¹ publicaron su completa caracterización. Probablemente, otros análogos de CB[n]s deben haber sido formados junto con CB[6] en las condiciones reportadas por Mock³, pero hubo que esperar hasta el año 2000 para el aislamiento y la caracterización estructural mediante difracción de rayos X de los tres nuevos miembros de la familia CB[n] por Kim *et al.*⁴, (CB[5], CB[7], CB[8]). Aproximadamente dos años después Day *et al.*^{3,5} identificaron y cristalizaron el complejo CB[5]⊂CB[10].

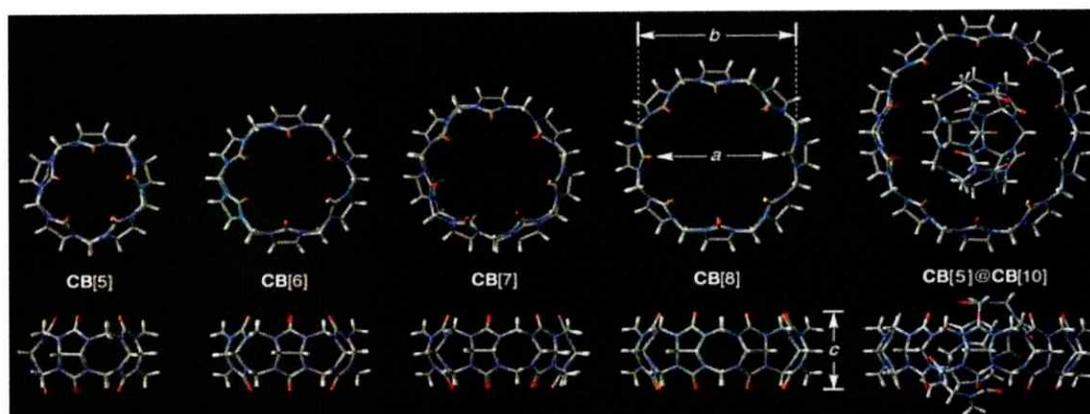


Figura 1.1: Estructuras cristalinas de rayos X de los CB[n]s ($n = 5 - 10$)⁶

1.1.1 Preparación y caracterización

Se han descrito varios procedimientos para la preparación de mezclas de CB[n]s, todos basados, en general, en los protocolos desarrollados por Day³, Kim⁴ e Isaacs⁷. Generalmente, una mezcla de glicoluril, formaldehído acuoso o paraformaldehído, y ácido clorhídrico o sulfúrico (concentrado, o diluido hasta aproximadamente 5 M) se calienta entre 80°-100°C durante 10-100 h. La evaporación y consecutivas precipitaciones en agua y metanol proporcionan la mezcla de CB[n]s ($n = 5 - 8$, siendo CB[6] el componente mayoritario), así como trazas de CB[5]@CB[10]. La separación de cada componente está basada en sus diferentes solubilidades en agua, agua/metanol y ácido clorhídrico diluido. Una variación útil, es la propuesta por Day³, y repetida por Halterman⁸ y Leventis⁹, en la cual los autores utilizan una solución caliente de glicerol acuoso al 20% para extraer CB[7] de la mezcla de CB[n]s con buena selectividad. Recientemente, Scherman¹⁰ reportó una separación alternativa de CB[5] y CB[7], amigable con el medio ambiente: CB[7] puede

precipitarse selectivamente bajo complejación con bromuros de 1-alkil-3-metilimidazol e intercambio aniónico con hexafluorofosfato de amonio. CB[5] fue recrystalizado de la fase acuosa. En un estudio posterior, Scherman¹¹ reportó la separación de los componentes poco solubles de los CB[n]s. CB[8] puede complejarse selectivamente con bromuro de naftil metil imidazol, aumentando su solubilidad en agua de manera dramática. CB[6] permanece insoluble en la mezcla acuosa y es posible separarlos. El CB[6] que permanece insoluble, es disuelto en un solución acuosa de bromuro de etil metil imidazol, y luego desacomplejado mediante metátesis en estado sólido. Los métodos de purificación se resumen en los siguientes esquemas:

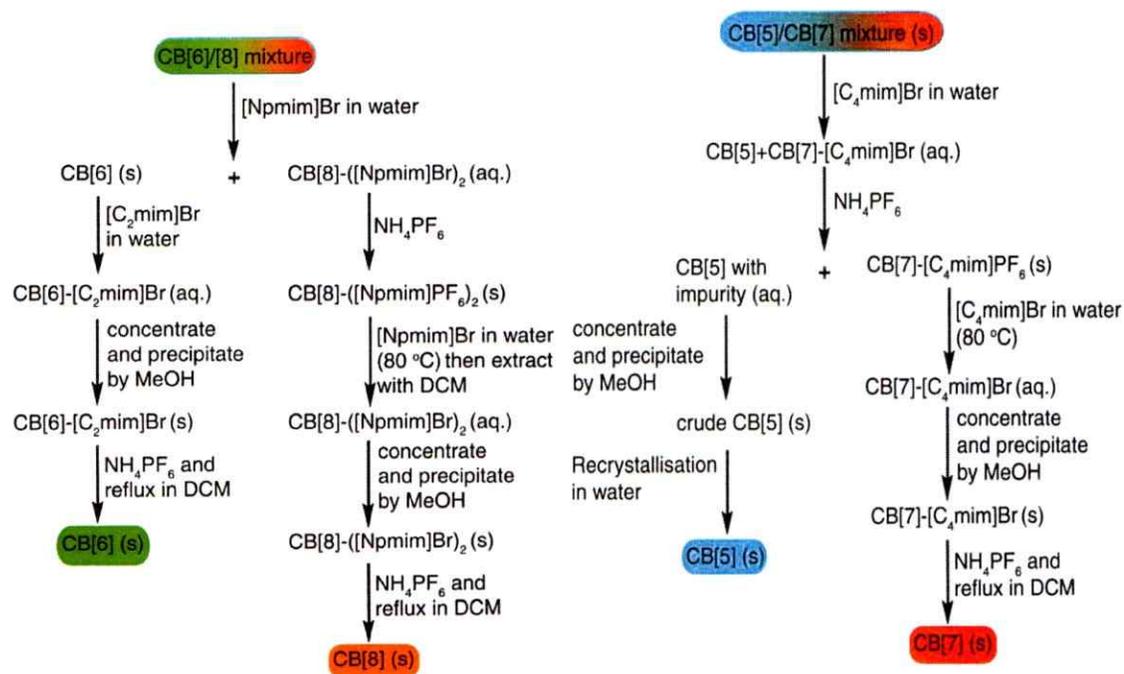


Figura 1.2: Métodos de purificación de CB[n]s amigables con el medio ambiente, utilizando sales de alquil-, aril- imidazol¹¹

Además del análisis elemental, la pureza de los macrociclos puede determinarse mediante C^{13} -RMN, debido a que los corrimientos químicos de los carbonos se desplazan a campo bajo a medida que aumenta el número de monómeros que componen el macrociclo, a lo largo de la serie de CB[n]s^{4,7}

1.1.2 Propiedades fundamentales de CB[n]s

Los CB[n]s poseen dos anillos de grupos carbonilos y una cavidad hidrofóbica. La profundidad total de los macrociclos es de 9,1 Å, si se incluye el radio de van der Waals de los átomos de oxígeno. El ancho de la cavidad de CB[5]-CB[8] varía entre 4,4 y 8,8 Å. El diámetro del portal de los CB[n]s es aproximadamente 2 Å más estrecha que la cavidad del macrociclo lo cual resulta en una unión constrictiva que produce barreras estéricas significativas a la asociación y disociación del huésped¹².

Una de las potenciales limitaciones de la familia CB[n] es su relativamente baja solubilidad en agua: CB[6] y CB[8] son prácticamente insolubles (<50 µM), mientras CB[5] y CB[7] presentan modesta solubilidad (3 - 4 mM). Como en la urea, sin embargo, los carbonilos que rodean los portales de entrada de los CB[n]s se comportan como bases débiles. Debido a esto, la solubilidad de CB[5]-CB[8] aumenta dramáticamente en soluciones acuosas concentradas de ácido^{13,14,15}.

Una de las características sobresalientes de CB[5]-CB[8] es su alta estabilidad térmica:

análisis termo-gravimétricos muestran que exceden la temperatura de 370°C en todos los casos.

1.1.3 Cucurbit[7]urilo

CB[7] es un macrociclo atractivo para el estudio de las propiedades fluorescentes de colorantes orgánicos. CB[7] exhibe una amplia cantidad de efectos deseables en las propiedades fluorescentes de colorantes orgánicos en agua, dentro de la que se destaca el aumento de la estabilidad térmica y fotoquímica de los fluoróforos, las cuales son acompañadas, dependiendo de la especie, por un aumento del brillo. Estas propiedades están relacionadas a la naturaleza de la cavidad de CB[7], en particular a su baja reactividad química y a su baja polarizabilidad. Además, las constantes de asociación determinadas por titulaciones espectrofotométricas y de fluorescencia son altas (10^4 - 10^5 M⁻¹ para la formación de complejos 1:1), lo que permite el uso de concentraciones bajas de CB[7], asegurando una formación del complejo virtualmente cuantitativa (>90%)¹⁶.

Se han estudiado ciclodextrinas^{17,18} (CDs) y calixarenos solubles en agua¹⁹ como macrociclos para mejorar las propiedades fluorescentes de los colorantes en agua. Se han observado mejoras, principalmente afectando la desagregación de los fluoróforos²⁰ en la solución, sin embargo, la adición de CDs no presenta una aproximación general y frecuentemente provoca efectos no deseados, particularmente en la reducción del brillo, por ejemplo, para colorantes xantenos, los cuales presentan rendimientos cuánticos muy altos en ausencia de aditivos²¹. Además, las constantes de asociación que exhiben las CDs

con los colorantes orgánicos son generalmente pequeñas (10^2 - 10^3 M⁻¹)^{19,21} lo que requeriría concentraciones excesivas de la matriz para asegurar una formación del complejo virtualmente cuantitativa. Por tanto, las matrices supramoleculares de cucurbiturilos se proponen como un método novedoso y eficaz para la amplificación de fluorescencia de colorantes orgánicos.

1.1.4 Cucurbiturilos acíclicos

Una de las limitaciones de las matrices de cucurbit[n]urilos, comparados con otras matrices como por ejemplo ciclodextrinas y calixarenos, es la dificultad para su funcionalización. Dos métodos han sido utilizados a la fecha 1) la utilización de subunidades de glicoluril funcionalizadas y 2) la oxidación del macrociclo de CB[n] para generar derivados perhidroxilados, haciendo reaccionar los grupos hidroxilos para generar los sustituyentes deseados²². En el curso de detalladas investigaciones acerca del mecanismo de la formación de los CB[n]s, Isaacs^{23,24} ha preparado otros tipos de CB[n], tales como nor-seco-CB[n] (con uno o más enlaces metileno faltantes) y oligómeros de cucurbiturilos acíclicos. La dificultad en la funcionalización de los CB[n]s cíclicos puede ser disminuida trabajando con versiones acíclicas de los CB[n]s²⁵, de tal forma que los grupos de glicoluril terminales pueden ser funcionalizados con sustituyentes apropiados²⁶. Dentro de este grupo de receptores se encuentran los compuestos denominados calabadión 1 y 2 (figura 1.3), en los cuales los tetrámeros de glicoluril son terminados con grupos fenilos o naftilos disustituídos. Las matrices acíclicas de tetrámeros de glicoluril pueden ser sintetizadas utilizando materiales de partida económicos, mediante tres pasos

partiendo desde glicoluril, el derivado biséter de glicoluril, y los anillos aromáticos disustituídos terminales. Al igual que las matrices de CB[n]s, estos receptores acíclicos con forma de C tienen una endocavidad hidrofóbica, que le permite unir porciones hidrofóbicas de ciertos huéspedes, y un par de grupos carbonilos por subunidad de glicoluril que facilitan interacciones ion-dipolo con porciones catiónicas presentes en el huésped. Los tetrámeros acíclicos de glicoluril están terminados con anillos aromáticos fenilo o naftilo, favoreciendo interacciones $\pi - \pi$ con huéspedes aromáticos. Además, los calabaciones contienen grupos sulfonato en las porciones aromáticas de la molécula que aumentan su solubilidad en agua y proveen interacciones ion - ion adicionales con los huéspedes. Estos receptores flexibles han mostrado, a través de la formación de complejos huésped - matriz, aumentar la solubilidad en agua de huéspedes poco solubles ^{27,28}.

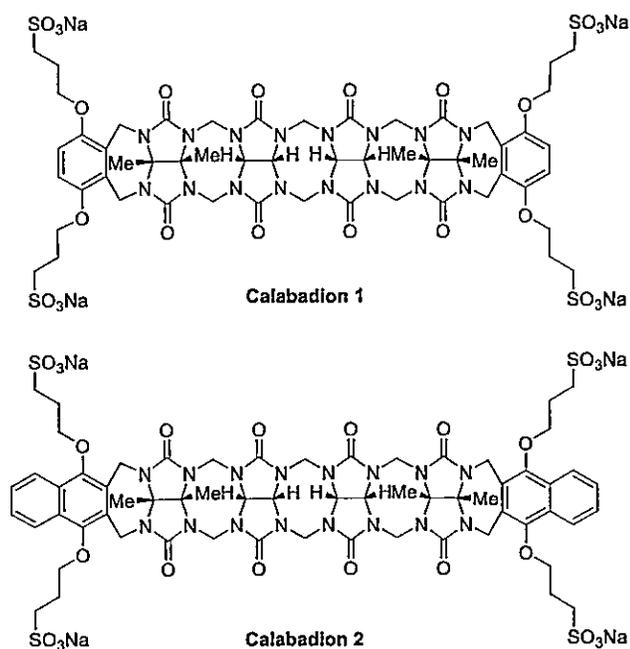


Figura 1.3: Estructuras químicas de calabación 1 y calabación 2

Los derivados acíclicos que presentan grupos sulfonato en su estructura son más solubles en agua (346 mM para el calabadión 1, 18 mM para el calabadión 2) que los CB[n]s cíclicos (20 mM para el CB[7]) y exhiben cinéticas de intercambio de las moléculas huéspedes más rápidas que los derivados cíclicos. Los calabadios tienen baja tendencia a autoasociarse, a pesar de la presencia de anillos aromáticos en su estructura²⁷. La naturaleza acíclica de estos derivados les permite variar el tamaño de sus cavidades para adaptarse al tamaño del huésped y así maximizar el efecto hidrofóbico²⁹. La adición de cuatro cadenas laterales alquílicas, terminadas con grupos carboxilato o sulfonato aniónicos, resulta en interacciones electroestáticas favorables con centros de amonio cuaternario, además de aumentar su solubilidad en agua³⁰.

1.2 Interacción macrociclo-fluoróforo

La excitación al estado excitado singulete genera diferentes caminos de desactivación, incluyendo decaimiento radiativo (k_r), transferencia de energía resonante de Förster (k_{FRET}), formación de fotoproducto (k_p), conversión interna (k_{IC}), entrecruce de sistemas (k_{ISC}), apagamiento inducido por solvente, y apagamiento debido a aditivos o al oxígeno. Los efectos observados de fluorescencia luego de la complejación huésped/matriz, ya sea apagamiento o aumento, puede rastrearse, en la mayoría de los casos, por efectos predominantes en la constante de velocidad de un solo proceso. En la mayoría de los casos, los efectos de la complejación por inclusión son entendidos satisfactoriamente en términos de los efectos en k_{IC} , relacionados con i) la re localización del fluoróforo dentro de un ambiente más hidrofóbico en la cavidad de la matriz³¹⁻³³ o ii) el confinamiento geométrico

del cromóforo dentro de la matriz, el cual restringe grados de libertad rotacional y vibracional^{16,34,35}, desfavoreciendo caminos de decaimiento no radiativo. Adicionalmente, bajo complejación, el fluoróforo podría estar también “mecánicamente” protegido de apagadores externos (intermoleculares), incluyendo al solvente y al oxígeno, por las paredes del macrociclo^{36,37}. El solvente puede interactuar con un fluoróforo excitado, entre otras formas, por reacciones de transferencia de hidrógeno³⁸⁻⁴¹, y puede promover procesos de ionización simples o multi fotónicos⁴¹⁻⁴³, todos los cuales pueden causar un apagamiento permanente del cromóforo mediante reacciones químicas irreversibles a menos que los estados fundamentales sean recuperados eficientemente por “intersección cónica a lo largo del camino de reacción”^{38-41,43,44}. Lo último es frecuentemente el caso de los procesos de abstracción de hidrógeno^{38,39,41} y los procesos que involucran formación de exímeros⁴⁴. Como resultado de la encapsulación, la agregación de fluoróforo puede verse impedida, causando cambios notables en las propiedades fotofísicas de la solución que contiene al fluoróforo^{35,37,45-49}. En otros casos, la formación de dímeros puede ser promovida por matrices con grandes cavidades (CB[8])⁵⁰. De manera interesante, interacciones periféricas (asociación sobre inclusión) entre la matriz y la molécula de fluoróforo pueden causar cambios en la fluorescencia mediante agregaciones mediadas por la matriz cerca de los portales del macrociclo⁵¹.

Además de los efectos fotofísicos en los fluoróforos causados por los cambios en el microentorno, confinamiento, y apagamiento difusional; cambios en el equilibrio químico, particularmente en el equilibrio de protonación, pueden causar variaciones pronunciadas en las propiedades ópticas. Por ejemplo, los CB[n]s pueden causar cambios

significativos en el pKa de las moléculas huéspedes en el estado fundamental⁵²⁻⁵⁵ así como en el estado excitado⁵⁶⁻⁵⁸.

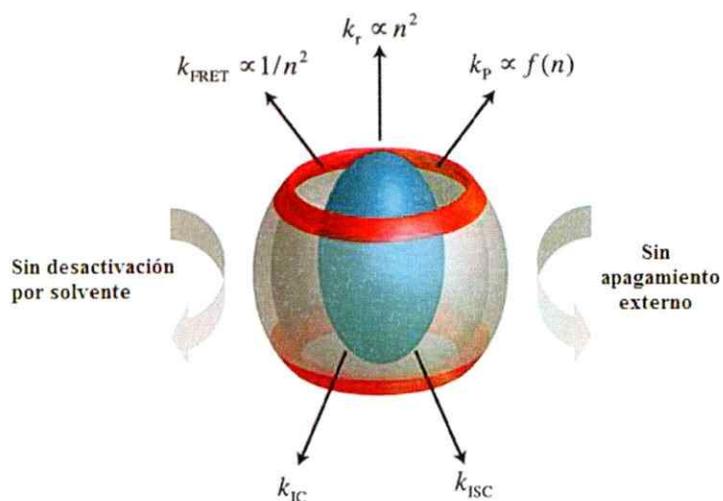


Figura 1.4: Caminos de decaimiento foto-físicos para el estado excitado de fluoróforos incluidos en el macrociclo⁵⁹.

1.3 Nanoestructuras metálicas

Las nanopartículas metálicas (MNPs) han ganado mucho interés en ciencia y tecnología debido a sus propiedades específicas dependientes del tamaño las que pueden ser utilizadas en tecnologías futuras como aplicaciones en sensores⁶⁰⁻⁶², diagnóstico médico⁶³, catálisis^{64,65} o en nanoelectrónica^{66,67}, entre otras. Las MNPs exhiben una buena

estabilidad química y pueden ser funcionalizadas con cualquier molécula donadora de electrones. Hasta ahora, se han desarrollado muchos protocolos para obtener MNPs en una, dos o tres dimensiones⁶⁸. Diferentes conceptos han sido desarrollados para el diseño de materiales nuevos con propiedades altamente específicas, basados en las propiedades únicas de las MNPs, ya sea de una de ellas o en un conglomerado, a causa de sus acoplamientos dipolar, magnético o electrónico^{66,67}.

Existen dos técnicas diferentes para preparar MNPs: métodos químicos y físicos. Los métodos químicos típicamente, involucran la descomposición o precipitación de un precursor que contenga el metal en su estructura. Estos métodos son los más ampliamente utilizados debido a la disponibilidad de los reactivos y el bajo costo a escala de laboratorio. Los métodos físicos, típicamente, involucran la producción de átomos o clústers del metal en fase gaseosa^{69,70}. Otro método de preparación, puede describirse brevemente como el bombardeo, con un plasma de argón, de una lámina metálica de alta pureza, seguido de una deposición de los átomos o clústers de oro sobre un sustrato elegido, para crear una dispersión uniforme de MNPs⁷¹. Esta técnica presenta ciertas ventajas sobre los métodos ya descritos. Por ejemplo, no presenta contaminación por solvente o de los precursores en la superficie de deposición. El procedimiento es económico y amigable con el medio ambiente, debido a que el exceso de oro es recuperado de la cámara y no hay residuos líquidos⁷².

1.4 Amplificación de fluorescencia por superficies metálicas

Los primeros reportes experimentales y teóricos sobre fluorescencia amplificada por metales (SEF, por surface enhanced fluorescence) datan de los años 70s y 80s⁷³⁻⁷⁸, pero tales aumentos eran opacados por aquéllos mucho mayores (del orden de 10^5 - 10^{10}) observados en SERS⁷⁹⁻⁸¹. Sin embargo, pocos años atrás, se ha notado que grandes amplificaciones de la fluorescencia (acompañadas por la eliminación de la fotodegradación debida al acortamiento de los tiempos de vida del estado excitado) deberían ser posibles para fluoróforos depositados cerca de partículas metálicas bajo condiciones cuidadosamente optimizadas. Además, la fluorescencia es tan ampliamente utilizada en dispositivos ópticos, imágenes de microscopio, biología, investigación médica, y en diagnóstico que mejorar la sensibilidad al límite de la detección de una sola molécula representa un gran desafío. Para su uso en aplicaciones médicas y biotecnológicas, tales como diagnóstico o dispositivos microfluídicos, sería útil obtener SEF en los lugares deseados donde medirá el dispositivo. En vista de esto, la posibilidad de utilizar coloides de metales y partículas anisótropas, ha sido ampliamente investigada⁸²⁻⁸⁷.

La localización de la luz juega un rol importante en SEF. Estudios han mostrado como el campo electromagnético (EM) puede ser aumentado significativamente cerca de objetos y superficies metálicas cuando el tamaño de éstos es mucho menor que la longitud de onda utilizada y/o detectada. Cuando los objetos metálicos son mucho más pequeños que la longitud de onda, los campos magnéticos y eléctricos pueden ser localizados, dando origen

a heterogeneidades en la distribución de campo EM⁸⁸ que pueden ser utilizadas para producir un aumento EM local.

Estas heterogeneidades pueden utilizarse para excitar específicamente a un fluoróforo dado. Ellas son unas de las principales fuentes de amplificación. Cualquier localización de intensidad EM cerca de nanoestructuras metálicas que se acoplen a los modos de propagación puede aumentar la fluorescencia en varios órdenes de magnitud. Estas intensidades EM altas, se aplican a potenciar varios efectos no lineales tales como generación de armónicos secundarios⁸⁹⁻⁹² o al *scattering* Raman^{93,94}.

Las notables propiedades de los sistemas metálicos surgen debido al fuerte acoplamiento entre el fluoróforo y la superficie plasmón-resonante de los metales⁹⁵. Dependiendo de la frecuencia de emisión del fluoróforo ω , la distancia d entre el fluoróforo y el metal⁹⁶, y en el tamaño de la nanoestructura metálica, existen diferentes interacciones con efectos dramáticamente distintos:

- Para regímenes de baja frecuencia, $\omega \leq \omega_{SP}$ de donde ω_{SP} es la frecuencia del plasmón de superficie, y cuando la distancia d es del orden de 1 nm, el fenómeno dominante es el amortiguamiento de Landau⁹⁷, un amortiguamiento eficiente de la fluorescencia.
- Para $\omega \sim \omega_{SP}$, la excitación coherente del plasmón de superficie tiene lugar cuando $d \geq 1$ nm y cuando el metal es nanoestructurado. El metal puede actuar como una

nanoantena potenciando la fuerza del oscilador del dipolo y, por tanto, se espera que la fluorescencia sea potenciada. Es importante mencionar que esta amplificación puede ser provocada en diversos fenómenos ópticos donde la señal, usualmente, es muy baja. Algunos ejemplos son: *scattering* Raman amplificado por superficies (SERS)^{93,98}, efectos no lineales fuertemente aumentados⁹⁹ como fotoluminiscencia¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ y control coherente¹⁰⁵, y la amplificación por plasmón de superficie de emisión de radiación estimulada (SPACER), predicho por Bergman and Stockman¹⁰⁶.

- Para $\omega \sim \omega_{SP}$, $d \geq 1$ nm para un metal de extensión macroscópica, pero no para nanoestructuras, los modos de propagación de los polaritrones de plasmón de superficie (SPPs) son los excitados. En este caso, el sistema metálico juega un rol de antena óptica que propaga la excitación del fluoróforo en el campo lejano^{95,107}. Esto produce un aumento en la eficiencia y en la intensidad de la fluorescencia y un acortamiento del tiempo de ésta.

1.5 Hipótesis de trabajo

Moléculas orgánicas fluorescentes incluidas en matrices supramoleculares, depositadas sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata, presentarán una amplificación de su fluorescencia, adicional al producido por el fenómeno de inclusión; esto es, una amplificación promovida por la presencia cercana de una superficie metálica nanoparticulada.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la influencia de los procesos de inclusión y de las superficies metálicas nanoparticuladas a los procesos de amplificación de fluorescencia, mediante el diseño, síntesis y formación de arquitecturas supramoleculares conjugadas con nanoestructuras metálicas.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar, purificar y caracterizar cucurbit[7]urilo
- Sintetizar y caracterizar dos derivados acíclicos de glicoluril M1C4 y M2C4
- Estudiar la autoasociación de M2C4 en agua
- Estudiar la formación de compuestos de inclusión de β -ciclodextrina, cucurbit[7]urilo y de los derivados acíclicos con tres moléculas orgánicas fluorescentes (rodamina B, azul nilo y tioflavina T)
- Determinar las constantes de asociación y los tiempos de vida de fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con las moléculas orgánicas fluorescentes
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata utilizando métodos químicos

- Modificar vidrio con nanopartículas de plata sintetizadas mediante métodos químicos
- Depositar sobre vidrio modificado compuestos de inclusión de los tres fluoróforos estudiados con las cuatro matrices supramoleculares
- Estudiar la amplificación de fluorescencia de los fluoróforos en estado sólido mediante espectroscopía de fluorescencia.
- Estudiar y proponer modelos explicativos que correlacionen la estructura con los cambios en las propiedades fotofísicas de los colorantes en estudio.

2

Parte Experimental

2.1 Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos comercialmente y utilizados sin ningún proceso de purificación adicional, a excepción de la β -ciclodextrina la cual fue secada al vacío previo a su utilización.

2.2 Síntesis de compuestos

2.2.1 Glicoluril (tetrahidroimidazo[4,5-d]imidazol-2,5(1H,3H)-diona)¹

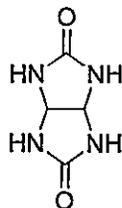


Figura 2.1: Glicoluril

Se mezclan 30 g (0,5 mol) de urea, 22 ml (0,15 mol) de solución de glioxal al 40% en 150 ml de agua a temperatura ambiente. Se agregan, gota a gota, 4 ml de ácido clorhídrico

concentrado. La solución se agita por 72 horas a temperatura ambiente. El precipitado obtenido es filtrado, lavado tres veces con 20 ml de agua y dos veces con 20 ml de etanol. Se seca al vacío y finalmente se recrystaliza desde agua. (15,94 g, 45%) ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.14 (s, 4H), 5.23 (s, 2H).

2.2.2 CB[7]²

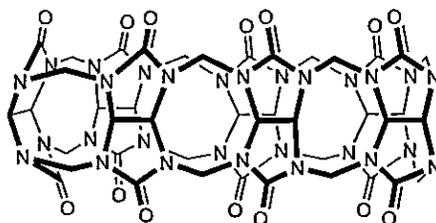


Figura 2.2: Cucurbit[7]urilo

En un vaso de precipitados de 300 ml se agregan glicoluril (20 g, 140.7 mmol), paraformaldehido (8.45 g, 281.5 mmol) y HCl 5M (150 mL). La mezcla se calienta a 80°C durante 8 días. Durante este período se continúa la adición de HCl 5M para mantener el volumen constante. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se filtra. Al filtrado, se agregan 400 mL de metanol y se deja decantar por un día. La mezcla se filtra y el sólido se lava con metanol (2 x 100 mL). Luego, el sólido seco se vacía sobre una solución de glicerol acuoso al 20% v/v (500 mL). La mezcla es calentada a 80°C durante 3 h, luego se filtra. Al filtrado se agrega metanol (400 mL) y la mezcla se deja reposar por una noche. Finalmente el sólido obtenido se filtra y se lava con metanol (3 x 100 mL) para obtener CB[7] como un sólido blanco (5.24 g, 23%) ^1H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.72 (d, J = 15.5 Hz, 14H), 5.53 (s, 14H), 4.23 (d, J = 15.5 Hz, 14H).

2.2.3 Espectrometría de masas

Se preparó una muestra de concentración 1 mg/mL de CB[7] en agua. Se tomó una alícuota de 1 μ L de esta solución y se mezcló con 1 μ L de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA; preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo 50% v/v y ácido fórmico 0,1 %) en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

La adquisición del espectro de masa se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo de ión positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros, se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 700 – 1800 Da. Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

El espectro final corresponde a la suma de 10 barridos de 30 impactos de láser (300 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de la mezcla depositada en la placa porta muestra.

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa mMass versión 5.5.0³. Para la detección de las señales m/z monoisotópicas de los espectros adquiridos se utilizó el algoritmo MALDI-TOF Peptides utilizando los parámetros por defecto (razón señal/ruido de 3,5 y un límite de intensidad relativa de 0,5%). El análisis de los aductos se realizó por

medio de la herramienta MS Adduct Calculator⁴.

En la figura A3 (ver Anexos) se muestra el espectro de masas para CB[7] con concentración 1 mg/mL. En base a las señales m/z observadas en el espectro se estimó una masa monoisotópica de 1162,3569 g/mol a partir de la cual se explicarían las señales m/z 1163, m/z 1185, m/z 1201 y m/z 2325 que corresponderían a la forma protonada (especie $[M+H]^+$), al aducto sódico (especie $[M+Na]^+$), al aducto potásico (especie $[M+K]^+$) y a la forma dimérica protonada (especie $[2M+H]^+$), respectivamente.

2.2.4 Dimetil glicoluril⁵

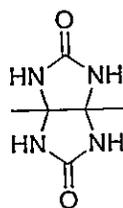


Figura 2.3: Dimetil glicoluril

Una solución de urea (30 g, 0.5 mol) en HCl 0,3 M (74 mL) es tratada con 2,3-butanodiona (13.15g, 0.15 mol). La solución es agitada a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla de reacción es filtrada y el sólido es lavado con agua (2 x 50 mL) y luego con etanol (50 mL) para obtener el producto como un sólido blanco (19.7 g, 76%) ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.07 (s, 4H), 1.32 (s, 6H).

2.2.5 Diéter tetracíclico de dimetil glicoluril⁵

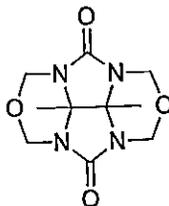


Figura 2.4: Diéter tetracíclico de dimetil glicoluril

Una suspensión de 3,91 g de dimetilglicoluril (23 mmol), 8 ml de solución de formaldehído al 37%, 5 ml de agua y 16 ml de ácido clorhídrico concentrado se agita por 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregan 70 ml de agua a la mezcla de reacción y se agita por 12 h más. El precipitado formado se filtra, se lava tres veces con 50 ml de agua y dos veces con 20 ml de etanol. El producto se recrystaliza desde metanol y se obtienen cristales transparentes. (3,2 g, 53%) ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 5.20 (d, J = 11.4 Hz, 4H), 4.99 (d, J = 11.4 Hz, 4H), 1.80 (s, 6H).

2.2.6 Dímero de glicoluril⁵

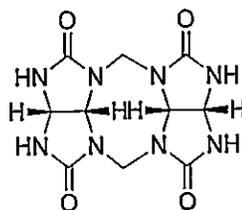


Figura 2.6: Dímero de glicoluril

Una mezcla de glicoluril (50 g, 0.351 mol) y paraformaldehído (10.5 g, 0.351 mol) en HCl 8M (70 mL) se calienta a 50 °C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo la mezcla de reacción se enfría y se filtra. El sólido obtenido es lavado con agua (50 mL) y luego recristalizado desde TFA (150 mL) para obtener el producto como un sólido blanco (33 g, 61%) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 7.65 (s, 4H), 5.59 (d, J = 14.4 Hz, 2H), 5.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.23 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 4.03 (d, J = 14.5 Hz, 2H).

2.2.7 Metil tetrámero⁵

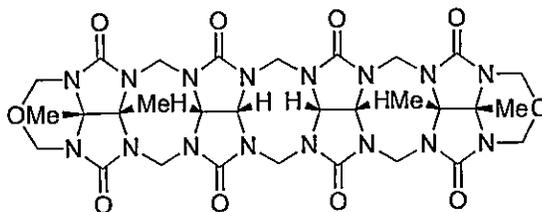


Figura 2.7: Metil tetrámero

A una mezcla de 8,4 g de dímero de glicoluril en 62 mL de ácido metanosulfónico se añaden 30,4 g de diéter tetracíclico de dimetilglicoluril. La mezcla se calienta a 50 °C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vierte en 700 mL de acetona y se obtiene un precipitado, el cual se filtra al vacío. El sólido se lava 2 veces más con 700 mL de acetona y luego dos veces con 700 mL de agua. Finalmente, el sólido es lavado dos veces con 700 mL de una solución 5 mM de 1,6-hexanodiamina diclorhidrato. El sólido es filtrado y secado al vacío. (12.20 g, 60%) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 5.68 (d, J = 14.5 Hz, 2H), 5.58 – 5.50 (m, 6H), 5.42 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 5.16 (d, J = 10.8 Hz, 4H),

4.83 (d, $J = 10.9$ Hz, 4H), 4.29 – 4.17 (m, 6H), 1.80 (s, 6H), 1.62 (s, 6H).

2.2.8 Hidroquinona C4 wall

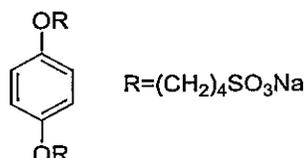


Figura 2.8: Hidroquinona C4-wall

8.162 g (0.0742 mol) de hidroquinona en una solución acuosa de NaOH 2,5 M (114 mL) es tratada con una solución de 1,4-butanosultona (25 g, 0.183 mol) disuelta en 1,4-dioxano (147 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 horas y luego es filtrada. El sólido obtenido se lava con acetona (2 x 160 mL) y luego es secado para obtener el producto como un sólido blanco (24.04 g, 76%) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 6.99 (s, 4H), 4.07 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 2.97 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.91 – 1.87 (m, 8H).

2.2.9 Motor 1

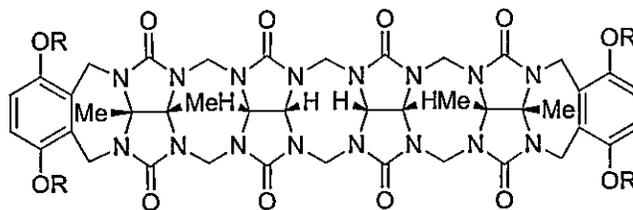


Figura 2.9: Motor 1 (M1C4)

Una solución de metil tetrámero (1 g, 1.27 mmol) en TFA (9.2 mL) es tratada con hidroquinona C4 wall (2,17 g, 5.09 mmol). La mezcla es agitada y calentada a 70 °C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo, la mezcla es enfriada a temperatura ambiente y se le agrega acetona hasta precipitación completa de un sólido blanco. El sólido es filtrado y secado al vacío. Luego es lavado con una mezcla de acetona/agua (2:1, 20 mL). El sólido lavado y secado se redisuelve en agua y el pH es ajustado a 7 mediante la adición de una solución de NaOH 1M. Finalmente se agrega acetona para hacer precipitar el compuesto, el cual se lava con acetona y se seca al vacío para obtener el contendor 1 como un sólido blanco (150 mg) ¹H NMR (400 MHz, D2O) δ 6.99 (s, 4H), 5.60 (d, J = 15.3 Hz, 2H), 5.49 (d, J = 15.7 Hz, 4H), 5.39 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 5.35 – 5.28 (m, 6H), 4.24 (d, J = 15.7 Hz, 4H), 4.17 (d, J = 16.1 Hz, 4H), 4.04 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 3.89 – 3.72 (m, 8H), 2.85 – 2.53 (m, 8H), 1.85 – 1.41 (m, 28H).

2.2.10 1,4-dihidroxi-naftaleno

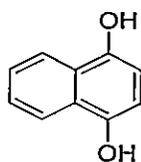


Figura 2.10: 1,4-dihidroxi-naftaleno

1,4-naftoquinona (20 g, 126.5 mmol) se suspende en tolueno (100 mL). Se añade una solución de ditionito de sodio (30 g, 172.3 mmol) en agua (100 mL) y la temperatura de la mezcla aumenta a 45 °C. La mezcla se agita toda la noche a temperatura ambiente. El precipitado es filtrado al vacío, resuspendido en hexano, se filtra nuevamente y se seca a

alto vacío (20 g, 99.1 %) ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.31 (s, 2H), 8.03 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 6.66 (s, 2H).

2.2.11 Naftoquinona C4 wall

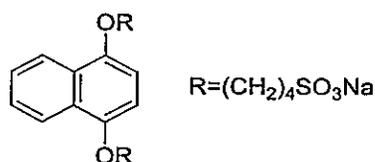


Figura 2.11: Naftoquinona C4-wall

A una solución de 1,4-dihidroxinaftaleno (2.0 g, 12.5 mmol) en NaOH acuoso (10 wt%, 16 mL), se agrega una solución de 1,4-butanosulfona (4.2 g, 31.2 mmol) en 1,4-dioxano (24 mL). Esta solución se agita a temperatura ambiente por 12 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vacía sobre 200 mL de metanol y el sólido que se forma es filtrado. El sólido seco se disuelve en agua y se precipita agregando etanol a la solución. El sólido gris es filtrado y secado a alto vacío (1.53 g, 25.8%) ^1H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.26 – 8.09 (m, 2H), 7.66 – 7.48 (m, 2H), 6.82 (s, 2H), 4.11 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H), 3.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.07 – 1.87 (m, 8H).

2.2.12 Motor 2

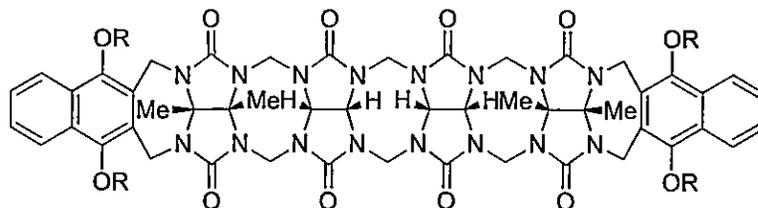


Figura 2.12: Motor 2 (M2C4)

A una solución de metil tetrámero (1.92 g, 2.46 mmol) en TFA/Ac₂O (1:1, 16 mL) se agrega naftoquinona C4 wall (4.69 g, 9.84 mmol). La mezcla se agita y se calienta a 70°C por 3 h y luego se vierte sobre MeOH (200 mL). El sólido se filtra y se seca al vacío. Una vez seco, se disuelve en agua y se ajusta el pH a 7 con una solución acuosa de NaOH 1 M. Luego, se agrega etanol a la solución para obtener un precipitado, el cual se filtra al vacío. Se repite el proceso de recristalización una vez más (si es necesario). Finalmente, el sólido es secado a alto vacío. (1.75 g, 42%). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.87 (dd, J = 6.1, 3.2 Hz, 4H), 7.44 (dd, J = 6.2, 3.0 Hz, 4H), 5.55 – 5.32 (m, 12H), 5.26 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.40 (d, J = 16.2 Hz, 4H), 4.22 (d, J = 15.7 Hz, 4H), 4.10 – 4.02 (m, 4H), 3.97 (d, J = 15.3 Hz, 2H), 3.85 – 3.76 (m, 4H), 2.94 – 2.69 (m, 8H), 1.98 – 1.65 (m, 28H). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 157.96 (s), 157.20 (s), 149.63 (s), 129.19 (s), 128.66 (s), 127.96 (s), 124.01 (s), 79.96 (s), 78.65 (s), 76.74 (s), 72.91 (s), 72.56 (s), 54.34 (s), 52.26 (s), 49.94 (s), 37.52 (s), 29.83 (s), 22.51 (s), 16.86 (s), 16.34 (s),

2.3 Autoasociación de motor 2

2.3.1 Cálculo de la constante de autoasociación del Motor 2 mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones ^1H -RMN

Para estudiar la posible autoasociación del motor 2 en solución acuosa, debido a la presencia de anillos de naftaleno en su estructura, se llevó a cabo un estudio de concentración en óxido de deuterio por resonancia magnética nuclear de protones. Los espectros fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance III HD (400 MHz). Se prepararon soluciones de concentración creciente y se evaluaron los corrimientos químicos de la señal en 3,87 ppm. Los datos obtenidos fueron graficados (desplazamiento químico en función de la concentración del compuesto) y el gráfico fue ajustado utilizando un modelo de autoasociación (ecuación E1) utilizando el software OriginPro 2016. El modelo matemático utilizado se presenta a continuación.

2.3.2 Modelo de autoasociación RMN

Ecuación de ajuste de los datos

$$\delta = y = \delta_o + (\delta_a - \delta_o) * \left(\frac{[A_2]}{2[A]_o} \right) \quad (2.1)$$

Donde y corresponde al corrimiento químico de la señal escogida, $[A]_o$ corresponde a la concentración inicial de la especie en estudio, δ_o corresponde al corrimiento químico del protón de M2C4 no autoasociado y δ_a corresponde al corrimiento químicos del protón de

M2C4 autoasociado.

Ecuación de autoasociación $A + A \leftrightarrow A_2$

Constante de asociación

$$K_{as} = \frac{[A_2]}{[A] * [A]} \quad (2.2)$$

Balance de masas

$$[A]_o = x = [A] + \frac{[A_2]}{2} \quad (2.3)$$

Reordenando (2.3) y reemplazando en (2.2) obtenemos la concentración de $[A_2]$ en función de la concentración inicial.

$$[A_2] = K_{as} * \left(x - \frac{[A_2]}{2} \right)^2 \quad (2.4)$$

Resolviendo para $[A_2]$

$$\begin{aligned} \frac{K_{as}}{4} [A_2]^2 - (K_{as}x + 1)[A_2] + K_{as}x^2 &= 0 \\ [A_2] &= \frac{(K_{as}x + 1) \pm \sqrt{(K_{as}x + 1)^2 - (K_{as}x)^2}}{\frac{K_{as}}{2}} \quad (2.5) \end{aligned}$$

Finalmente, reemplazando [A₂] en la ecuación (2.1) obtenemos la ecuación de ajuste de los datos E1

$$\delta = y = \delta_o + (\delta_a - \delta_o) * \left(\frac{1}{2x} * \frac{(K_{as}x + 1) \pm \sqrt{(K_{as}x + 1)^2 - (K_{as}x)^2}}{\frac{K_{as}}{2}} \right) \quad (E1)$$

Donde δ_o , δ_a y K_{as} son los parámetros a ajustar.

2.4 Fotofísica

2.4.1 Espectroscopía UV-Vis

Los espectros de UV-Vis fueron medidos utilizando un espectrofotómetro Cary 100 Bio, acoplado a un termorregulador NesLab RTe-111. Todas las mediciones fueron realizadas a 25,0 °C en una celda de cuarzo convencional de dimensiones 10 x 10 x 45 mm³.

2.4.2 Estudio de absorción de los compuestos de inclusión

Se prepararon soluciones de la concentración a utilizar de cada uno de los fluoróforos utilizando el búfer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 100 mM pH = 7 como solvente. Utilizando esta solución como solvente, se prepararon soluciones madres de cada una de las matrices supramoleculares en estudio con el objetivo de mantener la concentración del huésped

constante durante todo el experimento. La solución que contiene a la matriz fue añadida en cantidades crecientes hasta saturar la señal espectroscópica respectiva.

En una cubeta de cuarzo se agregaron 2,4 mL de la solución del fluoróforo en búfer, y se procedió a medir la señal. Luego se fueron agregando alícuotas de la solución fluoróforo-matriz, se agitó la solución durante 5 min, y se procedió a realizar la medida correspondiente. El procedimiento se repitió hasta obtener saturación de la señal espectroscópica.

2.4.3 Determinación de las constantes de asociación de los compuestos de inclusión

Las constantes de asociación (K_{as}) fueron determinadas graficando los cambios en la absorción (a una longitud de onda determinada) en función de la concentración de la matriz. En todos los casos la concentración del huésped se mantuvo constante (se especifica la concentración en cada análisis). Se realizó un ajuste no lineal de los datos para obtener el valor de la constante y su desviación estándar, utilizando el software OriginPro 2016. Los modelos utilizados suponen una estequiometría del complejo huésped-fluoróforo 1:1, en la mayoría de los casos, pero se utilizó también un modelo que asume la estequiometría huésped-fluoróforo 2:1⁶. En cada análisis se especificará el modelo utilizado. Los modelos matemáticos utilizados se presentan a continuación.

2.4.3.1 Modelo de asociación 1:1

Este modelo supone que la concentración del huésped ([G]) es constante y la concentración de la matriz ([H]) varía.

Ecuación de ajuste de los datos

$$S = y = S_G + (S_{HG} - S_G) * \left(\frac{[HG]}{[G_T]} \right) \quad (2.6)$$

Donde y corresponde a la señal espectroscópica medida (absorción o fluorescencia), [HG] corresponde a la concentración de complejo, [G_T] corresponde a la concentración de la molécula huésped, S_G corresponde a la señal espectroscópica del huésped libre y S_{HG} corresponde a la señal espectroscópica del huésped formando parte del complejo.



Constante de asociación

$$K_{as} = \frac{[HG]}{[H] * [G]} \quad (2.7)$$

Balance de masas

$$[G_T] = [G] + [HG] \quad (2.8)$$

$$[H_T] = x = [H] + [HG] \quad (2.9)$$

Reordenando (2.8) y (2.9) y reemplazando en (2.7)

$$[G] = [G_T] - [HG]$$

$$[H] = x - [HG]$$

$$K_{as} = \frac{[HG]}{(x - [HG]) * ([G_T] - [HG])} \quad (2.10)$$

Reordenando y resolviendo para [HG]

$$K_{as}[HG]^2 - (K_{as}x + K_{as}G_T + 1)[HG] + K_{as}xG_T = 0$$

$$[HG] = \frac{(K_{as}x + K_{as}G_T + 1) \pm \sqrt{(K_{as}x + K_{as}G_T + 1)^2 - 4K_{as}^2xG_T}}{2K_{as}} \quad (2.11)$$

Finalmente, reemplazando [HG] en la ecuación de ajuste de los datos (2.6) se obtiene la ecuación E2

$$S = y = S_G + (S_{HG} - S_G) * \left(\frac{(K_{as}x + K_{as}G_T + 1) \pm \sqrt{(K_{as}x + K_{as}G_T + 1)^2 - 4K_{as}^2xG_T}}{2K_{as}G_T} \right) \quad (E2)$$

Donde K_{as} , S_G , S_{HG} y G_T son parámetros a ajustar.

2.4.3.2 Modelo de autoasociación 1:1 / 2:1 matriz:huésped

Este modelo asume que la concentración del huésped ($[G]$) es constante y la concentración de la matriz ($[H]$) varía.

Ecuación de ajuste de los datos

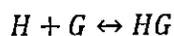
$$S = y = S_G[G] + S_H[H] + S_{HG}[HG] + S_{H_2G}[H_2G] \quad (2.12)$$

Considerando que la contribución de la matriz supramolecular a la señal espectroscópica es nula, eliminamos el componente de la ecuación anterior, simplificándola a la siguiente ecuación que utilizaremos para el ajuste de los datos en el modelo

$$S = y = S_G[G] + S_{HG}[HG] + S_{H_2G}[H_2G] \quad (2.13)$$

Donde y corresponde a la señal espectroscópica medida (absorción o fluorescencia), $[G]$ corresponde a la concentración de la molécula huésped, $[HG]$ corresponde a la concentración del complejo de estequiometría 1:1, $[H_2G]$ corresponde a la concentración del complejo de estequiometría 2:1, S_G corresponde a la señal espectroscópica del huésped libre, S_{HG} corresponde a la señal espectroscópica del huésped formando parte del complejo

de estequiometría 1:1 y S_{H_2G} corresponde a la señal espectroscópica del huésped formando parte del complejo de estequiometría 2:1.



Constantes de asociación

$$K_{as1} = \frac{[HG]}{[H] * [G]} \quad (2.14)$$

$$K_{as2} = \frac{[H_2G]}{[H] * [HG]} \quad (2.15)$$

Balance de masas

$$H_o = H + HG + 2H_2G \quad (2.16)$$

$$G_o = G + HG + H_2G \quad (2.17)$$

Combinando las cuatro ecuaciones, obtenemos las siguientes relaciones para el valor de las concentraciones de las especies en el equilibrio

$$G = \frac{G_o}{1 + K_{as1} * H + K_{as1} * K_{as2} * H^2} \quad (2.18)$$

$$HG = \frac{G_o * K_{as1} * H}{1 + K_{as1} * H + K_{as1} * K_{as2} * H^2} \quad (2.19)$$

$$H_2G = \frac{G_o * K_{as1} * K_{as2} * H^2}{1 + K_{as1} * H + K_{as1} * K_{as2} * H^2} \quad (2.20)$$

Finalmente, reemplazando en la ecuación 2.13, obtenemos la ecuación E3

$$S = y = \frac{S_G + S_{HG} * K_{as1} * H + S_{H2G} * K_{as1} * K_{as2} * H^2}{1 + K_{as1} * H + K_{as1} * K_{as2} * H^2} * G_o \quad (E3)$$

2.4.4 Determinación de la estequiometría de asociación de los compuestos de inclusión

La determinación de la estequiometría de la asociación entre las matrices y los fluoróforos se llevó a cabo mediante el método de Job o de las variaciones continuas. Se llevaron a cabo estudios de absorción donde se variaron las concentraciones de la matriz y del fluoróforo en formas opuestas (se aumentaba la concentración de macrociclo a medida que se disminuía la concentración del fluoróforo, manteniendo la suma total de moles constante). Los datos obtenidos fueron graficados (absorción del complejo en función de la fracción molar del fluoróforo). El máximo de la curva nos indica la estequiometría para el sistema.

El procedimiento utilizado fue el siguiente. Se prepararon soluciones madre de las matrices y de los fluoróforos en búfer fosfato 100 mM. Se tomaron alícuotas de estas soluciones para preparar soluciones mixtas (fluoróforo-matriz) manteniendo la suma total de moles constante. Las soluciones se dejaron agitando a 25 °C toda la noche y se procedió a medir los espectros de absorción UV-Vis. La suma total de moles para los distintos

fluoróforos estudiados fueron: Rodamina B (9 μM), Tioflavina T (30 μM) y Azul Nilo (20 μM).

2.4.5 Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron medidos utilizando un espectrofluorímetro Hitachi F-4500 acoplado a un termorregulador Brinkmann MGW LAUDA RM6. Todas las mediciones fueron realizadas a 25,0 °C en una celda de cuarzo convencional de dimensiones 10 x 10 x 45 mm³. La longitud de onda de excitación utilizada para cada fluoróforo se especifica en cada análisis posterior.

2.4.5.1 Estudios de emisión de los compuestos de inclusión

Se prepararon soluciones con las concentraciones requeridas de cada uno de los fluoróforos utilizando el búfer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM pH = 7 como solvente. Estas soluciones de fluoróforo fueron utilizadas para disolver la matriz supramolecular a utilizar en la titulación, y de esta forma, desarrollar la titulación aumentando la concentración de la matriz. De esta manera, la concentración del fluoróforo se mantuvo constante durante todo el experimento y la concentración de la matriz fue aumentando hasta la saturación de la señal espectroscópica respectiva.

En una cubeta de cuarzo se agregaron 2,4 mL de la solución del fluoróforo en búfer, y se procedió a medir la señal. Luego se fueron agregando alícuotas de la solución fluoróforo-

matriz, se agitó la solución durante 5 min, y se procedió a realizar la medida correspondiente. El procedimiento se repitió hasta obtener saturación en el cambio de la señal espectroscópica.

2.4.5.2 Determinación de las constantes de asociación de los compuestos de inclusión

Las constantes de asociación fueron determinadas graficando los cambios en la intensidad de fluorescencia (a una longitud de onda determinada) en función de la concentración de la matriz. En todos los casos la concentración del huésped se mantuvo constante (especificando la concentración en cada análisis). Se realizó un ajuste no lineal de los datos para obtener el valor de la constante (ecuaciones E2 y E3) y su desviación estándar, utilizando el software OriginPro 2016.

2.4.5.3 Cálculos de amplificación de fluorescencia en solución

Para calcular el factor de amplificación o decaimiento de la fluorescencia en solución se consideró el máximo valor de emisión del fluoróforo y se calculó el cociente, a la misma longitud de onda, con el máximo de emisión del compuesto de inclusión formado a una cierta concentración de matriz supramolecular añadida.

2.4.6 Determinación del tiempo de vida de fluorescencia de los compuestos de inclusión

Las medidas del tiempo de vida de fluorescencia fueron realizadas en un fluorímetro K2 (*multifrequency cross-correlation phase and modulation*) ISS, el cual se encuentra acoplado a un termorregulador Quantum North West TC 425. Todas las mediciones fueron realizadas a 25,0 °C en una celda de cuarzo de 0,5 mL, con el polarizador a 0° y con ángulo mágico. La longitud de onda de excitación utilizada para cada fluoróforo, así como la referencia y el filtro utilizados se detallan en cada uno de los análisis posteriores.

2.5 Estudios de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión

2.5.1 Rodamina B

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión formados con rodamina B fueron realizados de la siguiente manera. Se midió el espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la rodamina B (4 mM de rodamina B en búfer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 100 mM en D₂O, pD=7). Luego se midió el espectro del fluoróforo en presencia de 1 y 2 equivalentes (4 mM y 8 mM, respectivamente) de la matriz en el mismo solvente.

2.5.2 Tioflavina T

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión formados con tioflavina T fueron registrados en las siguientes condiciones. Para el espectro de tioflavina T se utilizó una solución 4 mM en búfer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM en D_2O , pD=7). Además, el espectro del fluoróforo fue registrado en una solución que contenía 1 y 2 equivalentes (4 mM y 8 mM, respectivamente) de la matriz.

2.6 Acoplamiento molecular

Las moléculas de los fluoróforos fueron creadas utilizando el software Spartan10 (WaveFunction, Inc.) y se optimizaron geométricamente usando el *Método de Hartree-Fock* con las funciones básicas de polarización 6-31G*. Se utilizaron las estructuras cristalinas de los dos macrociclos en estudio (CB[7] y β -ciclodextrina) y se optimizaron de la misma forma anteriormente mencionada. Las matrices acíclicas fueron creadas utilizando Spartan10 y optimizadas bajo el mismo método.

El acoplamiento molecular se realizó utilizando el software Autodock Vina⁷ entre una molécula de fluoróforo y la matriz supramolecular correspondiente. En todos los casos, se presenta el compuesto de inclusión obtenido de menor energía.

2.7 Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo utilizando el siguiente método reportado en la literatura⁷. 10 mL de solución de AgNO₃ en agua mili-Q de concentración 1×10^{-2} M, se agregan rápidamente a una solución mixta que contiene NaOH $3,33 \times 10^{-3}$ M y NH₃OHCl $1,67 \times 10^{-3}$ M, en agua mili-Q. La solución cambia de color al instante, indicando la formación del coloide de plata.

2.7.1 Espectroscopía de UV-Vis

Las nanopartículas de plata sintetizadas fueron caracterizadas mediante espectroscopia UV-Vis en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450 en una celda de cuarzo convencional de dimensiones $10 \times 10 \times 45 \text{ mm}^3$.

2.7.2 Dispersión dinámica de luz

El tamaño de las nanopartículas en solución acuosa fue determinado mediante dispersión dinámica de luz y fue medido en triplicado en un equipo 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instrument Corporation).

2.8 Estudios de amplificación de fluorescencia en estado sólido

2.8.1 Deposición de los compuestos de inclusión sobre vidrio modificado

Portaobjetos de vidrio marca Corning (grosor 0,96 – 1,06 mm) fueron sometidos al siguiente procedimiento de limpieza y modificación de su superficie para las mediciones posteriores. El vidrio es sumergido durante 24 horas en agua regia ($\text{HCl} : \text{HNO}_3 = 3 : 1$) para limpiar la superficie de éste, luego es lavado tres veces por inmersión en agua para eliminar los residuos ácidos. Posteriormente, el vidrio es sumergido durante 1 hora en una solución 1 M de NaOH en agua, para cargar negativamente la superficie del vidrio, y luego es lavado nuevamente tres veces por inmersión en agua. Luego, el vidrio es sumergido durante 15 min en una solución del polielectrolito catiónico MADQUAT (Figura 2.13), para adherirlo a la superficie, seguido de dos lavados con agua. Finalmente, el vidrio se sumerge en el coloide de nanopartículas de plata durante 24 horas en ausencia de luz. Finalizado esto, se seca al aire y se almacena en una desecadora al vacío para evitar la descomposición de las nanopartículas. Las nanopartículas depositadas fueron caracterizadas mediante espectroscopia de UV-Vis sobre el vidrio, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2450.

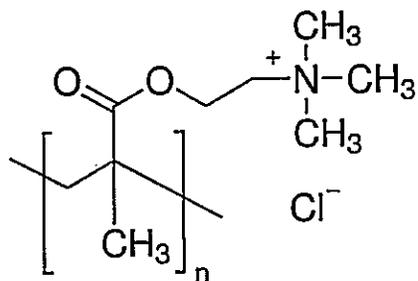


Figura 2.13: MADQUAT (cloruro de poli(2-metacriloxietiltrimetilamonio))

2.8.2 Microscopía de fuerza atómica

La morfología de las nanopartículas depositadas sobre vidrio modificado fue estudiada mediante microscopía de fuerza atómica, utilizando un microscopio NT-MDT Ntegra Aura⁹. La superficie de la muestra de vidrio funcionalizada con nanopartículas fue modificada mediante *spin coating* utilizando una solución 0,1 M del polímero cloruro de poli(dialildimetilamonio) en metanol a 2000 rpm.

2.8.3 Fluorescencia de los compuestos en estado sólido y cálculos de amplificación de fluorescencia

En todos los casos estudiados, se llevaron a cabo dos procesos para depositar el complejo fluoróforo-matriz supramolecular sobre el vidrio modificado con nanopartículas, esto se llevó a cabo para estudiar cuál de los dos métodos producía los mejores resultados. En el primero de los casos se procedió a agregar una gota de la solución preparada del compuesto de inclusión respectivo sobre el vidrio modificado y se procedió a secar al aire

durante la noche. En el segundo de los casos, un vidrio modificado fue sumergido durante 24 horas en la solución del compuesto de inclusión, luego fue secado a temperatura ambiente para su posterior medición.

Las medias de fluorescencia en estado sólido fueron realizadas en un espectrofotómetro ISS PC1 Photon Counting Spectrofluorimeter. Las muestras de vidrio fueron soportadas en un portamuestras acoplado a un goniómetro y las medidas fueron realizadas a 35° respecto del haz incidente.

3

Caracterización de los compuestos de inclusión mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones y acoplamiento molecular.

3.1 Compuestos de inclusión de rodamina B

Para dar indicios sobre la estructura de los compuestos formados se procedió a realizar un estudio de resonancia magnética nuclear de protones de los compuestos de inclusión. Se analizaron los corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debido a la presencia de 1 o 2 equivalentes de la matriz supramolecular en cuestión. Los corrimientos químicos fueron tabulados para, junto con los estudios de acoplamiento molecular, proponer una estructura de estos compuestos. En la figura 3.2 se presentan los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de la rodamina B en búfer, de la rodamina B en presencia de uno y dos equivalentes de β -ciclodextrina. Además, se presenta la tabla con los corrimientos químicos obtenidos para las señales de los protones del fluoróforo, así como también, la estructura de menor energía del compuesto de inclusión obtenida mediante acoplamiento molecular. La asignación de hidrógenos utilizada para calcular los desplazamientos químicos se presenta en la figura 3.1. Se observa que todas las señales de los hidrógenos de la rodamina B se ven afectadas debido

a la presencia del macrociclo, indicando la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de β -ciclodextrina. En general, todas las señales se encuentran desplazadas a campo bajo debido al desapantallamiento de los protones provocado por el ingreso a la cavidad migrando desde el solvente acuoso. Las señales que presentan mayor corrimiento químico corresponden a las de los hidrógenos que forman parte de los grupos dietilamino y al hidrógeno en posición *orto* respecto al grupo funcional carboxílico. Contrastando esta evidencia con el modelo obtenido para el compuesto mediante acoplamiento molecular, se observa que la estructura más probable corresponde al ingreso de la molécula de rodamina B por el sector que contiene un grupo dietilamino, siendo consecuente con el corrimiento químico de estas señales en el espectro. Además, considerando esta estructura, los grupos hidroxilo secundarios del macrociclo interaccionan con el grupo carboxilato de la molécula de rodamina B mediante puentes de hidrógeno, lo cual explica el corrimiento hacia campo bajo del protón en posición *orto* respecto a este grupo funcional (cambio en su entorno químico debido a la presencia de los hidroxilos de la matriz).

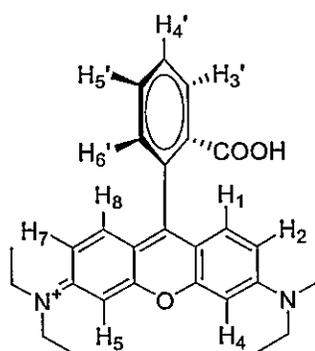


Figura 3.1: Esquema de la asignación de hidrógenos de la rodamina B

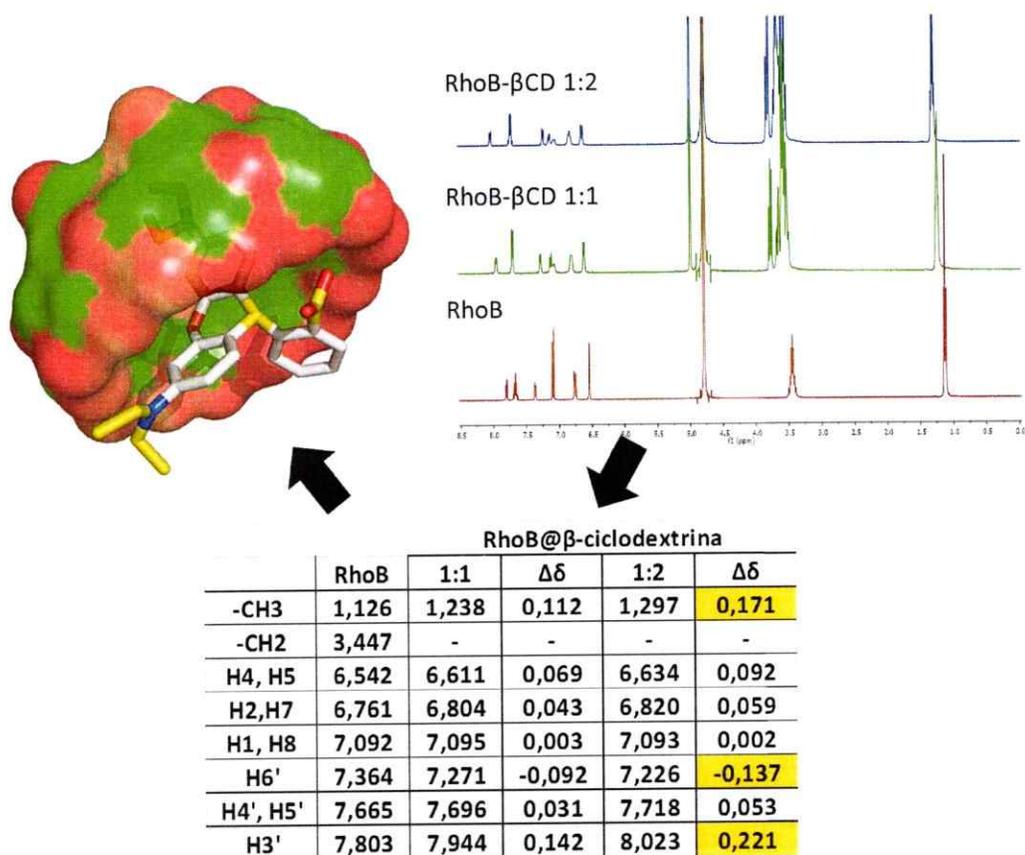


Figura 3.2: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y β-ciclodextrina en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de β-ciclodextrina. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y β-ciclodextrina.

La figura 3.3 muestra los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de la rodamina B en búfer, de la rodamina B en presencia de uno y dos equivalentes de CB[7]. Al igual que en el caso estudiado anteriormente, se observa un desplazamiento de las

señales de los protones de la porción aromática de la rodamina B hacia campo bajo, lo cual indica la entrada de la molécula dentro de la cavidad de CB[7]. El corrimiento hacia campo alto de los protones de los grupos dietilamino sería indicativo de una posible interacción de estos con el portal de grupos carbonilos del anillo de CB[7], explicando el aumento de la densidad electrónica. A diferencia de la β -ciclodextrina, el CB[7] corresponde a una matriz rígida, por lo cual se espera que la entrada de la molécula de rodamina B se vea dificultada por los anillos de carbonilo del macrociclo. Los análisis de acoplamiento molecular confirman los corrimientos de los protones de la molécula de rodamina B debido a la formación del compuesto de inclusión, indicando que la porción de la molécula que ingresa corresponde a la porción aromática de la rodamina B por donde se encuentran los grupos funcionales dietilamino.

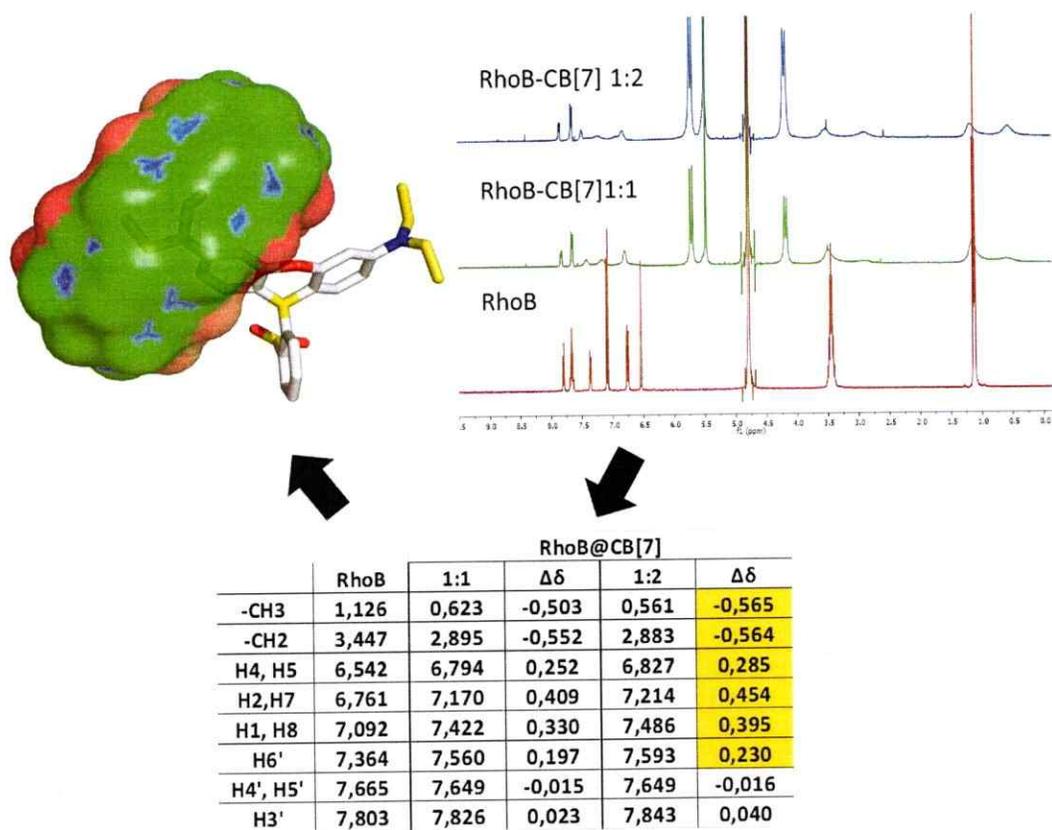


Figura 3.3: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y CB[7] en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de CB[7]. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y CB[7].

A diferencia de los macrociclos anteriores, las matrices acíclicas no presentan un tamaño de cavidad fijo, lo cual podría permitir un mejor acomodo de la molécula de rodamina B dentro de la cavidad. La figura 3.4 presenta los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de la rodamina B en búfer, de la rodamina B en presencia de uno y dos

equivalentes de MIC4. Se observa que, al igual que en los casos anteriores, gran parte de las señales de los protones del fluoróforo se ven afectados, en este caso hacia campo alto, indicando una interacción con el portal de carbonilos que presenta la molécula (sitio de alta densidad electrónica). La estructura obtenida mediante acomplamiento molecular confirma estos corrimientos y muestra un acomodo virtualmente completo de la molécula de rodamina B dentro de la “cavidad” de MIC4.

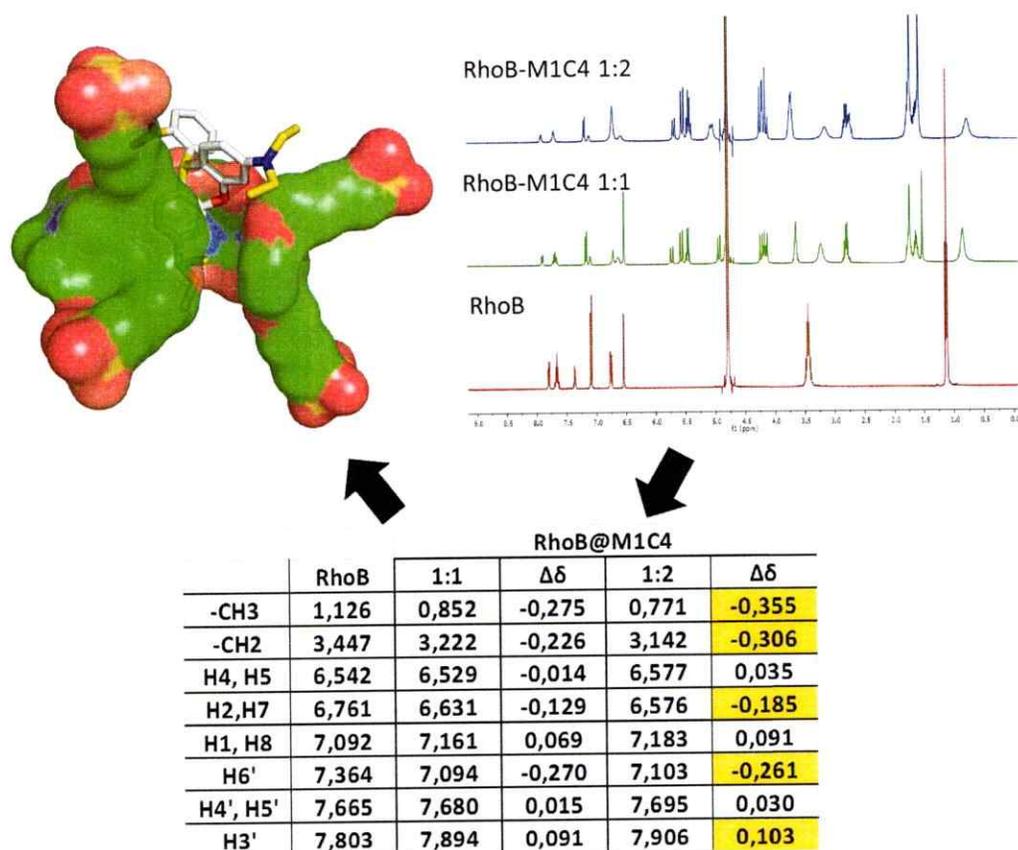


Figura 3.4: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y MIC4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la rodamina B debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad

de M1C4. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y M1C4.

El último caso de estudio corresponde a la molécula de M2C4 (Figura 3.5). A diferencia del resto, no fue posible realizar un estudio de los corrimientos químicos de los protones de la rodamina B debido a que las señales de éstos desaparecen en presencia de M2C4 en la solución. La desaparición de las señales indica una velocidad de intercambio de la entrada y salida de la rodamina B superior a la que puede ser detectada utilizando espectroscopía de resonancia magnética de protones, por lo cual no fue posible llevar a cabo el análisis. El acoplamiento molecular, sin embargo, indica un ingreso de la porción aromática dentro de la cavidad de M2C4. A pesar de esto, no es posible asegurar con certeza esta estructura debido a que la simulación considera una cavidad cerrada de la matriz, lo cual no representa la estructura del M2C4 en solución acuosa.

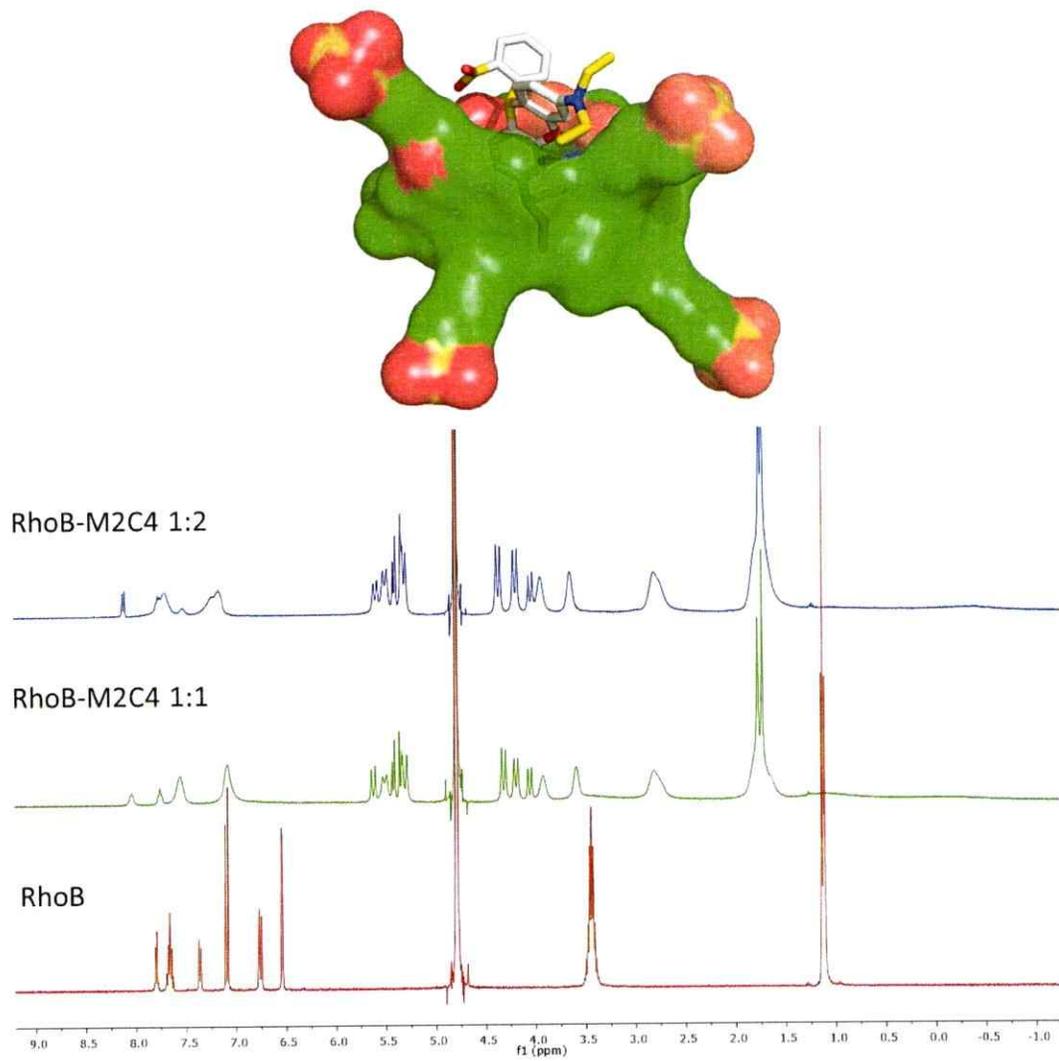


Figura 3.5: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de rodamina B, rodamina B y M2C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre rodamina B y M2C4.

3.2 Compuestos de inclusión de tioflavina T

Se analizaron los corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debido a la presencia de 1 o 2 equivalentes de la matriz supramolecular en cuestión. Los corrimientos químicos fueron tabulados para, junto con los estudios de acoplamiento molecular, proponer una estructura de estos compuestos.

La figura 3.6 se muestra un esquema de la asignación de hidrógenos de la tioflavina T utilizado en los cálculos de los corrimientos químicos. La figura 3.7 presenta los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de la tioflavina T en búfer, de la tioflavina T en presencia de uno y dos equivalentes de β -ciclodextrina. Además, se presenta la tabla con los corrimientos químicos obtenidos para las señales de los protones del fluoróforo, así como también, la estructura de menor energía del compuesto de inclusión obtenida mediante acoplamiento molecular. Las señales de los protones de la tioflavina T presentan corrimientos químicos hacia campo bajo, indicando la entrada virtualmente completa de la molécula dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina. La simulación computacional confirma estos resultados. Considerando, además, la formación de compuestos de inclusión de diferente estequiometría reportados para la tioflavina T con β -ciclodextrina¹, se obtuvo un modelo computacional para el compuesto de estequiometría 2:1 (β -CD:ThT), en el cual se observa la entrada completa de la molécula de tioflavina T dentro de las cavidades de dos moléculas de ciclodextrina.

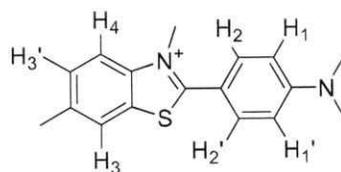


Figura 3.6: Esquema de la asignación de hidrógenos de la tioflavina T

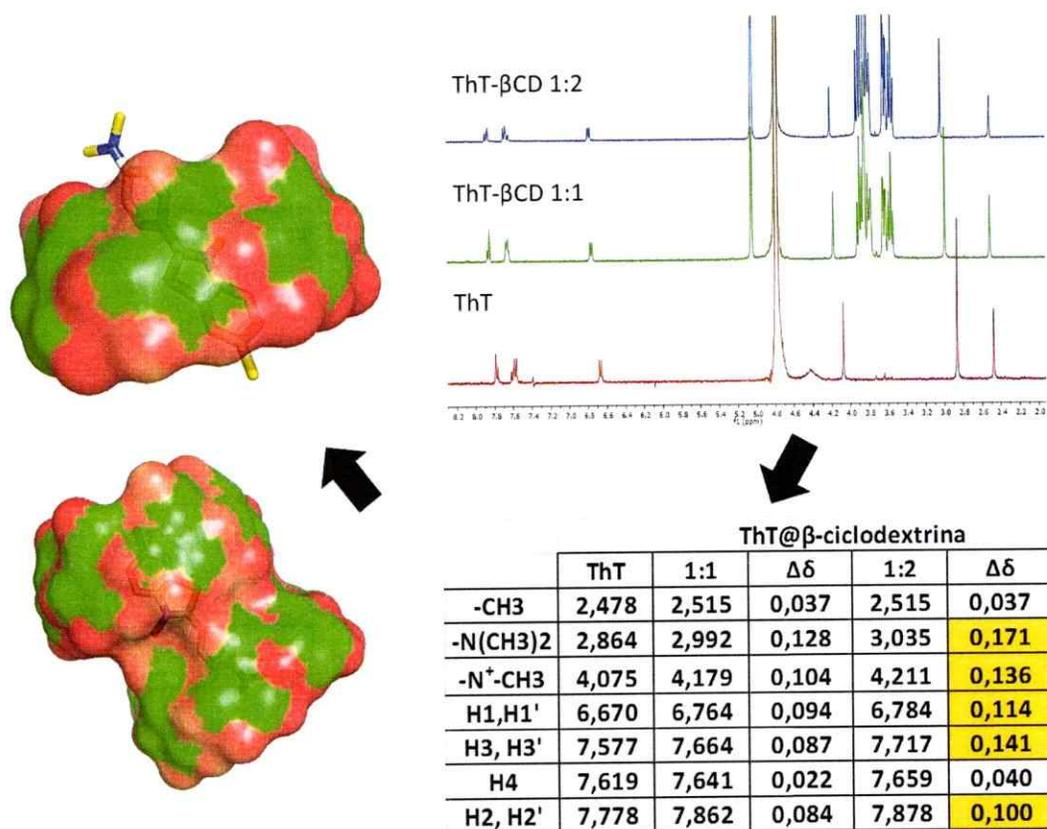


Figura 3.7: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y β-ciclodextrina en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de β-ciclodextrina. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y β-ciclodextrina.

La figura 3.8 muestra los espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T en búfer, y de tioflavina T en presencia de uno y dos equivalentes de CB[7]. Se observan corrimientos de las señales de los protones a campo bajo, lo cual indica la inclusión de la molécula de tioflavina T dentro de la cavidad de CB[7]. Mediante acoplamiento molecular se obtuvo la estructura del complejo de menor energía, la cual confirma los resultados obtenidos mediante resonancia magnética nuclear de protones, y que sitúa a la molécula del fluoróforo dentro de la cavidad del macrociclo.

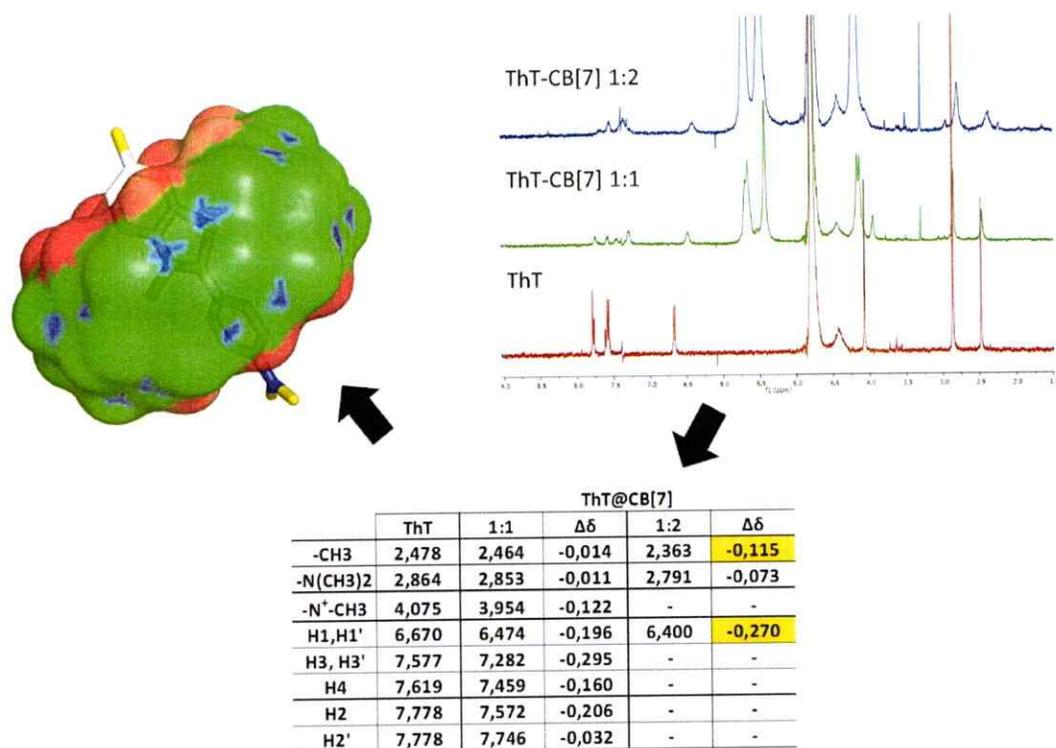


Figura 3.8: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y CB[7] en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad

de CB[7]. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y CB[7].

Para las matrices acíclicas MIC4 y M2C4, se observan corrimientos químicos de las señales de los hidrógenos de la tioflavina T, sin embargo, no fue posible llevar a cabo el análisis debido al ensanchamiento y superposición de las señales de la matriz y el fluoróforo. A pesar de esto, se obtuvieron modelos computacionales para la estructura de ambos compuestos de inclusión (figuras 3.9 y 3.10) los cuales muestran como la molécula de tioflavina se puede acomodar dentro de la cavidad de estas matrices.

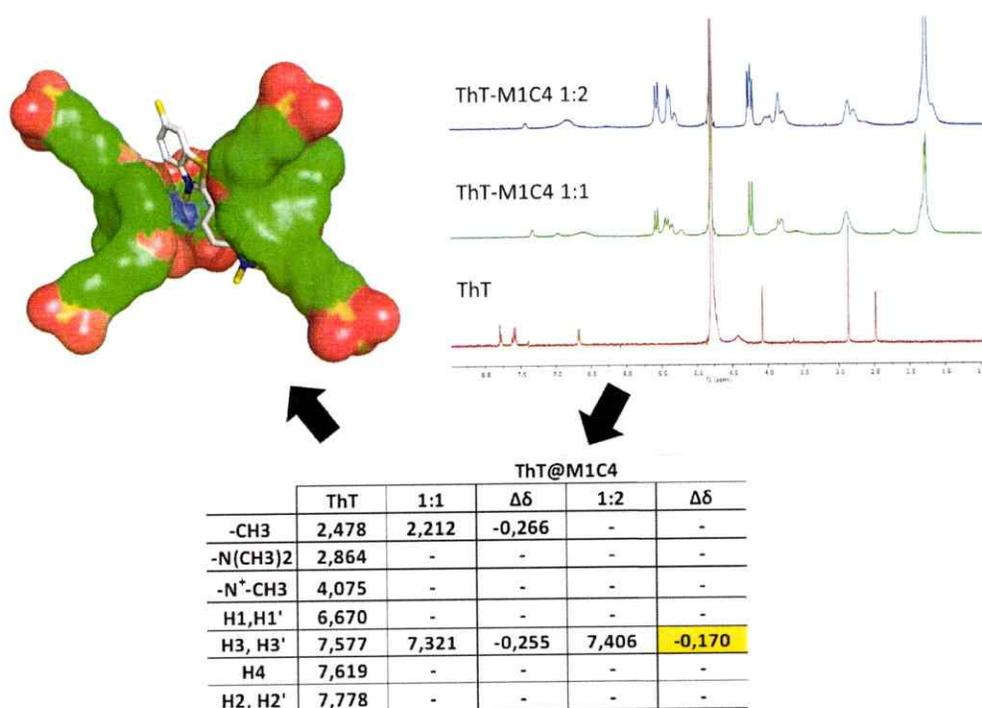


Figura 3.9: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y MIC4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Corrimientos químicos de las señales

de los protones de la tioflavina T debidos a la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de M1C4. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y M1C4.

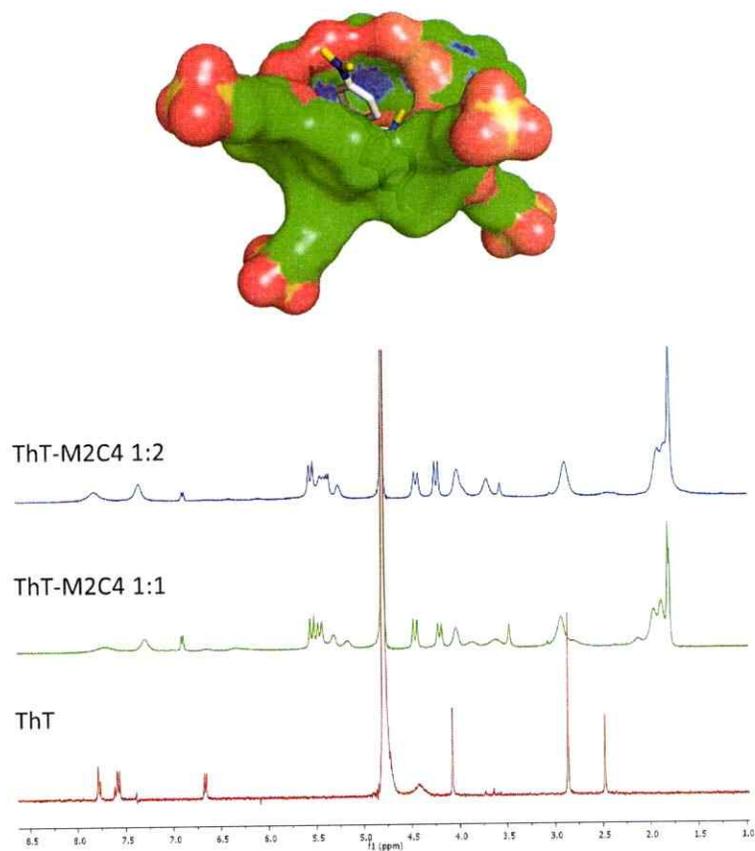


Figura 3.10: Espectros de resonancia magnética nuclear de protones de tioflavina T, tioflavina T y M2C4 en relaciones molares 1:1 y 1:2. Estructura de menor energía obtenida mediante acoplamiento molecular del compuesto formado entre tioflavina T y M2C4.

4

Constantes de asociación de los compuestos de inclusión y cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los colorantes

4.1 Constante de autoasociación de M2C4

La presencia de anillos de naftaleno en la estructura del motor 2, hace posible una interacción entre ellos en solución acuosa, la cual podría llevar a la autoasociación de la molécula en agua. La autoasociación de la molécula en agua induce a errores en la determinación de las constantes de asociación en la formación de los compuestos de inclusión con los fluoróforos. Por tanto, se procedió a realizar un estudio de dilución en óxido de deuterio mediante espectroscopía de resonancia magnética de protones. En la figura 4.1 se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de protones del estudio de dilución. Para estudiar la autoasociación, se siguió el corrimiento químico del protón a 3,87 ppm a medida que aumentaba la concentración de la solución. Se graficó este corrimiento químico en función de la concentración del motor 2 y se llevó a cabo un ajuste de los datos utilizando un modelo de autoasociación basado en el desplazamiento químico (Ecuación E1). Los detalles matemáticos del modelo utilizado se presentan en la parte experimental.

La figura 4.2 muestra el gráfico de ajuste de la curva y el valor obtenido para la constante de autoasociación en agua. El valor obtenido, $88 \pm 12 \text{ M}^{-1}$ es bajo comparado con las constantes de asociación reportadas para este compuesto con distintas moléculas orgánicas¹, indicando que la asociación en solución acuosa de esta molécula puede considerarse despreciable, por lo cual no será considerada en el cálculo de las constantes de formación de los compuestos de inclusión con los fluoróforos.

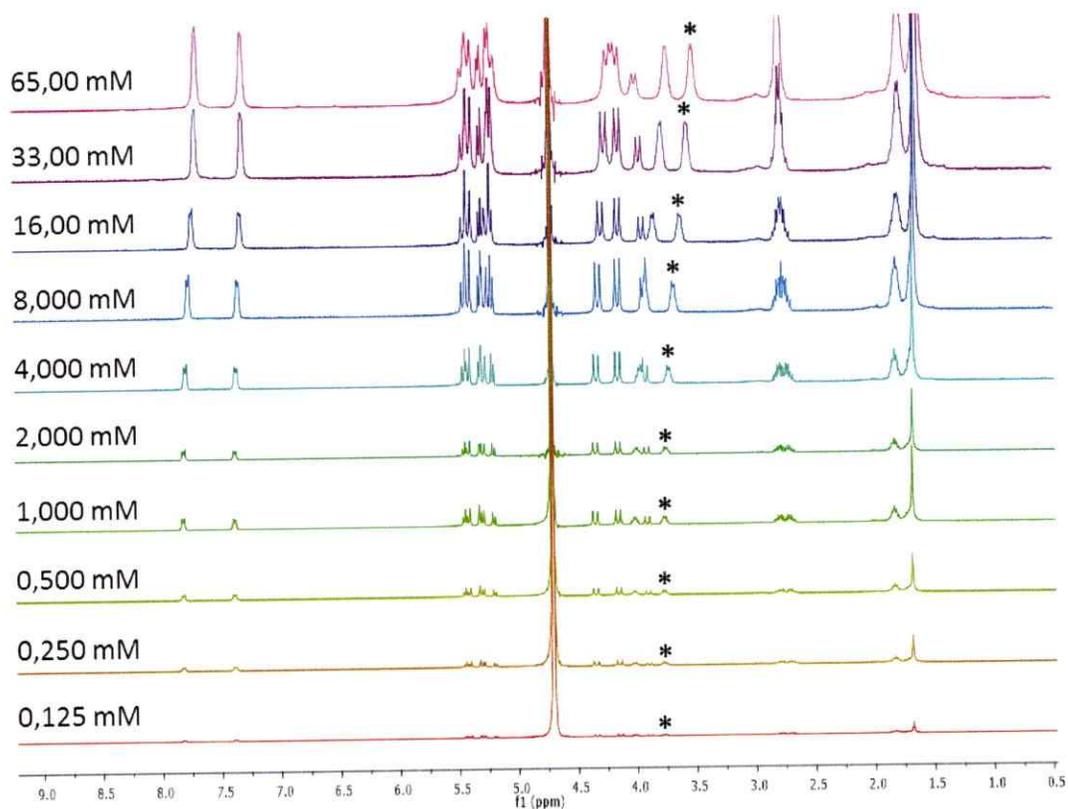


Figura 4.1: Estudio de dilución del M2C4 para determinar la constante de autoasociación mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones ¹H-RMN

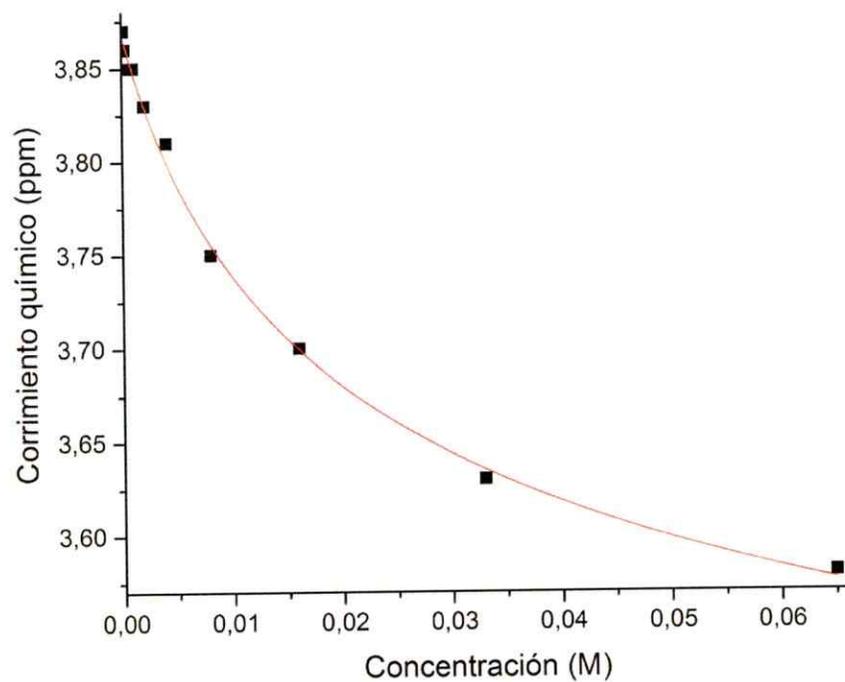


Figura 4.2: Ajuste de la curva, utilizando la ecuación E1 del modelo de autoasociación, mediante resonancia magnética nuclear de protones, siguiendo el protón a 3,87 ppm de M2C4 en solución de D₂O.

4.2 Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con rodamina B.

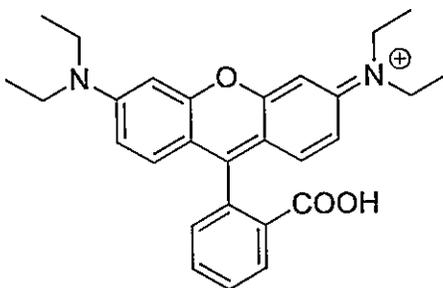


Figura 4.3: Estructura química de la Rodamina B.

En la figura 4.3 se presenta la estructura química de la rodamina B. Se observa la presencia de la carga positiva que se deslocaliza a través de la porción aromática de la molécula dando origen a distintas especies cargadas en solución. En la figura 4.4, se observan los espectros normalizados de absorción y emisión de la rodamina B en búfer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100 mM a pH =7. El máximo de absorción se encuentra a 554 nm y el de emisión a 583 nm ($\lambda_{exc} = 520$ nm). Estas son las condiciones que se utilizarán para todos los espectros realizados en este estudio. Se decidió mantener el pH en 7 para evitar posibles cambios debidos a los equilibrios de protonación de los compuestos fluorescentes.

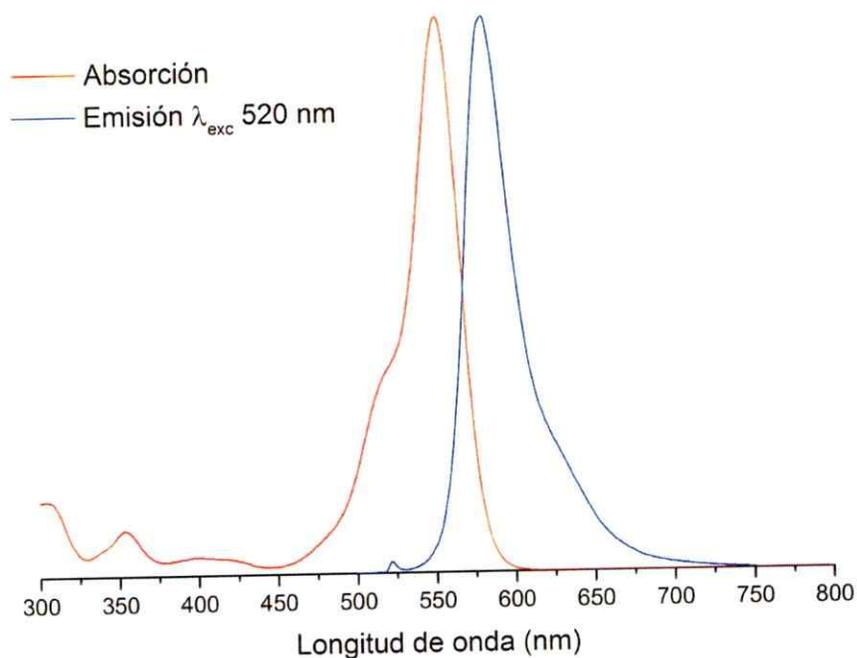


Figura 4.4: Espectros de absorción y fluorescencia normalizados de rodamina B en búfer fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de rodamina 9 μM para el espectro de absorción y 2,5 μM para el de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$)

Se realizaron titulaciones espectrofotométricas mediante espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia para determinar las constantes de asociación de los compuestos estudiados. En la tabla 4.1 se resumen los valores de las constantes de asociación obtenidas. Estas fueron calculadas mediante el ajuste de los datos obtenidos de absorción o fluorescencia utilizando la ecuación E2, para compuestos de estequiometría 1:1, o la ecuación E3 para compuestos de estequiometría 2:1 matriz:huésped. Se observa que para las matrices supramoleculares cíclicas (β -ciclodextrina y CB[7]) las constantes de asociación varían

en el orden de 10^3 - 10^4 M^{-1} , menores que las obtenidos para los compuestos formados por las matrices acíclicas cuyos valores son del orden 10^5 - 10^6 M^{-1} . El aumento en los valores de las constantes de asociación de los compuestos formados por las matrices acíclicas puede explicarse por la falta de rigidez en sus estructuras tridimensionales, lo cual provoca una maximización de las interacciones entre la matriz supramolecular y la rodamina B. En general, se observa una tendencia al aumento en el valor de la constante a medida que la matriz se vuelve más flexible.

Se observa también que el compuesto formado por M1C4 con rodamina B presenta un cambio de estequiometría dependiente de la concentración de la matriz supramolecular agregada en la titulación. A concentraciones mayores a $2,8 \times 10^{-4}$ M, se observó la formación de un compuesto de estequiometría 2:1 matriz:huésped.

Tabla 4.1: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de rodamina B con las matrices supramoleculares en estudio

	Absorción K_{as} (M^{-1})	Emisión K_{as} (M^{-1})	Corrimiento de Stokes (cm^{-1})
RhoB búfer	-	-	898
RhoB@ β - ciclodextrina	$(3,39 \pm 0,17) \times 10^3$	$(6,41 \pm 1,41) \times 10^3$	875
RhoB@CB[7]	$(5,61 \pm 0,30) \times 10^3$	$(1,00 \pm 0,02) \times 10^4$	921
RhoB@M1C4 (1:1)	$(3,71 \pm 0,17) \times 10^4$	$(5,61 \pm 0,14) \times 10^4$	816
RhoB@M1C4 (2:1)	$K_{as1} = (2,52 \pm 0,09) \times 10^4$ $K_{as2} = (1,21 \pm 0,28) \times 10^3$	$K_{as1} = (4,86 \pm 0,12) \times 10^4$ $K_{as2} = (3,04 \pm 2,99) \times 10^2$	816
RhoB@M2C4	$(3,68 \pm 0,35) \times 10^5$	$(1,19 \pm 0,07) \times 10^6$	830

Los corrimientos de Stokes (tabla 4.1) de los compuestos de inclusión de rodamina B presentan una disminución, a excepción del compuesto formado con CB[7], respecto del corrimiento observado para la rodamina B en búfer. Esta disminución indica que existe un cambio menor en la geometría del estado excitado respecto del basal en los compuestos de inclusión respecto a la rodamina B en búfer, el cual es causado por la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de la matriz. Al encontrarse dentro de la cavidad de la matriz, la molécula de rodamina B se ve sometida a un mayor confinamiento. Además, la molécula de rodamina se encuentra en un medio menos polar (cavidad de la matriz) que el solvente (búfer fosfato). Ambos fenómenos contribuyen a una disminución en el corrimiento de Stokes ya que el fluoróforo presentan una menor relajación geométrica cuando se encuentra incluido en la cavidad de las matrices en estudio.

La tabla 4.2 resume los cambios de intensidad en la señal de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) en los compuestos de inclusión. Para estudiar el cambio de intensidad de emisión se obtuvo el cociente entre el máximo de las intensidades de emisión del compuesto de inclusión y de la rodamina B en búfer a una misma longitud de onda. Los compuestos formados con las matrices β -ciclodextrina y M1C4 presentan menor intensidad de fluorescencia respecto a la rodamina B en búfer. En el caso del compuesto formado con M1C4, sin embargo, esta disminución es dependiente de la concentración. Para concentraciones de la matriz superiores a $2,7 \times 10^{-4} \text{ M}$ se observa que la señal comienza a aumentar nuevamente con el aumento en la concentración de M1C4 (Figura 4.5). Este aumento se debe principalmente a la formación de un compuesto de inclusión con estequiometría 2:1 matriz:huésped, el cual provoca el nuevo aumento en la fluorescencia

del colorante. Este efecto es el mismo que se observa en la titulación UV-Vis y el cambio coincide con la concentración de MIC4 añadido. Para las otras dos matrices se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia, de orden 2 aproximadamente, respecto de la rodamina B en búfer.

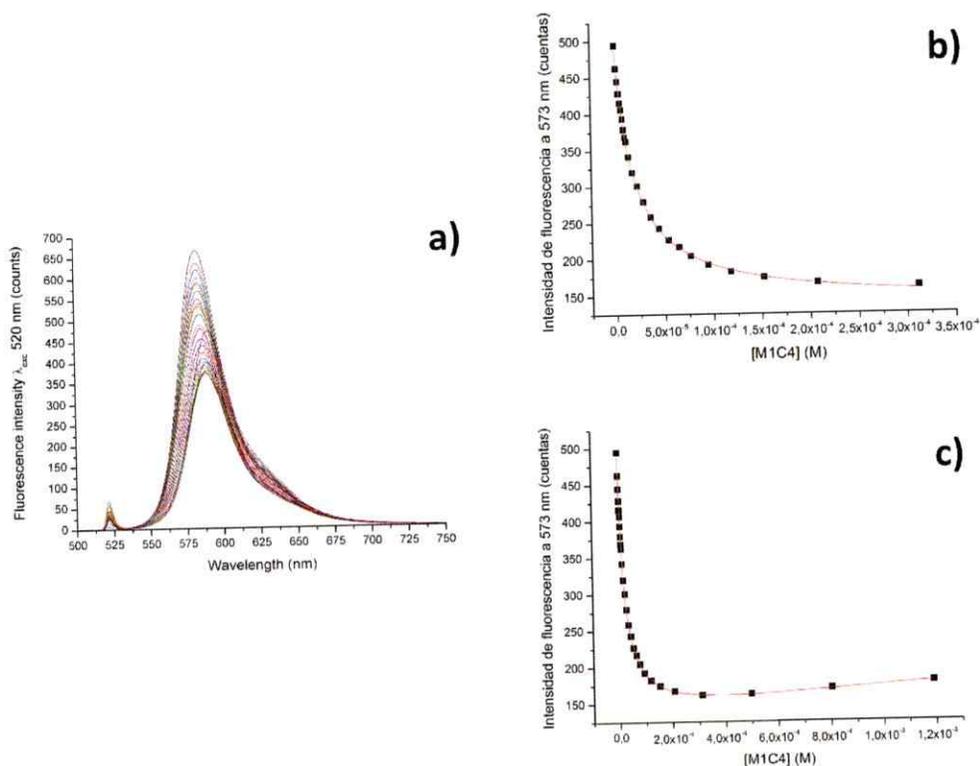


Figura 4.5: a) Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μ M) con MIC4; b) Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con MIC4 utilizando un modelo de asociación 1:1 (Ecuación E2); c) Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con MIC4 utilizando un modelo de asociación 2:1 matriz:huésped (Ecuación E3).

Tabla 4.2: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de rodamina B en búfer.

	[Matriz] (M)	I_{CI}/I_{RhoB}	λ (nm)
RhoB búfer	-	1	583
RhoB@ β - ciclodextrina	$1,050 \times 10^{-3}$	0,6	581
RhoB@CB[7]	$1,140 \times 10^{-3}$	2,2	583
RhoB@M1C4	$2,071 \times 10^{-4}$	0,5	583
RhoB@M2C4	$9,208 \times 10^{-5}$	2,0	580

[RhoB] = 2,5 μ M

En la tabla 4.3 se presentan los tiempos de decaimiento de fluorescencia para la rodamina B en búfer, y para los compuestos formados con las matrices supramoleculares estudiadas. Se observa que para el compuesto de inclusión de β -ciclodextrina con rodamina B se produce una disminución en el tiempo de decaimiento, mientras que, para el resto de los compuestos estudiados, se observa un aumento de éste.

Tabla 4.3: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con rodamina B y las matrices supramoleculares en estudio.

	[Matriz] (M)	τ_1 (ns)	F1	τ_2 (ns)	F2	τ_{Cl}/τ_{RhoB}
RhoB buffer	-	$1,71 \pm 0,03$	-	-	-	1
RhoB@ β - ciclodextrina	$2,28 \times 10^{-4}$	$1,40 \pm 0,03$	-	-	-	0,82
RhoB@CB[7]	$2,28 \times 10^{-4}$	$3,10 \pm 0,05$	-	-	-	1,81
RhoB@M1C4	$6,22 \times 10^{-5}$	$2,07 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,01$	$0,001^*$	$0,053$	1,21
RhoB@M2C4	$3,20 \times 10^{-5}$	$3,51 \pm 0,08$	-	-	-	2,05

[RhoB] = 0,5 μ M

* scattering

La ecuación de Striker-Berg² relaciona la tasa de decaimiento radiativo con el cuadrado del índice de refracción del microambiente donde se encuentra el fluoróforo mediante la siguiente relación matemática

$$k_r = 0.668 \langle \tilde{\nu} \rangle_{av}^2 n^2 f \quad (4.1)$$

Para el caso de fluoróforos con transiciones permitidas, el valor de la fuerza del oscilador (f) puede ser considerada constante en distintos ambientes. Además, el índice de refracción se encuentra relacionado con la polarizabilidad mediante la siguiente relación

$$P = (n^2 - 1)/(n^2 + 2) \quad (4.2)$$

La tabla 4.4 presenta los valores del índice de refracción y de la polarizabilidad para distintos ambientes. Se puede observar que el valor de la polarizabilidad para la cavidad de los cucurbiturilos es cercano al valor de la fase gaseosa. También se observa que el valor de la polarizabilidad para la cavidad de β -ciclodextrina no difiere del valor reportado para el agua.

Tabla 4.4: Índices de refracción y polarizabilidades de distintos microambientes²

Ambiente	Índice de refracción (n)	Polarizabilidad (P)
Fase gaseosa	1.000	0.000
Cucurbit[7]urilo	1.19	0.12
Perfluorohexano	1.252	0.159
β -CD	1.33	0.20
Agua	1.333	0.206

El tiempo de vida de fluorescencia se define mediante la siguiente relación matemática

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4.3)$$

donde k_r corresponde a la tasa de decaimiento radiativo y k_{nr} a los procesos no radiativos. Suponiendo que el valor de k_{nr} permanece constante, una disminución en el valor de k_r provocará un aumento en τ . La baja polarizabilidad de la cavidad de los cucurbiturilos implica una disminución de la tasa de decaimiento radiativo, con el concomitante aumento del tiempo de vida de fluorescencia de la molécula fluorescente incluida.

Por otro lado, la inclusión de rodamina B en la cavidad de las matrices supramoleculares estudiadas, supone un confinamiento de la molécula, el cual restringe grados de libertad rotacionales y vibracionales, evitando la desactivación de la fluorescencia por procesos no radiativos. Adicionalmente, las paredes de la cavidad de la matriz otorgan protección mecánica a la molécula, evitando de esta forma la desactivación por solvente o por especies presentes en la solución del fluoróforo. Ambos procesos pueden disminuir la tasa de decaimiento no radiativo del fluoróforo dentro de la cavidad, lo cual provoca un aumento en el tiempo de vida de fluorescencia (ecuación 4.3).

4.3 Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con azul Nilo.

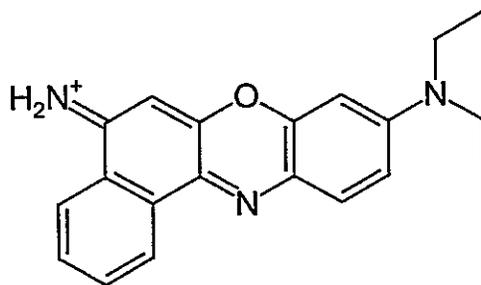


Figura 4.6 Estructura química del azul nilo.

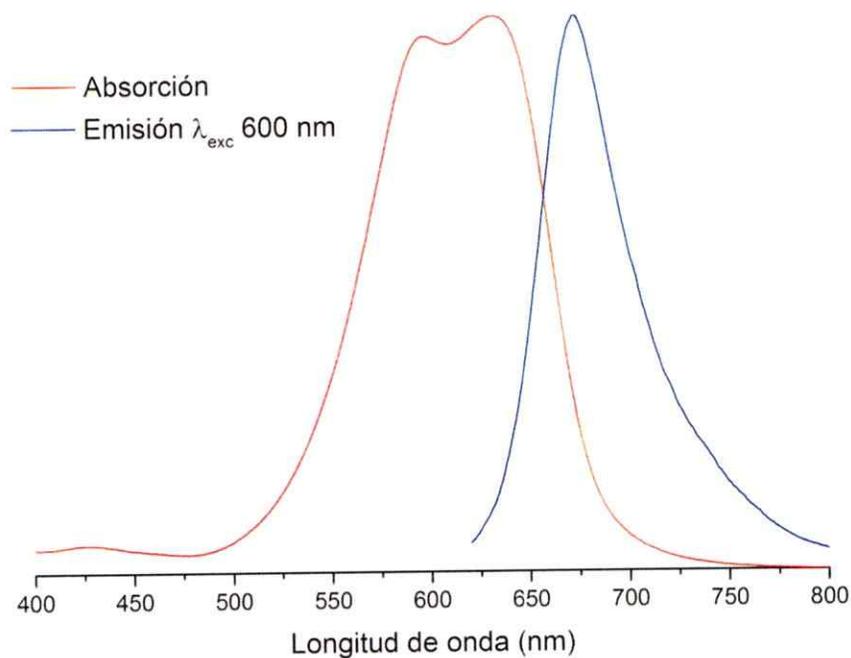


Figura 4.7: Espectros de absorción y fluorescencia normalizados de azul nilo en búfer fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de azul nilo 20 μ M para el espectro de absorción y 2 μ M para el de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 600$ nm)

En la figura 4.6 se presenta la estructura química del azul nilo. Se observa la presencia de la carga positiva que deslocaliza a través de la porción aromática de la molécula dando origen a distintas especies cargadas en solución. En la figura 4.7, se observan los espectros normalizados de absorción y emisión de azul nilo en búfer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100 mM a pH = 7. El espectro de absorción presenta dos bandas: la primera, a 598 nm, corresponde a la absorción del dímero de azul nilo, que se forma en solución a altas concentraciones;

la segunda banda de absorción se encuentra a 633 nm y corresponde a la absorción del monómero del azul nilo ($[\text{azul nilo}] = 20 \mu\text{M}$). El máximo de emisión se encuentra a 673 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, $[\text{azul nilo}] = 2 \mu\text{M}$)

Se estudiaron las propiedades luminiscentes y de asociación de los compuestos formados por el colorante azul nilo con las matrices supramoleculares en estudio. En la tabla 4.5 se presentan los valores obtenidos para las constantes de asociación entre el fluoróforo y la matriz utilizado espectroscopía de UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia. Además, se tabulan los corrimientos de Stokes debidos al proceso de inclusión. Se observa que, al igual que en el caso anterior (rodamina B), las constantes de asociación obtenidas presentan valores mayores para los compuestos formados con las matrices de naturaleza acíclica. Estas diferencias se pueden explicar debido a las diferencias en los tamaños de las cavidades de las matrices estudiadas. Los macrociclos en estudio (β -ciclodextrina y CB[7]) presentan un tamaño de cavidad discreto que no puede variarse de manera importante. La β -ciclodextrina es más flexible debido a la naturaleza de los enlaces que conforman la macromolécula comparada con el CB[7] donde los enlaces son rígidos. Debido a esto, se presentan constricciones en los portales de entrada de la cavidad que no permiten la inclusión completa, disminuyendo el número de interacciones posibles con la molécula huésped lo que se traduce en menores valores para las constantes de asociación. En el caso de las matrices acíclicas como el M1C4 y el M2C4, la cavidad es flexible, permitiendo un acomodo más eficiente de moléculas de mayor tamaño dentro de ella y maximizando, de esta forma, las interacciones de asociación entre matriz y huésped, dando como resultado valores más altos para las constantes de asociación. Además, la

presencia de grupos aromáticos en las estructuras de las matrices acíclicas estudiadas, permiten interacciones adicionales con moléculas en cuya estructura se encuentran grupos de tipo aromático, generando nuevas interacciones que contribuyen al aumento de la fuerza de la interacción.

Tabla 4.5: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de azul nilo con las matrices supramoleculares en estudio

	Absorción K_{as} (M^{-1})	Emisión K_{as} (M^{-1})	Corrimiento de Stokes (cm^{-1})
NB búfer	-	-	939
NB@ β -ciclodextrina	$(8,96 \pm 0,66) \times 10^2$	$(1,58 \pm 0,06) \times 10^3$	920
NB@CB[7]	$(3,73 \pm 0,24) \times 10^4$	$(4,60 \pm 0,19) \times 10^4$	715
NB@M1C4	$(6,18 \pm 0,31) \times 10^4$	$(1,11 \pm 0,09) \times 10^6$	317
NB@M2C4	-	$(9,42 \pm 0,62) \times 10^6$	340

La tabla 4.5 también resume los corrimientos de Stokes del azul nilo formando parte de los compuestos de inclusión. Se incluye el corrimiento de Stokes de la molécula sin incluir a modo de comparación. Se observa una disminución en el corrimiento de Stokes del azul nilo al estar incluido dentro de las matrices, lo cual se debe a) al mayor confinamiento de la molécula en la cavidad de las matrices; b) a la menor polaridad de la cavidad de la matriz respecto al solvente (búfer fosfato). Ambos procesos provocan una menor relajación geométrica y por solvente de la molécula de azul nilo, disminuyendo el corrimiento de Stokes.

Se estudiaron los cambios en la intensidad de emisión de los compuestos formados con azul nilo calculando el cociente entre los máximos de intensidad de fluorescencia de los compuestos de inclusión con el azul nilo en búfer. Los resultados son presentados en la tabla 4.6. Se muestran también las concentraciones de la matriz utilizada y la longitud de onda a la cual se realizó el cociente de intensidades. Se observa que, con la excepción de MIC4, todas las matrices producen un aumento en la fluorescencia de orden 1,5 a 2,5 respecto del fluoróforo en búfer. Este aumento puede deberse a la desagregación del dímero de azul nilo provocada por la interacción de éste con las matrices supramoleculares. La desagregación del fluoróforo en solución acuosa provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia al haber más moléculas de la misma especie libres en solución posterior a la desagregación. Esto puede comprobarse al observar las titulaciones espectrofotométricas UV-Vis de azul nilo con las matrices supramoleculares. La banda de absorción del azul nilo en solución acuosa presenta dos bandas de absorción: la primera a 598 nm, corresponde a la absorción del dímero del azul nilo; la banda principal a 633 nm corresponde a la absorción del monómero. Al ir aumentando la concentración de las matrices durante la titulación, se observa (Figura B17, Anexos) una disminución de la banda de absorción del dímero, la cual desaparece luego de cierta concentración.

Tabla 4.6: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de azul nilo en búfer.

	[Matriz] (M)	I_{CI}/I_{NB}	λ (nm)
NB búfer	-	1	673
NB@ β -ciclodextrina	$1,500 \times 10^{-3}$	1,6	673
NB@CB[7]	$7,176 \times 10^{-4}$	2,6	674
NB@M1C4	$3,556 \times 10^{-5}$	0,8	675
NB@M2C4*	$7,692 \times 10^{-6}$	2,7	673

[NB] = 2 μ M; () 0,2 μ M*

Se midieron los tiempos de decaimiento de fluorescencia del azul nilo y de los compuestos formados con las matrices supramoleculares. La tabla 4.7 resume los tiempos de fluorescencia obtenidos y las concentraciones de las especies utilizadas en la medición.

El azul Nilo presenta dos mecanismos de desactivación de la fluorescencia. El grupo flexible dietilamino es el principal responsable del proceso de decaimiento intramolecular; su denso sistema de niveles de energía rotacional facilita la transferencia de energía dentro de la molécula. Intermolecularmente, el mecanismo puede estar conectado con la transferencia de protones en el estado excitado. Las moléculas en estado excitado pueden reaccionar con protones en una reacción de equilibrio produciendo cationes doblemente cargados los cuales decaen más rápido que los que sólo presentan una carga³.

Para los compuestos de inclusión estudiados, se observan dos tiempos de decaimiento de fluorescencia. En todos los casos, los tiempos de decaimiento son mayores que la molécula de azul nilo en búfer, indicando que la asociación con las matrices retrasa el tiempo de decaimiento. Esto puede deberse a que los mecanismos de desactivación de la fluorescencia que presenta el azul nilo se ven afectados debido a la presencia de la matriz. Es sabido que las matrices de cucurbiturilos afectan los equilibrios de protonación de ciertas especies, lo cual podría interferir en el mecanismo de desactivación intermolecular del azul nilo. Así también, debido a la inclusión, el grupo dietilamino puede ver restringidos sus grados de libertad rotacional, lo cual puede interferir con el mecanismo de desactivación intramolecular.

Tabla 4.7: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con azul nilo y las matrices supramoleculares en estudio.

	[Matriz] (M)	τ_1 (ns)	F1	τ_2 (ns)	F2
NB buffer	-	$2,00 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	0,48
NB@ β -ciclodextrina	$1,50 \times 10^{-3}$	$2,38 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$	0,61
NB@CB[7]	$1,13 \times 10^{-4}$	$3,84 \pm 0,34$	$0,12 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,01$	0,88
NB@M1C4	$3,56 \times 10^{-5}$	$2,74 \pm 0,16$	$0,38 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,01$	0,53
NB@M2C4*	$7,70 \times 10^{-6}$	$2,54 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	0,37

[NB] = 2 μ M; (*) 0,2 μ M

4.4 Estudios de las constantes de asociación y de los cambios en las propiedades de absorción y fluorescencia de los compuestos de inclusión formados con tioflavina T.

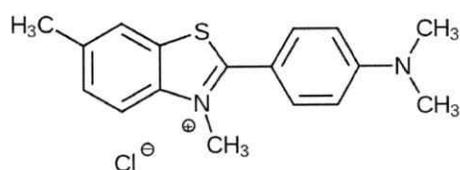


Figura 4.8: Estructura química de la tioflavina T

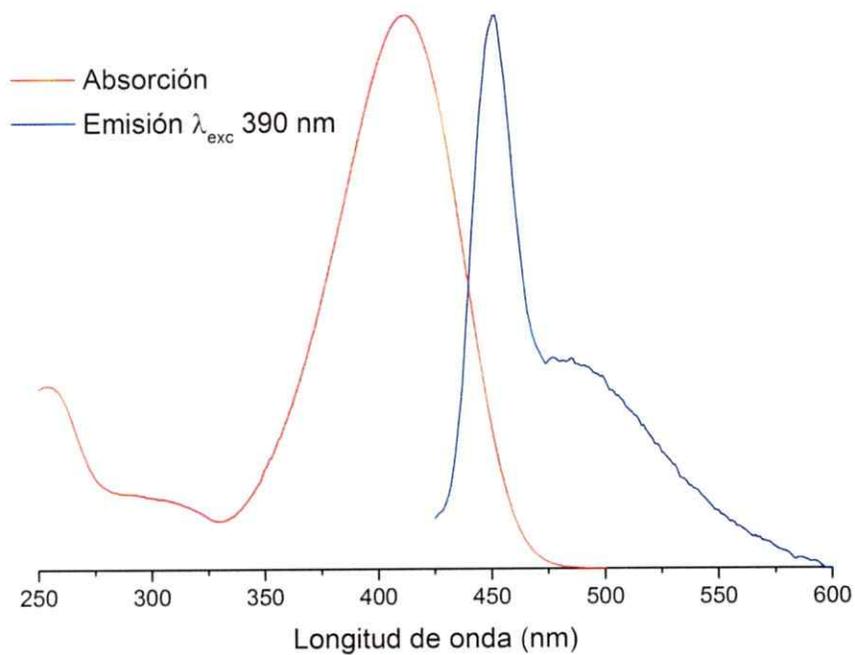


Figura 4.9 Espectros de absorción y emisión normalizados de la tioflavina T en búfer

fosfato 100 mM pH = 7. Concentración de tioflavina T 30 μ M para el espectro de absorción y 3 μ M para el de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 390$ nm)

En la figura 4.8 se presenta la estructura química de la tioflavina T. En la figura 4.9, se observan los espectros normalizados de absorción y emisión de tioflavina T en búfer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 100 mM a pH =7. El espectro de absorción presenta un máximo de absorción a 412 nm ([tioflavina T] = 30 μ M). El máximo de emisión de encuentra a 452 nm ($\lambda_{exc} = 390$ nm, [tioflavina T] = 3 μ M)

En la tabla 4.8 se presentan las constantes de asociación obtenidas mediante espectroscopía UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia para la formación de los compuestos entre las matrices supramoleculares en estudio y la tioflavina T. Se observa la presencia de dos constantes de asociación para la mayoría de los compuestos de inclusión, debido a la formación de compuestos de inclusión 2:1 matriz:huésped, lo cual es concordante con lo reportado en la literatura^{4,5}.

Al igual que en los casos anteriores, las constantes de asociación son mayores para los compuestos de inclusión formados con las matrices acíclicas. Además, se observa un aumento en los corrimientos de Stokes de la molécula de tioflavina debidos a la inclusión de la molécula dentro de las cavidades de las matrices supramoleculares. Este aumento se debe fundamentalmente, al retardo en el movimiento torsional de la tioflavina dentro de las matrices supramoleculares provocado por el confinamiento de la cavidad⁶.

Tabla 4.8: Constantes de asociación y corrimientos de Stokes de los compuestos de inclusión de tioflavina T con las matrices supramoleculares en estudio

	Absorción K_{as} (M^{-1})	Emisión K_{as} (M^{-1})	Corrimiento de Stokes (cm^{-1})
ThT búfer	-	-	2148
ThT@ β -ciclodextrina (2:1)	-	$K_{as1} = (1,36 \pm 0,44) \times 10^3$ $K_{as2} = (2,25 \pm 0,86) \times 10^3$	-
ThT@CB[7] (2:1)	$(4,81 \pm 0,56) \times 10^4$	$K_{as1} = (5,06 \pm 0,28) \times 10^4$ $K_{as2} = (1,25 \pm 0,21) \times 10^2$	2680
ThT@M1C4 (2:1)	-	$K_{as1} = (1,55 \pm 0,18) \times 10^6$ $K_{as2} = (8,51 \pm 0,28) \times 10^3$	2377
ThT@M2C4	-	-	2672

La fluorescencia de la molécula de tioflavina T depende fuertemente de la viscosidad del medio en el que se encuentra debido a la presencia del enlace rotable que une los dos anillos de la molécula. Debido a esto, cualquier variable (ej. viscosidad del solvente) que restrinja el movimiento a través de este enlace generará un aumento o disminución en la intensidad de fluorescencia de esta molécula. En la tabla 4.9 se resumen los cambios en la intensidad de la fluorescencia de la tioflavina T posterior a la inclusión de esta dentro de las cavidades de las matrices estudiadas. Se observa que la intensidad de la fluorescencia de la tioflavina T aumenta drásticamente debido a la inclusión de la molécula en las matrices supramoleculares. Este aumento se debe fundamentalmente a la restricción de grados de libertad rotacional en el enlace que une los anillos en la molécula, restricción que se produce por el reacomodo de la molécula dentro de la cavidad discreta de las

matrices. Esta restricción genera un aumento de la intensidad de fluorescencia de la molécula. En la tabla se observa que el compuesto formado con M1C4, una de las matrices acíclicas de este estudio, produce un aumento de la fluorescencia en un factor de 85.

Tabla 4.9: Longitud de onda del máximo de fluorescencia y cocientes entre los máximos de las intensidades del complejo de inclusión y de tioflavina T en búfer.

	[Matriz] (M)	I_{CI}/I_{ThT}	λ (nm)
ThT búfer	-	1	452
ThT@ β -ciclodextrina	$3,120 \times 10^{-3}$	1,4	450
ThT@CB[7]	$8,000 \times 10^{-4}$	32	471
ThT@M1C4	$7,597 \times 10^{-5}$	85	474
ThT@M2C4	$4,329 \times 10^{-5}$	27	482

[ThT] = 3 μ M

La tioflavina T pertenece a la clase de los rotores moleculares, los cuales, en el estado excitado, sufren un decaimiento no radiativo muy rápido y, por tanto, exhiben rendimientos cuánticos de fluorescencia inusualmente bajos⁵. Este fenómeno ha sido atribuido a los movimientos torsionales altamente eficientes de los anillos de benzotiazol y dimetilaminobenceno. Los tiempos de decaimiento de fluorescencia de la tioflavina T son altamente sensibles a la viscosidad del solvente en el que se encuentra. Ya que la relajación torsional de la molécula debiese reducirse al formar parte de compuestos de inclusión, los tiempos de decaimiento fluorescencia deberían aumentar. En la tabla 4.10 se presentan los tiempos de decaimiento de fluorescencia de la tioflavina T y de sus

respectivos compuestos de inclusión formados con las matrices en estudio. Se observan aumentos en los valores comparados con los de la tioflavina T en búfer. Estos aumentos corresponden a la restricción de grados de libertad rotacional en la molécula, posteriores a su acomodo dentro de las cavidades de las matrices supramoleculares en estudio, y que se relaciona con el aumento de la intensidad de la fluorescencia de la molécula (tabla 3.8). La aparición de una segunda exponencial en el ajuste de los datos puede deberse a la formación de compuestos con estequiometría 2:1 matriz:huésped, debido a un aumento en las conformaciones posibles que la molécula puede adoptar. A pesar de esto, en general, se observa un aumento de la rigidez de la molécula de tioflavina T en la interacción con las matrices en estudio. Los aumentos en los tiempos de decaimiento pueden racionalizarse en términos de las modulaciones esperadas en los caminos de desactivación radiativos y no-radiativos de la especie que emite debido a su interacción con las matrices. Además de la reducción del canal de decaimiento no radiativo debido a la inclusión, el canal de decaimiento radiativo puede verse favorecido por la reducida polarizabilidad de la molécula huésped dentro de la cavidad de la matriz, la cual es mucho menos polar que el solvente, en este caso búfer fosfato⁵.

Tabla 4.10: Tiempos de vida de fluorescencia para los compuestos de inclusión formados con tioflavina T y las matrices supramoleculares en estudio.

	[Matriz] (M)	τ_1 (ns)	F1	τ_2 (ns)	F2
ThT buffer	-	1,24 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,001*	0,06
ThT@ β -ciclodextrina	3,12 x 10 ⁻³	1,79 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,001*	0,04
ThT@CB[7]	8,00 x 10 ⁻⁴	2,21 ± 0,04	0,60 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,40
ThT@M1C4	7,60 x 10 ⁻⁵	1,65 ± 0,02	0,83 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,17
ThT@M2C4	4,33 x 10 ⁻⁵	2,32 ± 0,11	0,50 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,50

[ThT] = 3 μ M

** scattering*

4.5 Comentarios finales del capítulo

Se estudiaron las propiedades fotofísicas de los compuestos de inclusión de las cuatro matrices propuestas en este estudio con tres distintos fluoróforos: rodamina B, tioflavina T y azul nilo.

Respecto a las constantes de asociación: Se calcularon las constantes de asociación en la formación de los compuestos de inclusión de los fluoróforos con las cuatro matrices estudiadas, mediante espectroscopía UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia. Se observa que las matrices acíclicas forman compuestos de inclusión con los fluoróforos con constantes de asociación mucho mayores que las obtenidas para los compuestos de inclusión formados con β -ciclodextrina y CB[7]. Esto debido a la naturaleza acíclica de

las matrices M1C4 y M2C4, que permiten acomodar a la molécula completa dentro de su cavidad de mayor tamaño, maximizando así las interacciones entre matriz y huésped. Los valores de las constantes de asociación de las matrices acíclicas con los fluoróforos determinadas son del orden de $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$, dos o tres órdenes de magnitud mayores que las obtenidas con los macrociclos. A pesar de eso, la velocidad de intercambio entre la formación del compuesto de inclusión y su desasociación, es mucho mayor para las matrices acíclicas debido a que su cavidad no se encuentra cerrada, como se pudo determinar por los estudios de resonancia magnética nuclear de protones. El ensanchamiento de las bandas de los protones o incluso su desaparición del espectro, es indicativo de que las velocidades de intercambio del fluoróforo dentro y fuera de la cavidad son mayores que lo que se observa con los macrociclos.

Respecto a las diferencias en las constantes de asociación obtenidas mediante las dos técnicas utilizadas en este estudio, cabe mencionar que cuando ocurre el proceso de asociación entre el fluoróforo y la matriz supramolecular, la unión de ambas especies puede ser de diferente naturaleza ya sea en el estado excitado o en el basal. Esto puede explicarse cuando ocurren cambios conformacionales inducidos por la luz, o cuando una redistribución de las cargas en el estado excitado provoca cambios en las interacciones electrónicas en el complejo matriz-huésped⁷.

Respecto a la estequiometría de asociación: Se realizó el método de las variaciones continuas para la formación de todos los compuestos de inclusión estudiados en esta tesis para determinar la estequiometría de la inclusión. A pesar de que la mayoría de los gráficos

de Job indicó que la estequiometría predominante era 1:1, se observaron muchas desviaciones al tratar de ajustar las curvas obtenidas mediante las titulaciones espectrofotométricas, ya que éstas indicaban la presencia de otras estequiometrías posibles. Estas desviaciones de la estequiometría 1:1 son dependientes de la concentración y del tamaño de la molécula huésped.

Respecto a los cambios en la fluorescencia observados posterior a la inclusión: La inclusión de un fluoróforo dentro de una cavidad afecta los caminos de decaimiento radiativo y no radiativo debido a que el fluoróforo le entrega protección mecánica al posible apagamiento de la fluorescencia por desactivación atribuida al medio que lo rodea (solvente, especies químicas presentes en la solución) y al confinamiento del fluoróforo dentro de la cavidad de la matriz que restringe grados de libertad, rotacionales y vibracionales, que pueden apagar la fluorescencia. En este estudio se observó apagamiento y amplificación de la fluorescencia.

Rodamina B: En el caso de la rodamina B se observó un apagamiento de la fluorescencia posterior a su inclusión en las cavidades de β -ciclodextrina y M1C4. Sin embargo, se observó un aumento de la fluorescencia con M1C4 debida a la formación de un compuesto de inclusión 1:1/2:1 matriz:huésped. Por tanto, los cambios en la fluorescencia de rodamina B en presencia de M1C4 son dependientes de la concentración.

Para CB[7] y M2C4 se observó un aumento de la fluorescencia posterior a la inclusión de rodamina B dentro de las cavidades de estos macrociclos. En ambos casos, el aumento fue

un poco mayor al doble de la emisión inicial, sin embargo, debido a las diferentes constantes de asociación, el aumento ocurre a menor concentración de M2C4.

Azul Nilo: Para el azul nilo, el único compuesto de inclusión que presentó un apagamiento de la fluorescencia correspondió al formado con M1C4, el cual se redujo a la mitad. Para los compuestos de inclusión formados con las otras matrices, se observó un aumento de la fluorescencia debida, principalmente, a la desagregación del fluoróforo. El azul nilo presenta una constante de dimerización en agua muy alta, de orden 10^5 [8], por lo cual, la presencia de estos macrociclos logra desarmar los dímeros, aumentando así la fluorescencia. Cabe señalar el valor de la constante de asociación del azul nilo con ambas matrices acíclicas la cuales son de orden 10^6 , valor muy grande comparado con las constantes de asociación obtenidas para la formación de los compuestos de inclusión de azul nilo con los macrociclos estudiados.

Tioflavina T: La tioflavina presenta un caso especial en este estudio debido a que su emisión depende fuertemente de la viscosidad del medio. Esto se debe a la presencia del enlace simple que une el anillo de benzotiazol y al anillo de benceno, el cual tiene libertad de rotación entre 37° y 90° . Mediante estudios computacionales⁹ se ha demostrado que en presencia de solventes con baja viscosidad (agua) la transición desde el estado basal al excitado implica una rotación a través del enlace mencionado anteriormente, el cual cambia desde 37° a 90° , lo que produce que la fuerza del oscilador se vuelva cero, produciendo un apagamiento de la fluorescencia. En medios con mayor viscosidad, esta rotación se ve impedida, por lo cual no se observa este apagamiento.

Se observó, en todos los compuestos de inclusión estudiados, un aumento de la fluorescencia de la tioflavina T en agua. Esto se debe a que confinamiento de la molécula dentro de las cavidades de las matrices estudiadas restringe grados de libertad rotacional (evitando así la rotación a través enlace observado en medios de baja viscosidad). A pesar de que en todos los casos se observó un aumento de la fluorescencia respecto al compuesto sin incluir, cabe destacar el gran aumento en la fluorescencia de la tioflavina T posterior a la inclusión de ésta en la cavidad de M1C4. En base a los resultados de la titulación por fluorescencia, se obtuvo que la tioflavina T puede formar un compuesto de inclusión de estequiometría 2:1 matriz:huésped el cual produce un aumento significativo de la fluorescencia del fluoróforo.

5

Fluorescencia en estado sólido

5.1 Síntesis, caracterización y depósito de nanopartículas de plata sobre vidrio

Se llevó a cabo la modificación de las superficies de vidrio con nanopartículas de plata sobre la cual se procederían a depositar los compuestos de inclusión de los colorantes con las matrices en estudio. Para esto se realizó la síntesis de las nanopartículas de plata, en solución acuosa, empleando hidroxilamina como agente reductor. La figura 5.1 muestra el espectro de extinción de las partículas sintetizadas en este estudio. Se observa un máximo en 410 nm consistente con el plasmón de absorción de la plata en estado nanoparticulado de morfología esférica. Para dar indicios sobre el tamaño de las nanopartículas sintetizadas se realizó un análisis de dispersión dinámica de luz. La figura 5.2 muestra el histograma de tamaños obtenido en triplicado mediante esta técnica de las partículas sintetizadas. Se observa que la distribución de tamaños varía desde 2 nm hasta los 6 nm con una baja dispersión.

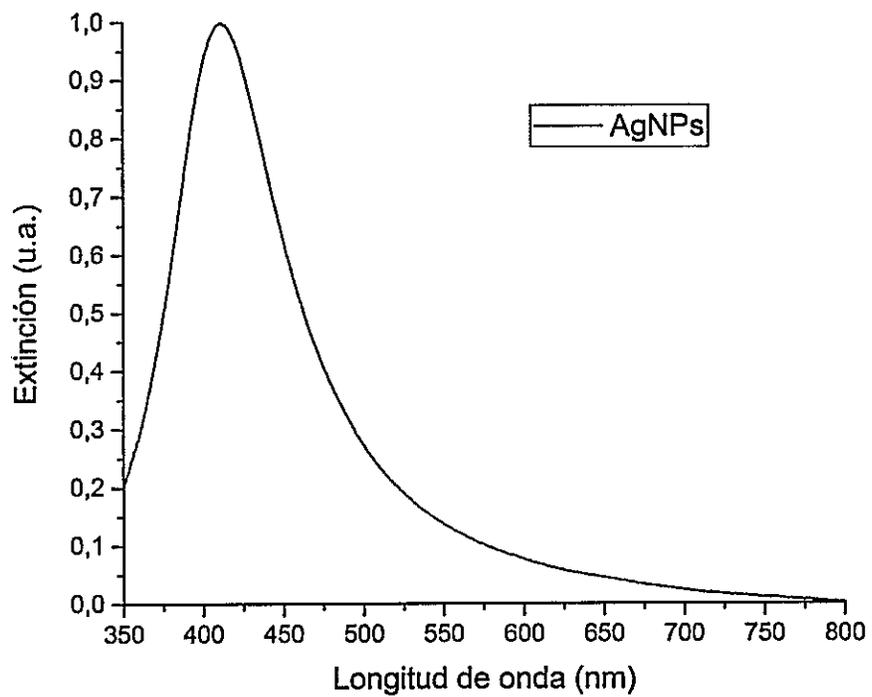


Figura 5.1: Espectro de extinción de las nanopartículas de plata sintetizadas en este estudio.

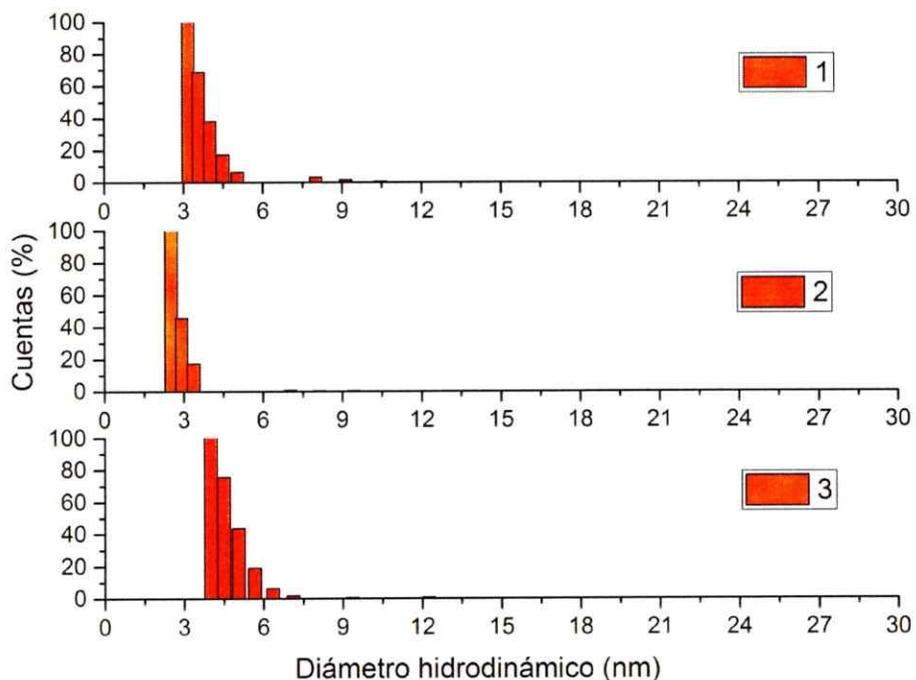


Figura 5.2: Histograma de distribución de tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de plata sintetizadas en este estudio. El análisis se presenta en triplicado.

El vidrio modificado con el polímero fue sometido a un tratamiento con el coloide de las nanopartículas para su depósito sobre la superficie. Para comprobar el depósito de las nanopartículas, se realizó un estudio de espectroscopia UV-Vis de los vidrios modificados. En la figura 5.3 se observan los espectros de extinción de once vidrios diferentes modificados con nanopartículas. Se observa que en todos los casos es posible evidenciar el plasmón correspondiente a las nanopartículas de plata. Esto significa que las nanopartículas de plata depositadas sobre el vidrio mantienen su entidad, conservando el

plasmón de absorción. La aparición de un 'hombro' en la banda de extinción de las nanopartículas depositadas en vidrio es característica de la naturaleza del metal y se debe a que la luz incidente no es homogénea alrededor de la partícula, produciendo pérdidas de energía, las cuales inducen una resonancia de cuadrupolo débil, la que se manifiesta como el hombro observado en el espectro de extinción¹. La banda a que aparece a menor energía, presenta un corrimiento, respecto del espectro de extinción de las nanopartículas en agua, debido al cambio de medio que rodea las partículas (aire). Finalmente, se observa la aparición de una banda de absorción ancha con máximo entre 600-700 nm lo cual podría indicar un cambio en la morfología (el alargamiento de una de las dimensiones de las nanopartículas debido a la aglomeración de las partículas en la superficie del vidrio) generando la aparición de un plasmón de absorción longitudinal.

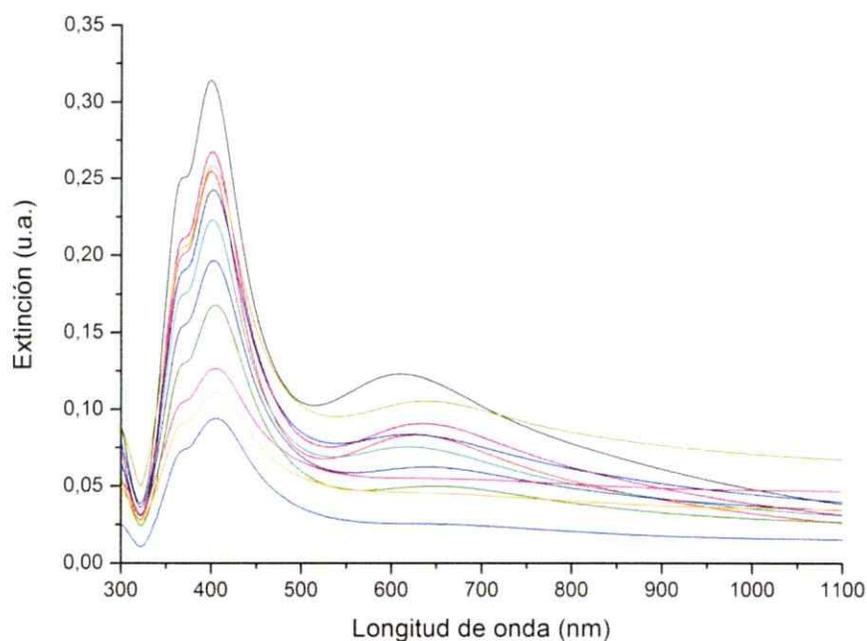


Figura 5.3: Espectro de extinción de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado. Se presentan los espectros de 11 vidrios diferentes, modificados en un mismo baño.

Para estudiar la morfología de las nanopartículas depositadas sobre vidrio modificado, se realizó un análisis mediante microscopía de fuerza atómica de la superficie. La figura 5.4 muestra una topografía general ($10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) de la superficie del vidrio modificado con nanopartículas. Se observa la distribución de las nanopartículas de plata en la superficie del vidrio. Además, se presenta un histograma de alturas de las nanopartículas, el cual muestra que la distribución de tamaños varía entre los 10 a los 60 nm, indicando aglomeración de las partículas en la superficie, comparado con el tamaño de partícula obtenido en la suspensión coloidal. La aglomeración de las partículas en la superficie del

vidrio explica la aparición del plasmón de absorción longitudinal en los espectros de absorción UV-Vis registrados del vidrio modificado. A pesar de la aglomeración, se observa una distribución homogénea sobre la superficie de vidrio.

Para observar la superficie con mayor detalle se registró una micrografía a menor tamaño de área ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) (**a**), Figura 5.5) y su imagen tridimensional. Se observa la morfología tipo esferoide de las partículas en la superficie del vidrio. Además, se obtuvo una ampliación de la misma imagen ($120\ \text{nm} \times 120\ \text{nm}$) para visualizar una sola partícula y su proyección tridimensional. Se procedió a medir la partícula, obteniendo valores de alrededor de $30\ \text{nm}$ en una de sus dimensiones (Z) y de $200\ \text{nm}$ en la dimensión que ocupa la partícula sobre la superficie del vidrio (XY).

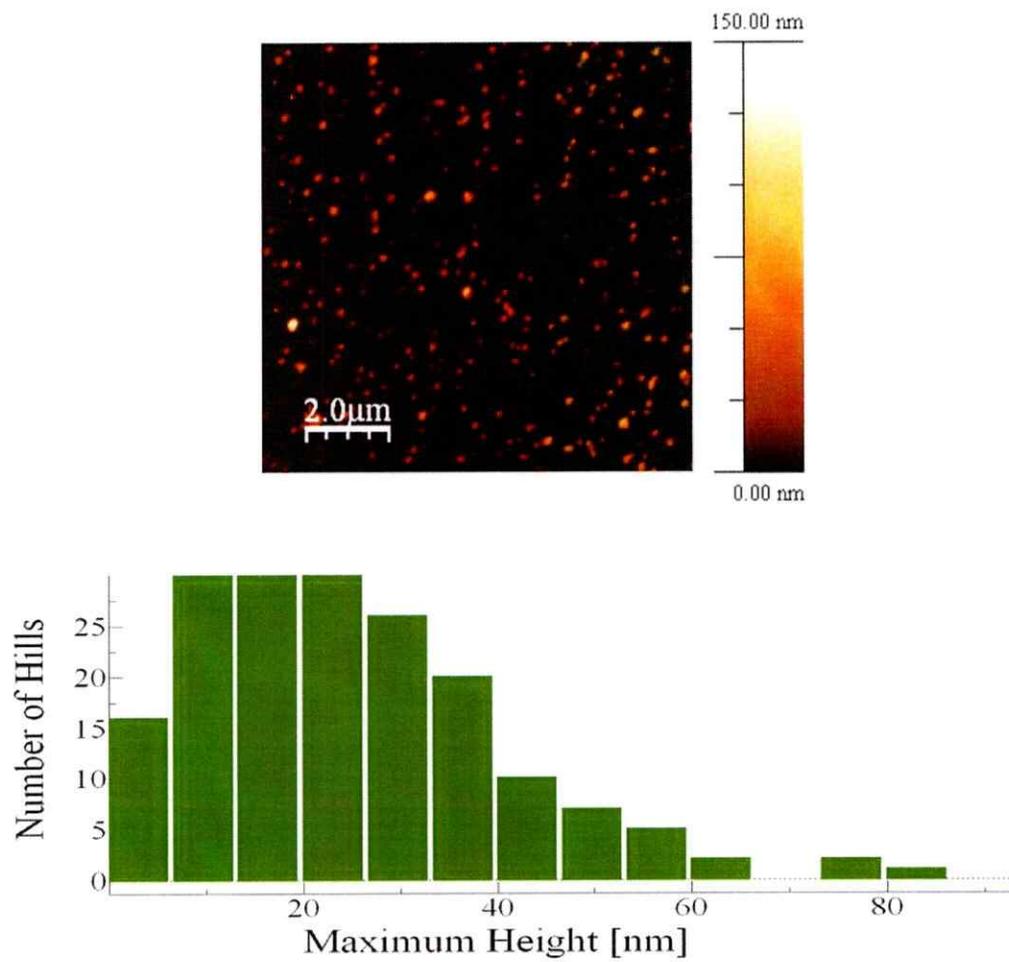


Figura 5.4: Topografía (10 μm x 10 μm) e histograma de tamaño (Z) de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado con polímero catiónico.

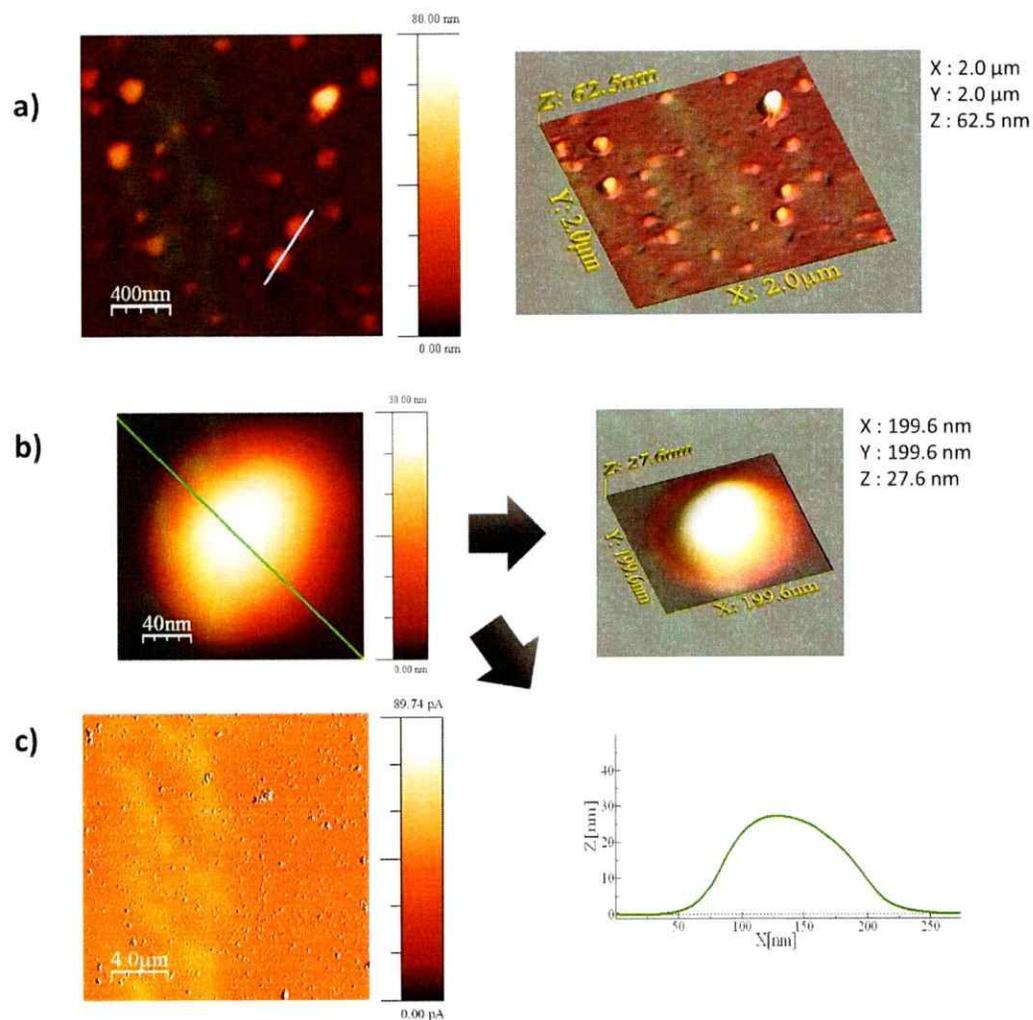


Figura 5.5: a) Topografía de la superficie ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) e imagen tridimensional de las nanopartículas de plata depositadas sobre vidrio modificado con polímero; b) Imagen ($120 \text{ nm} \times 120 \text{ nm}$, ampliada) de una sola partícula, imagen tridimensional de la partícula y medición del largo/ancho de ésta. La línea verde representa la longitud medida; c) Imagen de fase ($20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$) de la superficie.

5.2 Fluorescencia en estado sólido

5.2.1 Rodamina B

Una vez modificado el vidrio con las nanopartículas de plata se procedió a agregar el fluoróforo o el compuesto de inclusión respectivo sobre el vidrio. Para llevar a cabo este procedimiento, se intentaron dos métodos, depósito por gota (*drop coating*) y por inmersión (*dip coating*), para comparar resultados.

Para el depósito de rodamina B o sus compuestos de inclusión se prepararon soluciones de concentración 5×10^{-5} M de rodamina B en agua desionizada. A cada solución se le agregó la matriz correspondiente hasta alcanzar la concentración deseada. Se tomó una alícuota de 10 uL y se depositó sobre un vidrio modificado con nanopartículas y uno sin modificar (el vidrio sin modificar fue lavado con agua regia durante 24 horas para eliminar posibles impurezas). Los vidrios se dejaron secar al aire durante una noche, previo a las mediciones.

Los espectros de fluorescencia fueron registrados directamente sobre el vidrio modificado con el compuesto de inclusión, en un ángulo de 35° , longitud de onda de excitación a 520 nm. La figura 5.6 se presenta el espectro de la rodamina B en sólido sobre vidrio sin modificar, y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata. Se observa el aumento de la fluorescencia de la rodamina en presencia de las nanopartículas, así como también el corrimiento del máximo de emisión hacia el azul. Para medios viscosos o vítreos, es

común observar un corrimiento del máximo de emisión hacia el azul debido a que el fluoróforo relaja a una escala de tiempo mucho más rápida que el tiempo que toma en reorientarse el solvente. Para medios de viscosidad moderada, el espectro de emisión depende del tiempo de vida de fluorescencia de la especie². Considerando que el tiempo de vida disminuye en presencia de superficies metálicas nanoparticuladas, es esperable este corrimiento hacia el azul para fluoróforos que presenten solvatocromismo debido a esta disminución en el tiempo de vida.

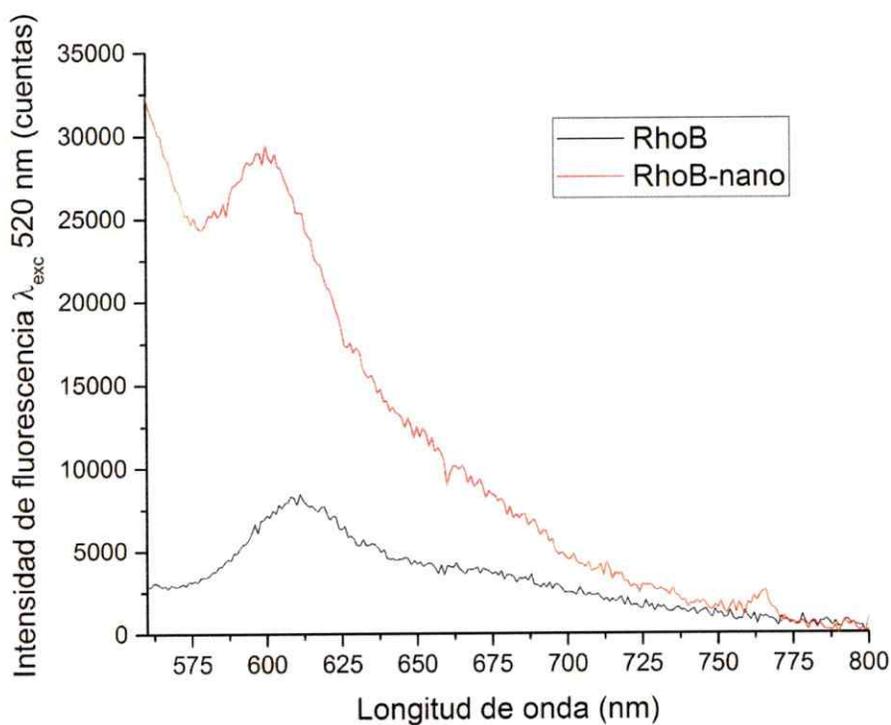


Figura 5.6: Espectro de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B sobre vidrio (negro) y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata (rojo)

La figura 5.7 presenta los espectros de emisión en sólido de la rodamina B y de los compuestos de inclusión de ésta con las matrices supramoleculares en estudio sobre vidrio sin modificar (A) y modificado con nanopartículas de plata (B). Ambos gráficos presentan la misma escala para poder establecer una comparación entre las intensidades. Es posible notar que, para todas las especies estudiadas, ya sea el fluoróforo sin incluir o incluido dentro de las matrices supramoleculares, se observó un aumento de la señal de fluorescencia en presencia de la superficie de vidrio modificada con nanopartículas. Al igual que en el caso de la rodamina B sobre vidrio, el corrimiento hacia el azul de la señal de fluorescencia es provocada por la presencia de las nanopartículas de plata en la superficie.

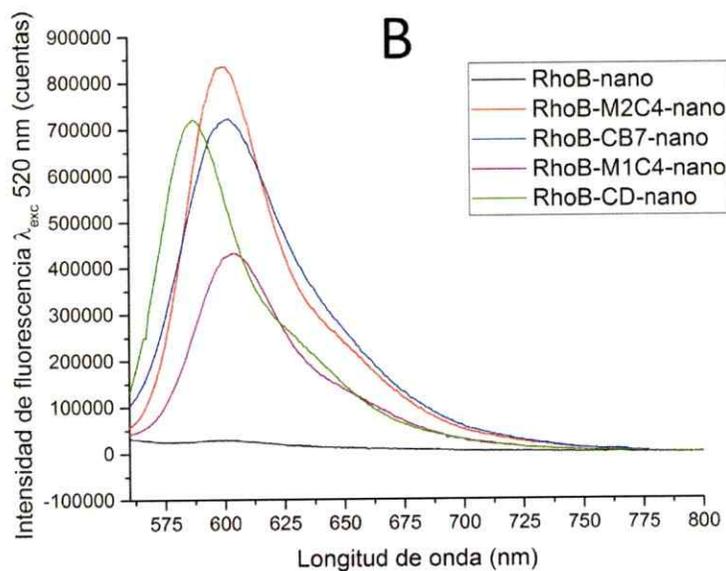
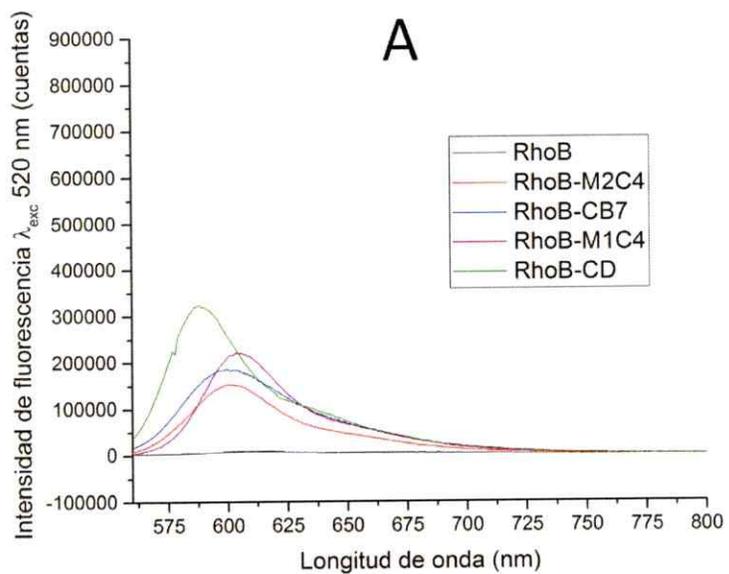


Figura 5.7: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B y compuestos de inclusión de ésta sobre A) vidrio sin modificar; B) vidrio modificado con nanopartículas de plata

La tabla 5.1 resume los cambios en el espectro de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B depositada sobre vidrio comparada con la misma especie depositada sobre vidrio modificado. Así también, se compara el cambio en la emisión de la rodamina B con la emisión de los compuestos de inclusión depositados sobre vidrio sin y con modificación. Se tabulan, asimismo, los corrimientos en el máximo de emisión debidos a la presencia de nanopartículas en la superficie, así como el debido al proceso de inclusión en una matriz supramolecular.

Tabla 5.1: Factores de amplificación de fluorescencia de los distintos compuestos de inclusión de rodamina B con las matrices estudiadas, respecto a la emisión de la misma, en estado sólido

	Area@/Area _{RhoB}	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
RhoB - RhoB/AgNps	3	-11
RhoB - RhoB@ β -ciclodextrina	22	-23
RhoB - RhoB@ β -ciclodextrina/AgNps	51	-24
RhoB - RhoB@CB[7]	16	-11
RhoB - RhoB@CB[7]/AgNps	63	-9
RhoB - RhoB@M1C4	16	-6
RhoB - RhoB@M1C4/AgNps	33	-7
RhoB - RhoB@M2C4	12	-10
RhoB - RhoB@M2C4/AgNps	62	-11

Para la amplificación de la fluorescencia de rodamina B debida a la superficie de nanopartículas de plata, se observó un aumento en un factor de 3 de la intensidad de fluorescencia. Este aumento es provocado por la superficie de nanopartículas sobre las que se encuentra depositada la molécula. Las nanopartículas de plata interactúan con la luz incidente mediante dos procesos: absorción y dispersión. Cuando la luz interactúa con las partículas de plata dos procesos ocurren simultáneamente: a) la absorción de energía de la radiación electromagnética provoca la oscilación resonante de la nube electrónica de las partículas, generando un plasmón de absorción. La energía absorbida de esta manera es disipada en forma de calor; b) la componente de dispersión representa la habilidad de la partícula para irradiar en el campo lejano. Las oscilaciones electrónicas generadas por el campo eléctrico de la onda incidente actúan como dipolos que pueden irradiar luz.

Lakowicz³ plantea que es la componente de dispersión de la partícula metálica la responsable del fenómeno de fluorescencia amplificada, la cual se debe a la inducción de plasmones en la molécula fluorescente, los cuales pueden irradiar a una tasa mayor de la que podrían hacerlo en ausencia de la nanopartícula metálica.

Al comparar la intensidad fluorescencia de la rodamina B depositada sobre vidrio sin modificar con la intensidad de fluorescencia de los compuestos de inclusión de esta misma, se observó en todos los casos estudiados un aumento de la fluorescencia. Los factores de aumento obtenidos para los compuestos de inclusión fueron: 22 para el compuesto formado con β -ciclodextrina, 16 para CB[7], 16 para M1C4 y 12 para M2C4. Este aumento inesperado de la fluorescencia de la rodamina B al estar incluida dentro de

la cavidad de las matrices supramoleculares estudiadas puede ser causado por factores estructurales. El empaquetamiento en estado sólido de la rodamina B presenta mecanismos de desactivación de la fluorescencia provocados por las interacciones del tipo $\pi - \pi$ que se generan en el estado sólido⁴. La presencia de las matrices supramoleculares provoca la desagregación del ordenamiento en el estado sólido, evitando estos caminos de decaimiento no radiativo de la molécula. Mediante este proceso de encapsulamiento fue posible aumentar la fluorescencia de la molécula en el estado sólido en valores que varían entre 10 a 20, dependiendo de la naturaleza de la matriz supramolecular.

Finalmente, se observa que la amplificación debida a la presencia de las nanopartículas de plata depositadas en el vidrio se produce también en los compuestos de inclusión de rodamina B con las matrices en estudio. En todos los casos se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia de la rodamina B incluida en la cavidad de las matrices debido a la presencia de las nanopartículas. Los factores de amplificación obtenidos fueron: 51 para el compuesto con β -ciclodextrina, 63 para CB[7], 33 para M1C4 y 62 para M2C4. Debido a que es necesaria una separación (entre 8 – 10 nm) entre el fluoróforo y la nanopartícula para producir la amplificación de la fluorescencia de este último, la matriz supramolecular funciona como un separador entre ambas entidades. El fluoróforo ve impedido el contacto con la superficie de las nanopartículas, evitando así el apagamiento de la fluorescencia. La amplificación, por tanto, se ve favorecida debido a la protección mecánica que ofrece la matriz supramolecular, la cual evita la necesidad de utilizar separadores adicionales.

Al comparar los factores de amplificación provocados por la inclusión de la molécula dentro de la cavidad de las matrices con el obtenido debido a la presencia de las nanopartículas metálicas sobre la superficie, es posible notar que no corresponden a la suma de las amplificaciones provocadas por ambos procesos individualmente.

5.2.2 Tioflavina T

Para la deposición de tioflavina T o sus compuestos de inclusión se prepararon soluciones de concentración 5×10^{-5} M del fluoróforo en agua desionizada. A cada solución se le agregó la matriz correspondiente hasta alcanzar la concentración deseada. Se tomó una alícuota de 70 μ L y se depositó sobre un vidrio modificado con nanopartículas y uno sin modificar (el vidrio sin modificar fue lavado con agua regia durante 24 horas para eliminar posibles impurezas). Los vidrios se dejaron secar al aire durante la noche, previo a las mediciones.

Se procedió a medir la fluorescencia de la tioflavina T en vidrio sin modificar. La figura 5.8 presenta los espectros de fluorescencia de la tioflavina T sobre sin modificar y modificado con nanopartículas de plata. La señal obtenida para la molécula en estado sólido es muy baja. Luego, se comparó la emisión de la tioflavina T sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata. Sin embargo, no se observó un aumento cuantificable en la señal de fluorescencia de la molécula.

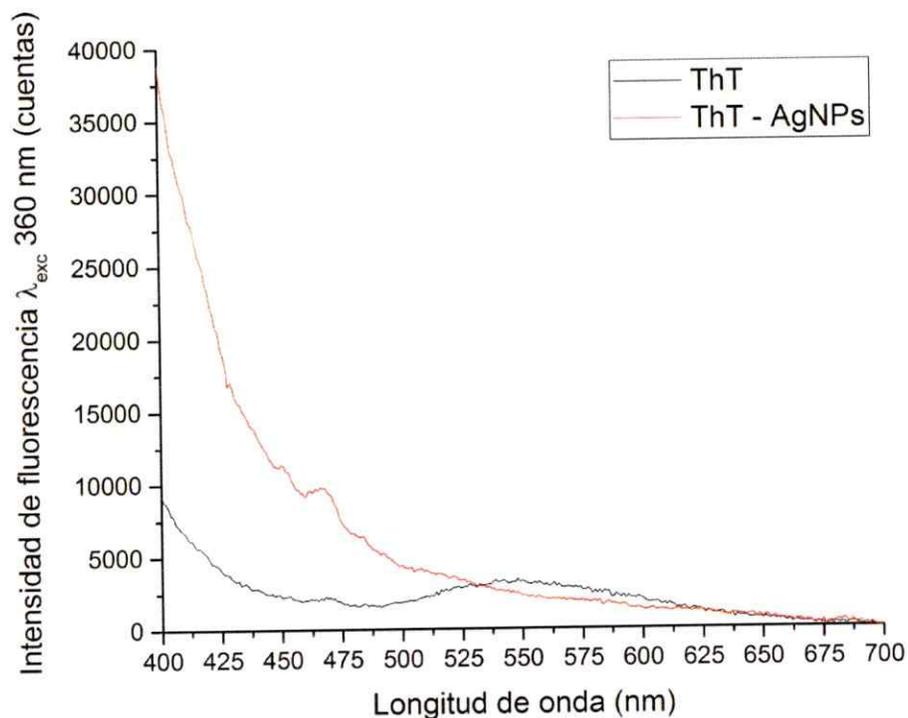


Figura 5.8: Espectro de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T sobre vidrio (negro) y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata (rojo)

Posteriormente se procedió a evaluar la señal fluorescente de la molécula que forma parte del compuesto de inclusión con las matrices supramoleculares en estudio. Se observó un aumento considerable de la fluorescencia de los compuestos formados con las matrices acíclicas M1C4 y M2C4. Respecto a los compuestos formados con β -ciclodextrina y CB[7], no se observaron cambios significativos en la señal de emisión de la tioflavina T.

Luego, los compuestos de inclusión fueron depositados sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata y se procedió a medir la señal fluorescente de estos. Para las matrices cíclicas, no se observó un aumento significativo de la fluorescencia debido a las partículas. Para los compuestos formados con las matrices acíclicas, se observaron dos fenómenos (Figura 5.9). El compuesto formado con M1C4, a pesar de producir un aumento significativo de la fluorescencia, presenta una disminución de la señal fluorescente debido a la presencia de nanopartículas en el vidrio. El compuesto formado con M2C4, por el contrario, presenta un aumento de la fluorescencia debida a la presencia de nanopartículas en el vidrio utilizado como soporte. Sin embargo, no fue posible calcular un factor de amplificación debido a que el *scattering* producido por las nanopartículas sobre la superficie del vidrio como también, a que el gran corrimiento en el máximo de la señal de emisión dificultó la comparación de las señales de la tioflavina T y de los compuestos de inclusión.

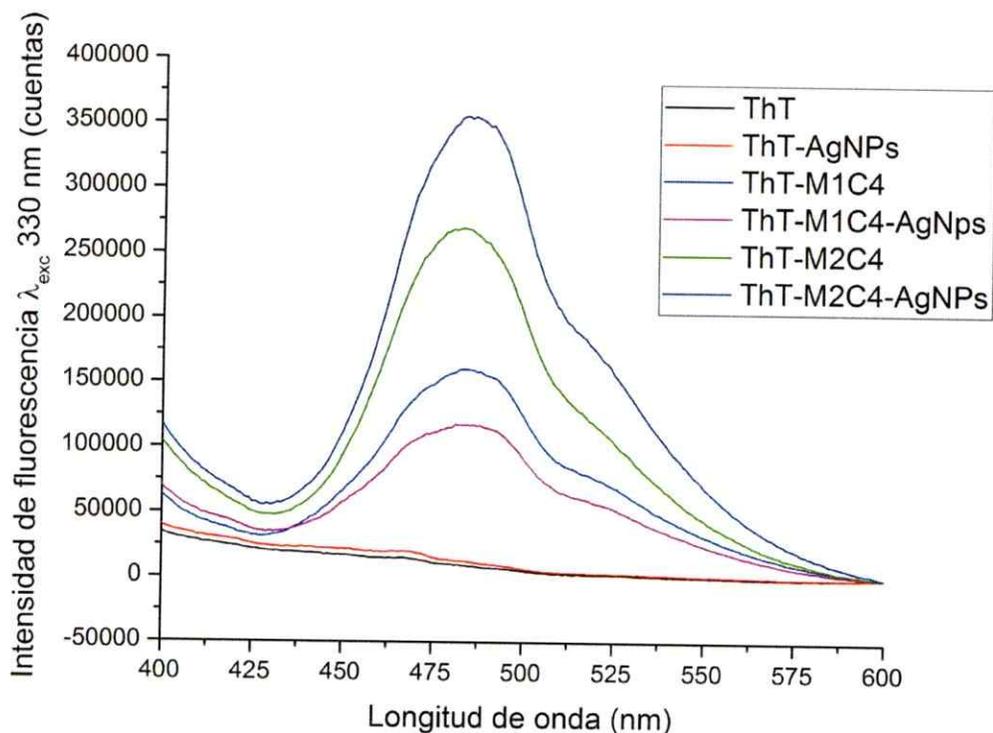


Figura 5.9: Espectros de fluorescencia de tioflavina T y de sus compuestos de inclusión con M1C4 y M2C4 en sólido, sobre vidrio y sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

5.2.3 Azul Nilo

Para la deposición de azul nilo o sus compuestos de inclusión se prepararon soluciones de concentración 5×10^{-5} M del fluoróforo en agua desionizada. A cada solución se le agregó la matriz correspondiente hasta alcanzar la concentración deseada. Se tomó una alícuota de 50 uL y se depositó sobre un vidrio modificado con nanopartículas y uno sin modificar

(el vidrio sin modificar fue lavado con agua regia durante 24 horas para eliminar posibles impurezas). Los vidrios se dejaron secar al aire durante la noche, previo a las mediciones.

Se procedió a medir la fluorescencia de las muestras preparadas, sin embargo, no fue posible obtener una señal de fluorescencia para el azul Nilo en estado sólido.

5.3 Comentarios finales del capítulo

La modificación de la superficie de vidrio con nanopartículas de plata se llevó a cabo eficientemente. En la figura 5.10 se muestra un esquema representativo del vidrio modificado con nanopartículas. La presencia de la carga positiva en la superficie del vidrio permite el depósito de las nanopartículas de plata de manera eficiente, debido a que la carga que rodea la superficie de éstas, es de naturaleza negativa (presencia de una capa de AgCl protectora, que vuelve más negativo el potencial de la nanopartícula)⁵.

Los espectros UV-Vis muestran la aparición de una banda de extinción a longitudes de onda mayores, lo cual es indicativo de la agregación de las nanopartículas en la superficie del vidrio. Las topografías obtenidas por AFM de la superficie modificada muestran las nanopartículas distribuidas homogéneamente. Se observa que la aparición del plasmón observado en los espectros de UV-Vis se debe a la agregación de las nanopartículas, formando geometrías elipsoidales, las cuales presentan este plasmón longitudinal asociado a la dimensión más larga de la partícula.

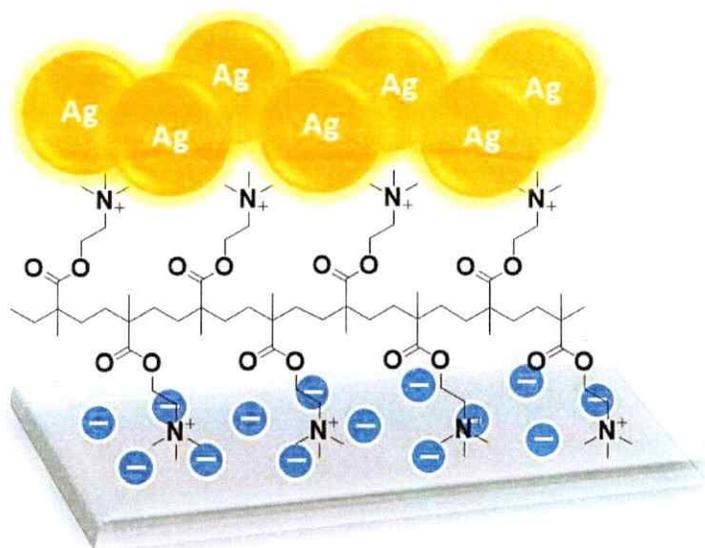


Figura 5.10: Esquema del vidrio modificado con nanopartículas de plata. Se representa la funcionalización del vidrio con polielectrolito catiónico MADQUAT y las nanopartículas interactuando con la carga positiva de la molécula orgánica.

Sobre la amplificación de fluorescencia en estado sólido

Rodamina B: La amplificación de fluorescencia de la rodamina B debido a la presencia de nanopartículas de plata ha sido estudiada previamente. Experimentos con nanopartículas de plata depositadas sobre paredes de cubetas de cuarzo produjeron una amplificación de la fluorescencia de la rodamina B en solución de un orden de $23^{[6]}$. En otros experimentos

se creó una monocapa de rodamina B cercano a una monocapa de nanopartículas de plata, obteniendo una amplificación de la fluorescencia del fluoróforo de orden 20^[7]. En este estudio, la amplificación de la rodamina B debida a la presencia de nanopartículas de plata fue de orden 4.

En este trabajo de tesis se midió previamente la fluorescencia del compuesto de inclusión formado entre la rodamina B y las matrices estudiadas. En todos los casos se observó un aumento de la fluorescencia del compuesto de inclusión respecto a la fluorescencia de la rodamina B depositada sobre vidrio, sin la presencia de nanopartículas de plata. Las amplificaciones varían dependiendo de la matriz utilizada, y corresponden a un aumento de 10 a 20 veces. Cabe señalar, que el compuesto de inclusión que mayor amplificación tuvo fue el de β -ciclodextrina con rodamina B.

Luego, se midió la fluorescencia de los compuestos de inclusión de rodamina B sobre el vidrio modificado con nanopartículas de plata. No se observó apagamiento de la fluorescencia debida a la presencia de la superficie nanoestructurada, observándose un aumento de fluorescencia, en todos los casos. La presencia de la matriz, la cual funciona como un separador entre la superficie nanoparticulada y la molécula fluorescente, es la que evita el apagamiento debido al contacto. La amplificación varía en el orden de 30 a 60, valores muy superiores a los reportados en la literatura, aunque no comparables debido a que las condiciones experimentales fueron distintas. Se observó entonces amplificación de la fluorescencia debido a factores independientes; el efecto de la inclusión del fluoróforo dentro de la cavidad de una matriz supramolecular, y la presencia de

nanopartículas de plata. Estas amplificaciones no son la sumatoria de las amplificaciones individuales, sino que un proceso sinérgico entre ambas.

Tioflavina T: Estudios acerca de la amplificación de fluorescencia de tioflavina T en presencia de nanopartículas metálicas son escasos. Destaca un reporte de aumento de fluorescencia en solución de agregados de plata ligados a tioflavina T⁸.

En este trabajo de tesis se estudió la amplificación de fluorescencia de tioflavina T en sólido, encontrándose que, tanto la formación de compuestos de inclusión con las matrices estudiadas, como la presencia de nanopartículas de plata, produce un aumento de la fluorescencia de este fluoróforo. La inclusión de tioflavina T dentro de las matrices supramoleculares acíclicas M1C4 y M2C4 se presentan como un método sencillo para mejorar la señal fluorescente de esta molécula en estado sólido.

Respecto a la sinergia observada en los fenómenos de amplificación de fluorescencia en el estado sólido, se puede intuir que se debe a ambos procesos. En primer lugar, la desagregación de las moléculas de los colorantes en el estado sólido produce una disminución de los caminos de desactivación no radiativos, lo que produce un aumento de la señal fluorescente en estado sólido, debido a la inclusión del fluoróforo en las cavidades de las matrices supramoleculares. Por otro lado, la amplificación de la fluorescencia debida a la superficie metálica nanoparticulada obedece a un fenómeno distinto. Independiente de la estructura cristalina de las moléculas fluorescentes, la amplificación ocurre por la generación de un campo eléctrico concentrado en las nanopartículas el cual

interactúa con la especie fluorescente en el campo lejano, siendo posible obtener una amplificación del colorante en estado sólido sin la necesidad de desagregar las moléculas.

Se puede resumir que en este estudio que el proceso amplificación la fluorescencia se debió a la contribución de dos factores. Un factor es la amplificación es debido a la presencia de las nanopartículas. El otro factor de amplificación es exclusivo al fenómeno de inclusión que restringe la movilidad del fluoróforo. El colorante desagregado forma parte, como molécula huésped una matriz supramolecular con una estructura cristalina nueva y corresponde a un nuevo sistema fluorescente, que presenta una señal mayor que el que la del sistema inicial. Este ensamble supramolecular es acoplado a nanopartículas depositadas sobre el vidrio, que amplificará con una señal mayor que la primera. La señal resultante, finalmente, será mayor que la suma de los procesos individuales.

6

Conclusión

La síntesis de cucurbiturilos acíclicos, respecto a los derivados cíclicos de cucurbiturilos, presenta la ventaja de ser un método escalable, de fácil purificación y que permite la introducción de grupos funcionales en las cadenas laterales para modificar sus propiedades de reconocimiento molecular y su solubilidad en agua. Además, debido a que poseen una cavidad flexible, permiten el ingreso de un rango más amplio de huéspedes, comparado con matrices supramoleculares que presentan una cavidad definida o rígida.

Los análisis de resonancia magnética nuclear de protones dieron cuenta de la formación de los compuestos de inclusión de las matrices en estudio (β -ciclodextrina, CB[7], M1C4, M2C4). Utilizando estudios de acoplamiento molecular, fue posible proponer una estructura para los compuestos de inclusión que fuera concordante con los análisis experimentales. A pesar de esto, M1C4 y M2C4 presentaron constantes de asociación de 2 o 3 órdenes de magnitud comparadas con β -ciclodextrina o cucurbit[7]urilo, lo que los hace candidatos más idóneos en el mejoramiento de las propiedades luminiscentes de moléculas orgánicas fluorescentes.

Las matrices supramoleculares estudiadas permiten mejorar las propiedades luminiscentes en estado sólido de los colorantes presentados debido a que permiten la separación del colorante de la superficie modificada con nanopartículas de plata, evitando de esta forma

el apagamiento de la fluorescencia, y evitando la necesidad de utilizar separadores adicionales en el diseño del dispositivo. Sumado a esto, la formación de compuestos de inclusión provoca la desagregación de las moléculas del colorante en el estado sólido, provocando un aumento adicional de la fluorescencia. Finalmente, la amplificación de fluorescencia debida a la presencia de las nanopartículas metálicas en la superficie ocurre sobre esta nueva entidad (compuesto de inclusión), generando una amplificación mayor que la suma de las amplificaciones individuales (una debida al encapsulamiento y la otra debida al efecto plasmónico).

BIBLIOGRAFÍA

Capítulo uno

- (1) Freeman, W.; Mock, W.; Shih, N. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *17*, 7367–7368.
- (2) Behrend, R.; Meyer, E.; Rusche, F. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1905**, *339*, 1.
- (3) Day, A.; Arnold, A.; Blanch, R.; Snushall, B. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 8094–100.
- (4) Kim, J.; Jung, I.; Kim, S.; Lee, E.; Kang, J. K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *19*, 540–541.
- (5) Day, A.; Blanch, R.; Arnold, A.; Lorenzo, S.; Lewis, G. R.; Dance, I. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2002**, *2*, 275–277.
- (6) Kim, K.; Selvapalam, N.; Oh, D. H. *Journal Of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2004**, *50*, 31–36.
- (7) Huang, W. H.; Liu, S.; Isaacs, L. In *Modern Supramolecular Chemistry: Strategies for Macrocyclic Synthesis*; Diederich, F.; Stang, P. J.; Tykwinski, R. R., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim, 2008; p. 113.
- (8) Halterman, R.; Moore, J.; Mannel, L. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *3266–3269*.

- (9) Thangavel, A.; Rawashdeh, A. M. M.; Sotiriou-Leventis, C.; Leventis, N. *Organic letters* **2009**, *11*, 1595–8.
- (10) Jiao, D.; Zhao, N.; Scherman, O. a *Chemical Communications* **2010**, *46*, 2007–9.
- (11) Jiao, D.; Scherman, O. A. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 2445.
- (12) Márquez, C.; Hudgins, R. R.; Nau, W. M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5806–16.
- (13) Buschmann, H.; Jansen, K.; Meschke, C.; Schollmeyer, E. *Journal of Solution Chemistry* **1998**, *27*, 135–140.
- (14) Zhang, G.-L.; Xu, Z.-Q.; Xue, S.-F.; Zhu, Q.-J.; Tao, Z. *Wuji Huaxue Xuebao* **2003**, *19*, 655–659.
- (15) Jansen, K.; Buschmann, H.; Wego, A.; Döpp, D.; Mayer, C.; Drexler, H.; Holdt, H.; Schollmeyer, E. *Journal Of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2001**, 357–363.
- (16) Nau, W.; Mohanty, J. *International Journal of Photoenergy* **2005**, *07*, 133.
- (17) T. V. S. Rao, J. B. Huff, and C. Bieniarz, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10627-10634.
- (18) A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, and G. B. Behera, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973-2011.
- (19) Y. Liu, B.-H. Han, and Y.-T. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4678-4687.
- (20) I. R. Politzer, K. T. Crago, T. Hampton, J. Joseph, J. H. Boyer, and M. Shah, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *159*, 258-262
- (21) B. Reija, W. Al-Soufi, M. Novo, and J. V. Tato, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1364-1370.
- (22) Kim, K.; Selvapalam, N.; Ko, YH. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*(2), 267–279.

- (23) Isaacs, L. *Chem. Commun.* **2009**, *6*, 619-629.
- (24) Isaacs, L. *Isr. J. Chem* **2011**, *52*, 578-591.
- (25) Ma, D.; Zavalij, P.V.; Isaacs, L. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4786-4795.
- (26) Lucas, D.; Isaacs, L. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4114-4115.
- (27) Ma, D.; Hettiarachchi, G.; Nguyen, D.; Isaacs, L. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 503-510.
- (28) Shen, C.; Ma, D.; Meany, B.; Isaacs, L.; Wang, YH. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7254 - 7257.
- (29) Nau, W.; Florea, M.; Assaf, K. *Isr. J. Chem* **2011**, *51*, 559 - 577
- (30) Macartney, D. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 2075 - 2089
- (31) Wagner, B. D.; Fitzpatrick, S. J. *Journal Of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2000**, *6*, 467-478.
- (32) D. Wagner, B. *Current Analytical Chemistry* **2007**, *3*, 183-195.
- (33) Wagner, B. D.; Fitzpatrick, S. J.; Gill, M. A.; MacRae, A. I.; Stojanovic, N. *Canadian Journal of Chemistry* **2001**, *79*, 1101-1104.
- (34) Bhasikuttan, A. C.; Mohanty, J.; Nau, W. M.; Pal, H. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46*, 4120-2.
- (35) Koner, A. L.; Nau, W. M. *Supramolecular Chemistry* **2007**, *19*, 55-66.
- (36) Marquez, C.; Huang, F.; Nau, W. M. *IEEE Transactions on Nanobioscience* **2004**, *3*, 39-45.
- (37) Mohanty, J.; Nau, W. M. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2005**, *44*, 3750-4.
- (38) Nau, W. M.; Greiner, G.; Wall, J.; Rau, H.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1998**, *42*, 98-101.

- (39) Nau, W. M.; Adam, W.; Scaiano, J. C. *Chemical Physics Letters* **1996**, *253*, 92–96.
- (40) Nau, W. M.; Greiner, G.; Rau, H.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1998**, *102*, 486–492.
- (41) Sinicropi, A.; Pogni, R.; Basosi, R.; Robb, M. a.; Gramlich, G.; Nau, W. M.; Olivucci, M. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2001**, *40*, 4185–4189.
- (42) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. a *Analytical chemistry* **1998**, *70*, 2651–9.
- (43) Nau, W.; Pischel, U. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1999**, *38*, 2885–2888.
- (44) Sinicropi, A.; Pischel, U.; Basosi, R.; Nau, W. M.; Olivucci, M. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2000**, 4582–4586.
- (45) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 713–20.
- (46) Mohanty, J.; Jagtap, K.; Ray, A. K.; Nau, W. M.; Pal, H. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3333–8.
- (47) Gadde, S.; Batchelor, E. K.; Weiss, J. P.; Ling, Y.; Kaifer, A. E. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 17114–9.
- (48) Mohanty, J.; Pal, H.; Ray, A. K.; Kumar, S.; Nau, W. M. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 54–6.
- (49) Bhasikuttan, A. C.; Pal, H.; Mohanty, J. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 9959–71.
- (50) Mohanty, J.; Choudhury, S. D.; Upadhyaya, H. P.; Bhasikuttan, A. C.; Pal, H. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 5215–9.

- (51) Lau, V.; Heyne, B. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 3595–7.
- (52) Macartney, D. H. *Israel Journal of Chemistry* **2011**, *51*, 600–615.
- (53) Praetorius, A.; Bailey, D. M.; Schwarzlose, T.; Nau, W. M. *Organic Letters* **2008**, *10*, 4089–92.
- (54) Saleh, N.; Koner, A. L.; Nau, W. M. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2008**, *47*, 5398–401.
- (55) Koner, A. L.; Ghosh, I.; Saleh, N.; Nau, W. M. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, *89*, 139–147.
- (56) Shaikh, M.; Dutta Choudhury, S.; Mohanty, J.; Bhasikuttan, A. C.; Nau, W. M.; Pal, H. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12362–70.
- (57) Montes-Navajas, P.; Garcia, H. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2009**, *204*, 97–101.
- (58) Wang, R.; Yuan, L.; Macartney, D. H. *Chemical Communications* **2005**, 5867–9.
- (59) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 7941–80.
- (60) Franke, M. E.; Koplin, T. J.; Simon, U. *Small* **2006**, *2*, 36–50.
- (61) Ahirwal, G. K.; Mitra, C. K. *Sensors* **2009**, *9*, 881–94.
- (62) Zhang, X.; Guo, Q.; Cui, D. *Sensors* **2009**, *9*, 1033–53.
- (63) Wilson, R. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2028–45.
- (64) Corma, A.; Garcia, H. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2096–126.
- (65) Della Pina, C.; Falletta, E.; Prati, L.; Rossi, M. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2077–95.
- (66) Schmid, G.; Simon, U. *Chemical Communications* **2005**, 697–710.

- (67) Schmid, G.; Reuter, T.; Simon, U.; Noyong, M.; Blech, K.; Santhanam, V.; Jäger, D.; Slomka, H.; Lüth, H.; Lepsa, M. I. *Colloid and Polymer Science* **2008**, *286*, 1029–1037.
- (68) Homberger, M.; Simon, U. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **2010**, *368*, 1405–53.
- (69) Chen, S.; Kimura, K. *Chemistry Letters* **1999**, 233.
- (70) Watson, K.; Zhu, J.; Nguyen, S.; Mirkin, C. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 462–463.
- (71) Valden, M.; Lai, X.; Goodman, D. W. *Science* **1998**, *281*, 1647–1650.
- (72) Silva, N.; Moris, S.; Herrera, B.; Diaz, M.; Kogan, M.; Barrientos, L.; Yutronic, N.; Jara, P. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2010**, *521*, 246–252.
- (73) Drexhage, K. H. In *Progress in Optics*; Wolf, E., Ed.; Elsevier: North Holland: Amsterdam, 1974; Vol. Volume 12, pp. 163–232.
- (74) Chance, R.; Prock, A.; Silbey, R. *Advances in Chemical Physics* **2007**, *37*, 1.
- (75) Aravind, P. K.; Metiu, H. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *74*, 301–305.
- (76) Weitz, D. a; Garoff, S.; Hanson, C. D.; Gramila, T. J.; Gersten, J. I. *Optics letters* **1982**, *7*, 89–91.
- (77) Weitz, D. A.; Garoff, S.; Gersten, J. I.; Nitzan, A. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, *78*, 5324.
- (78) Leitner, A.; Lippitsch, M. E.; Draxler, S.; Riegler, M.; Aussenegg, F. R. *Applied Physics B Photophysics and Laser Chemistry* **1985**, *36*, 105–109.
- (79) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26*, 2–5.

- (80) Albrecht, M.; Creighton, J. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 5215–5217.
- (81) Jeanmaire, D.; Duynes, R. Van *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1977**, *84*, 1.
- (82) Geddes, C.; Lakowicz, J. R. *Journal of Fluorescence* **2002**, *12*, 121.
- (83) Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D.; Gryczynski, I.; Malicka, J.; Gryczynski, Z.; Aslan, K.; Lukomska, J.; Matveeva, E.; Zhang, J.; Badugu, R.; Huang, J. *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 425–41.
- (84) Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S. *Nano Letters* **2007**, *7*, 690–6.
- (85) Tam, F.; Goodrich, G. P.; Johnson, B. R.; Halas, N. J. *Nano Letters* **2007**, *7*, 496–501.
- (86) Muskens, O. L.; Giannini, V.; Sanchez-Gil, J. a; Gómez Rivas, J. *Nano Letters* **2007**, *7*, 2871–5.
- (87) Zhang, J.; Fu, Y.; Chowdhury, M. H.; Lakowicz, J. R. *The Journal of Physical Chemistry. C, Nanomaterials and Interfaces* **2007**, *112*, 18.
- (88) Bowman, J. J.; Senior, T. B. A.; Uslenghi, P. L. E. *Electromagnetic and acoustic scattering by simple shapes*; Hemisphere: Bristol, PA, 1987.
- (89) Boyd, G.; Rasing, T.; Leite, J.; Shen, Y. *Physical Review B* **1984**, *30*, 519.
- (90) Smolyaninov, I.; Zayats, A.; Davis, C. *Physical Review B* **1997**, *56*, 9290–9293.
- (91) Anceau, C.; Brasselet, S.; Zyss, J.; Gadenne, P. *Opt. Lett.* **2003**, *28*, 713–715.
- (92) Stockman, M. I.; Bergman, D. J.; Anceau, C.; Brasselet, S.; Zyss, J. *Physical Review Letters* **2004**, *92*, 057402.
- (93) Moskovits, M. *Reviews of Modern Physics* **1985**, *57*, 783.

- (94) Brouers, F.; Blacher, S.; Lagarkov, a. N.; Sarychev, A. K.; Gadenne, P.; Shalaev, V. M. *Physical Review B* **1997**, *55*, 13234–13245.
- (95) Stockman, M. In *Meeting of the American Physical Society*; Los Angeles, CA, USA, 2005.
- (96) Carminati, R.; Greffet, J.-J.; Henkel, C.; Vigoureux, J. M. *Optics Communications* **2006**, *261*, 368–375.
- (97) Larkin, I.; Stockman, M.; Achermann, M.; Klimov, V. *Physical Review B* **2004**, *69*, 121403.
- (98) Weitz, D.; Gramila, T.; Genack, A.; Gersten, J. *Physical Review Letters* **1980**, *45*, 355–358.
- (99) Shalaev, V.; Sarychev, A. *Physical Review B* **1998**, *57*, 13265–13288.
- (100) Lambe, J.; McCarthy, S. *Physical Review Letters* **1976**, *37*, 923–925.
- (101) Boyd, G.; Yu, Z.; Shen, Y. *Physical Review B* **1986**, *33*, 7923.
- (102) Downes, A.; Guaino, P.; Dumas, P. *Applied Physics Letters* **2002**, *80*, 380–382.
- (103) Drachev, V.; Khaliullin, E.; Kim, W.; Alzoubi, F.; Rautian, S.; Safonov, V.; Armstrong, R.; Shalaev, V. *Physical Review B* **2004**, *69*, 035318.
- (104) Bouhelier, A.; Bachelot, R.; Lerondel, G.; Kostcheev, S.; Royer, P.; Wiederrecht, G. P. *Physical Review Letters* **2005**, *95*, 267405.
- (105) Stockman, M.; Bergman, D.; Kobayashi, T. *Physical Review B* **2004**, *69*, 054202.
- (106) Bergman, D.; Stockman, M. *Laser Physics* **2004**, *14*, 409–411.
- (107) Roth, R. M.; Panoiu, N. C.; Adams, M. M.; Osgood, R. M.; Neacsu, C. C.; Raschke, M. B. *Optics express* **2006**, *14*, 2921–31.

Capítulo dos

- (1) Jansen, K.; Wego, A.; Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E.; Döpp, D. *Des. Monomers Polym.* **2003**, *6*, 43.
- (2) a) Singh, A.; Yip, W.-T.; Halterman, R. L. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4046, b) Day, A.; Arnold, A. P.; Blanch, R.; Snushall, B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8094 – 8100, c) Halterman, R.; Moore, J. L.; Mannel, L. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3266-3269
- (3) a) Niedermeyer, T. H. J. and Strohm, M. *PLoS ONE*, **2012**, *7(9)*, e44913, b) Strohm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. *Anal. Chem.* **2010**, *82(11)*, 4648 - 4651, c) Strohm, M.; Hassman, M.; Košata, B.; Kodíček, M. *Rapid Commun. Mass Spec.* **2008**, *22(6)*, 905 - 908
- (4) <http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/metabolomics/ms-adduct-calculator>
- (5) Ma, D.; Hettiarachchi, G.; Nguyen, D.; Zhang, B.; Wittenberg, J. B.; Zavalij, P. Y.; Briken, V.; Isaacs, L. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 503.
- (6) Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305 - 1323.
- (7) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 455-461
- (8) Leopold, N.; Lendl, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5723.

- (9) Agradecemos al proyecto FONDEQUIP N°140142

Capítulo cuatro

- (1) Ganapati, S.; Grabitz, S.; Murkli, S.; Scheffenbichler, F.; Rudolph, M.; Zavalij, P. Y.; Eikermann, M.; Isaacs, L. *ChemBioChem*. **2017**, *18*, 1583 - 1588
- (2) Ramamurthy, V.; Inoue, Y. *"Supramolecular Photochemistry: Controlling Photochemical Processes"* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, **2011**, 87 - 115.
- (3) Grofcsik, A.; Kubinyi, M.; Jones, W. J. *Journal of Molecular Structure* **1995**, *348*, 197 - 200
- (4) Raj, C. R.; Ramaraj, R. *Jornal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, *122*, 39 - 46
- (5) Choudhury, S.; Mohanty, J.; Upadhyaya, H.; Bhasikuttan, A.; Pal, H. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1891 - 1898
- (6) Singh, P.; Kumbhakar, M.; Pal, H.; Nath, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 8008-8014
- (7) Analytical Methods in Supramolecular Chemistry, Editor(es): Christoph Schalley
Publicado Online: 16 ENE 2007 Capítulo 7, Photophysics and Photochemistry of

Supramolecular Systems (páginas 220–264), Prof. Bernard Valeur, Prof. Mário Nuno Berberan-Santos and Dr. Monique M. Martin

- (8) Niazi, A.; Yazdanipour, A.; Ghasemi, J.; Kubista, M. *Spectrochimica Acta Part A* **2006**, *65*, 73-78
- (9) Stsiapura, V.; Maskevich, A. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 4829 – 4835

Capítulo cinco

- (1) Fritzsche, W.; Lamy de la Chapelle, M. *Molecular Plasmonics*, 1st ed.; Wiley-VCH, Germany, 2014
- (2) Geddes, C.; Lakowicz, J. *Journal of Fluorescence*, **2002**, *12(2)*, 121 - 129
- (3) Lakowicz, J. *Plasmonics*, **2006**, *1*, 5 - 33
- (4) Cao, Q.; Xiao, S.; Li, R.; Lin, Q.; Yang, C.; Zou, K.; Dan, F. *Supramolecular Chemistry*, **2014**, *26(2)*, 105 - 110
- (5) Levard, C.; Mitra, S.; Yang, T.; Jew, A.; Badireddy, A.; Lowry, G.; Brown, G. *Environmental Science & Technology*, **2013**, *47(11)*, 5738 - 5745
- (6) Suslov, A.; Lama, P. T.; Dorsinville, R. *Optics Communications* **2015**, *345*, 116 - 119

- (7) Pan, S.; Wang, Z.; Rothberg, L. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17383 - 17387
- (8) Makarava, N.; Parfenov, A.; Baskakov, I. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 572 - 580

ANEXOS

A. Espectros de resonancia magnética de protones, carbono y de masa de los compuestos sintetizados en este estudio

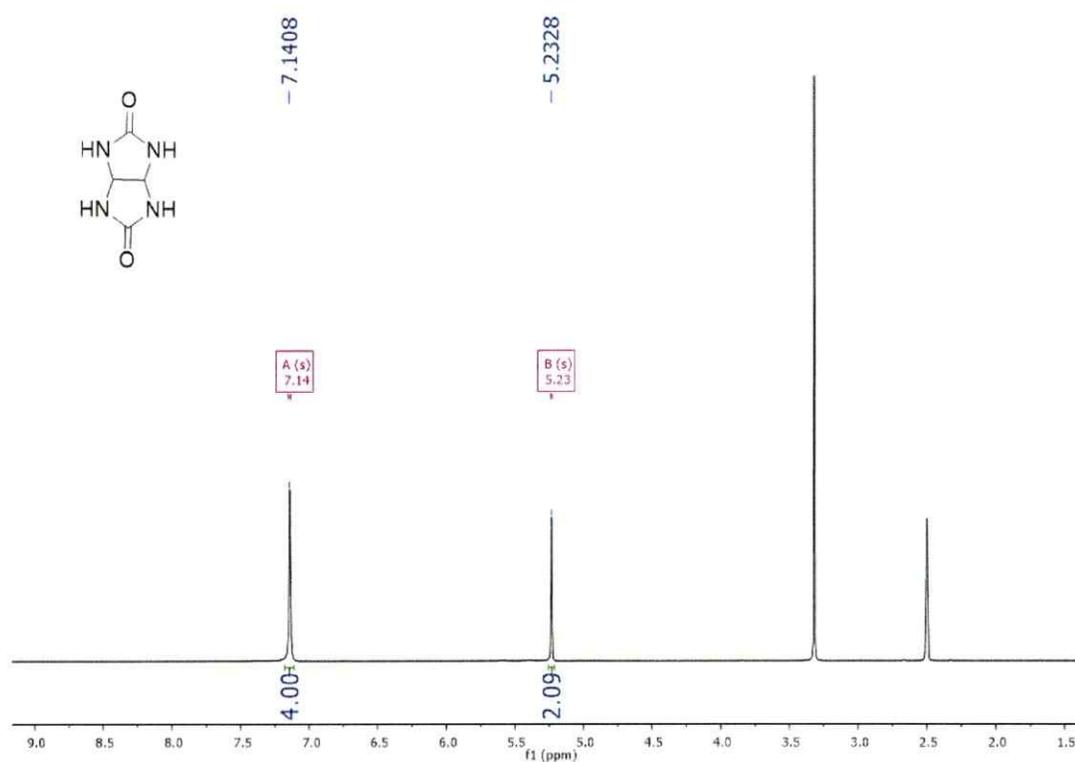


Figura A1: Espectro ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) de glicoluril

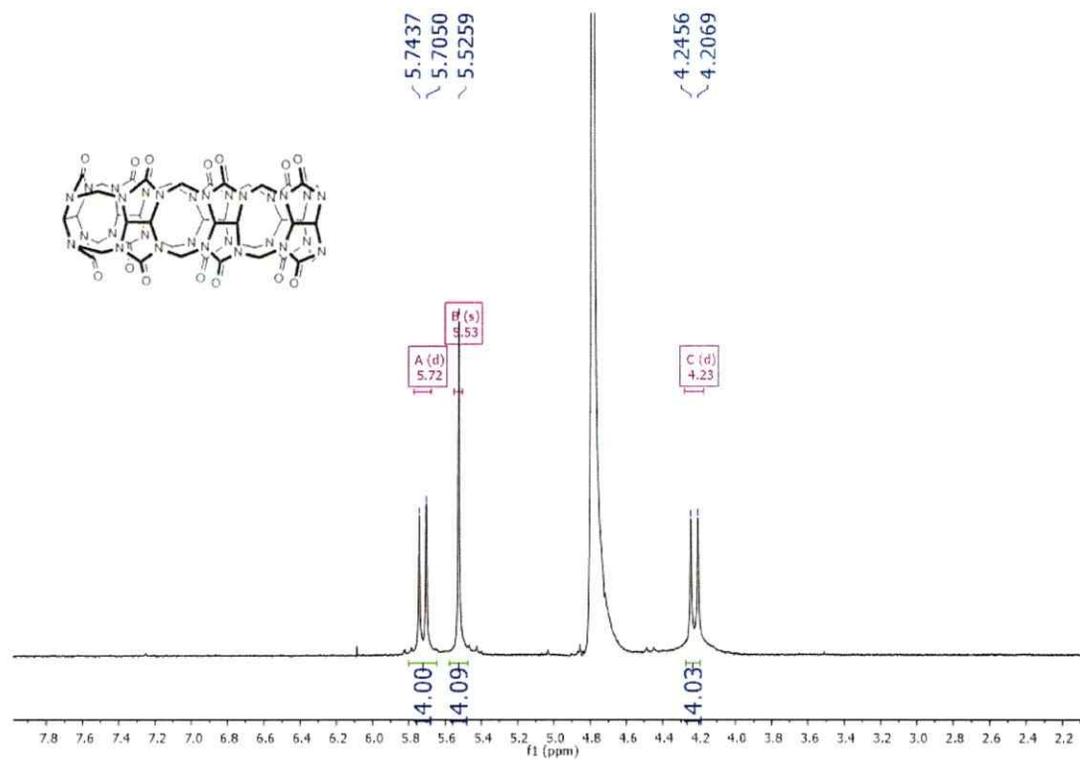


Figura A2: Espectro de ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) de CB[7]

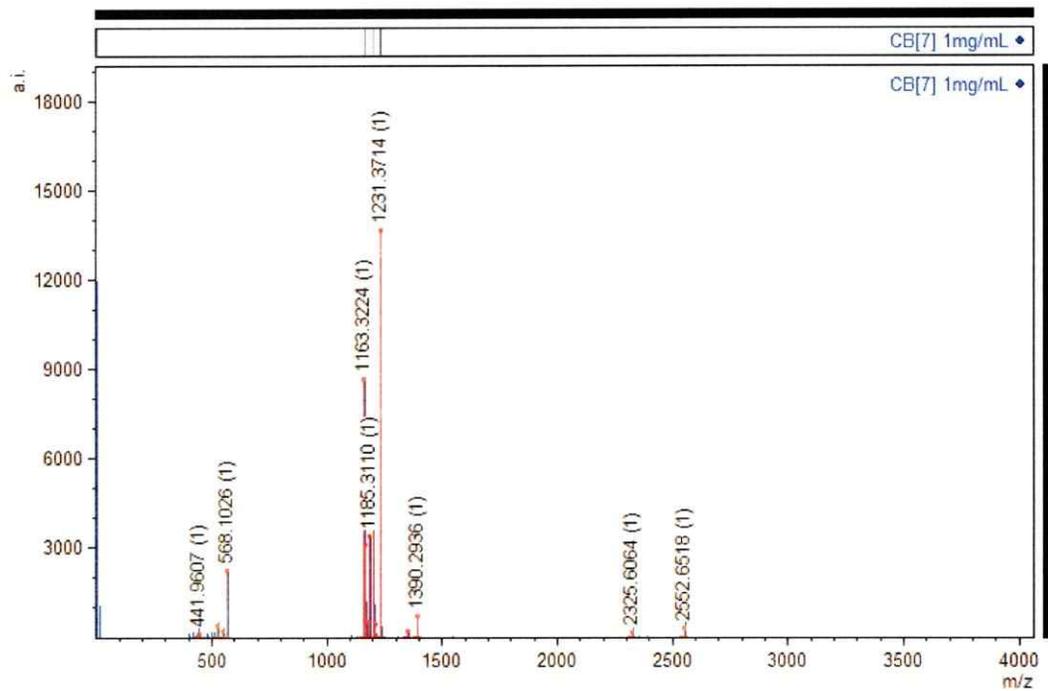


Figura A3: Espectro de masas CB[7], solución 1 mg/mL

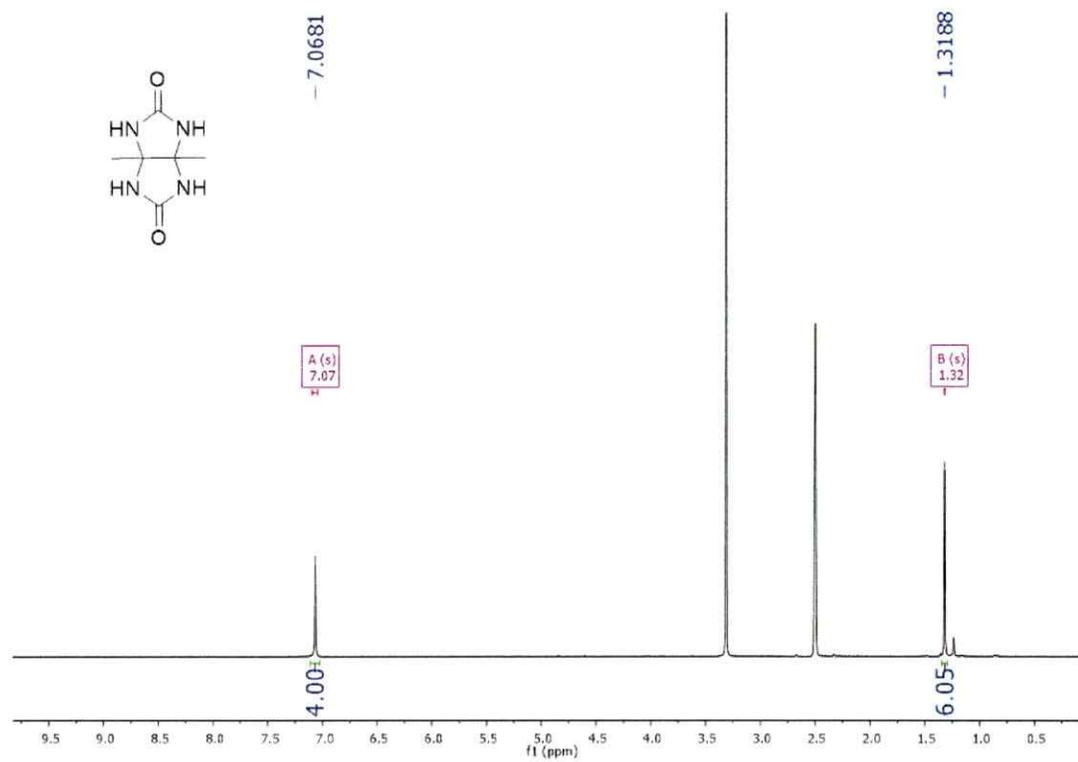


Figura A4: Espectro ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*⁶) de dimetilglicoluril

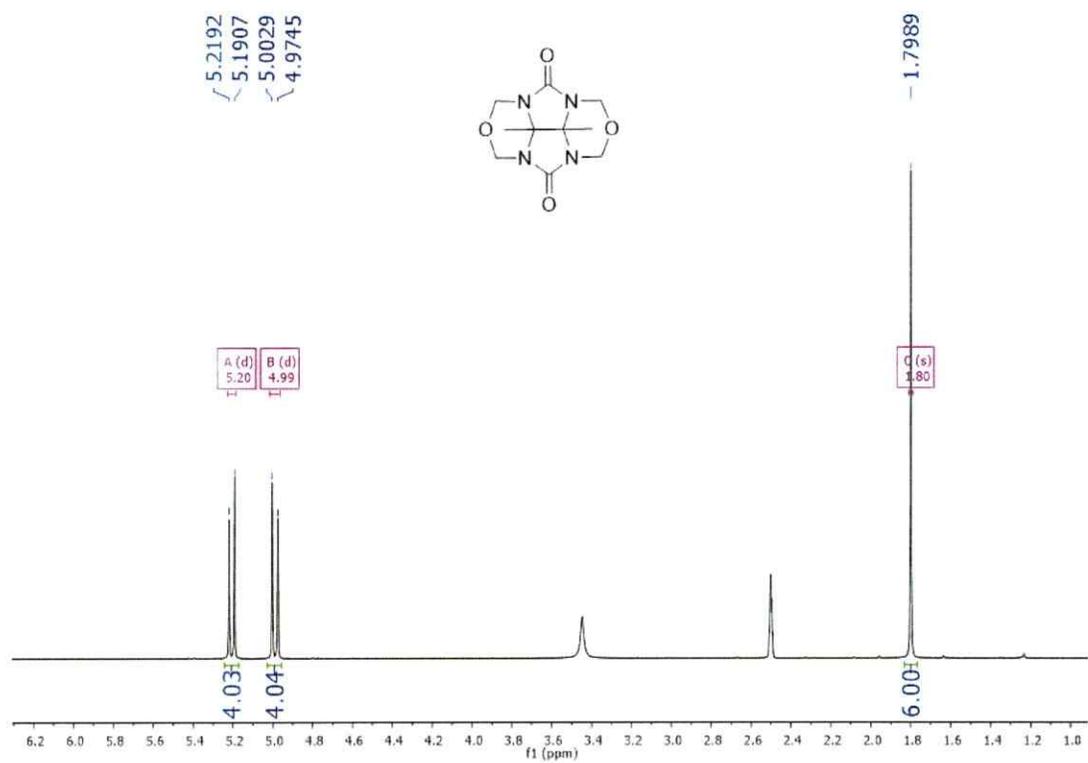


Figura A5: Espectro de 1H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*⁶) de diéter tetracíclico de dimetilglicoluril

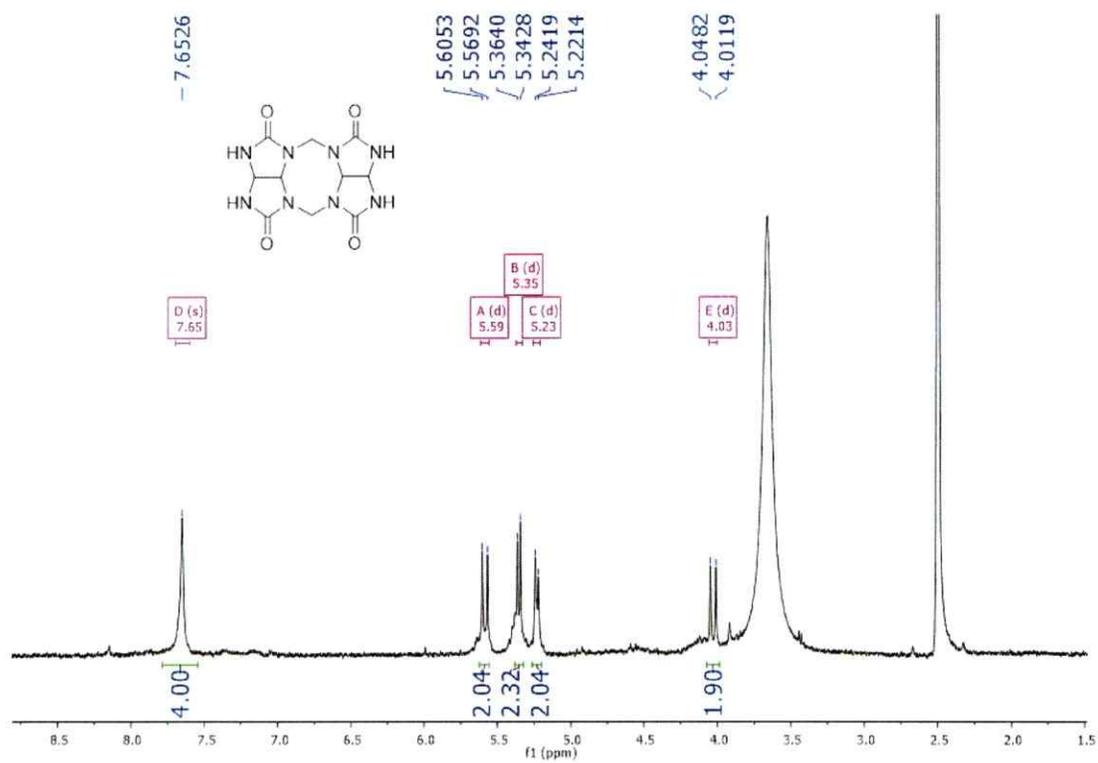


Figura A6: Espectro 1H-RMN (400 MHz, DMSO- d^6) de dímero de glicoluril

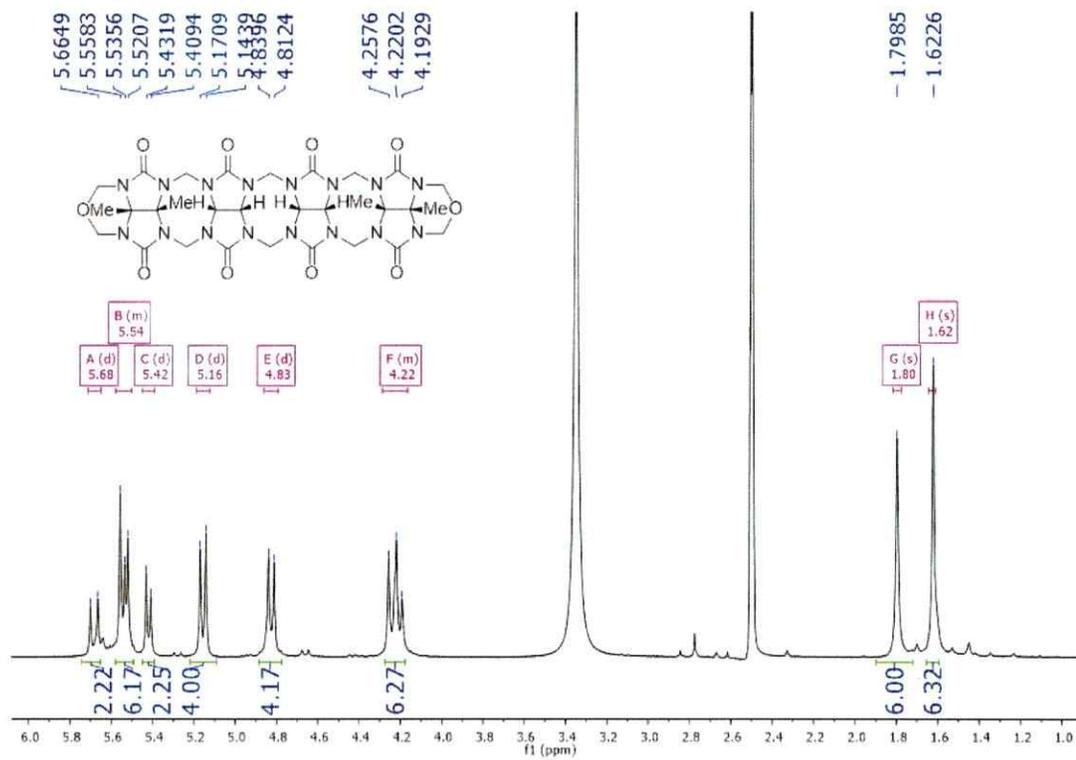


Figura A7: Espectro ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) de metil tetrámero

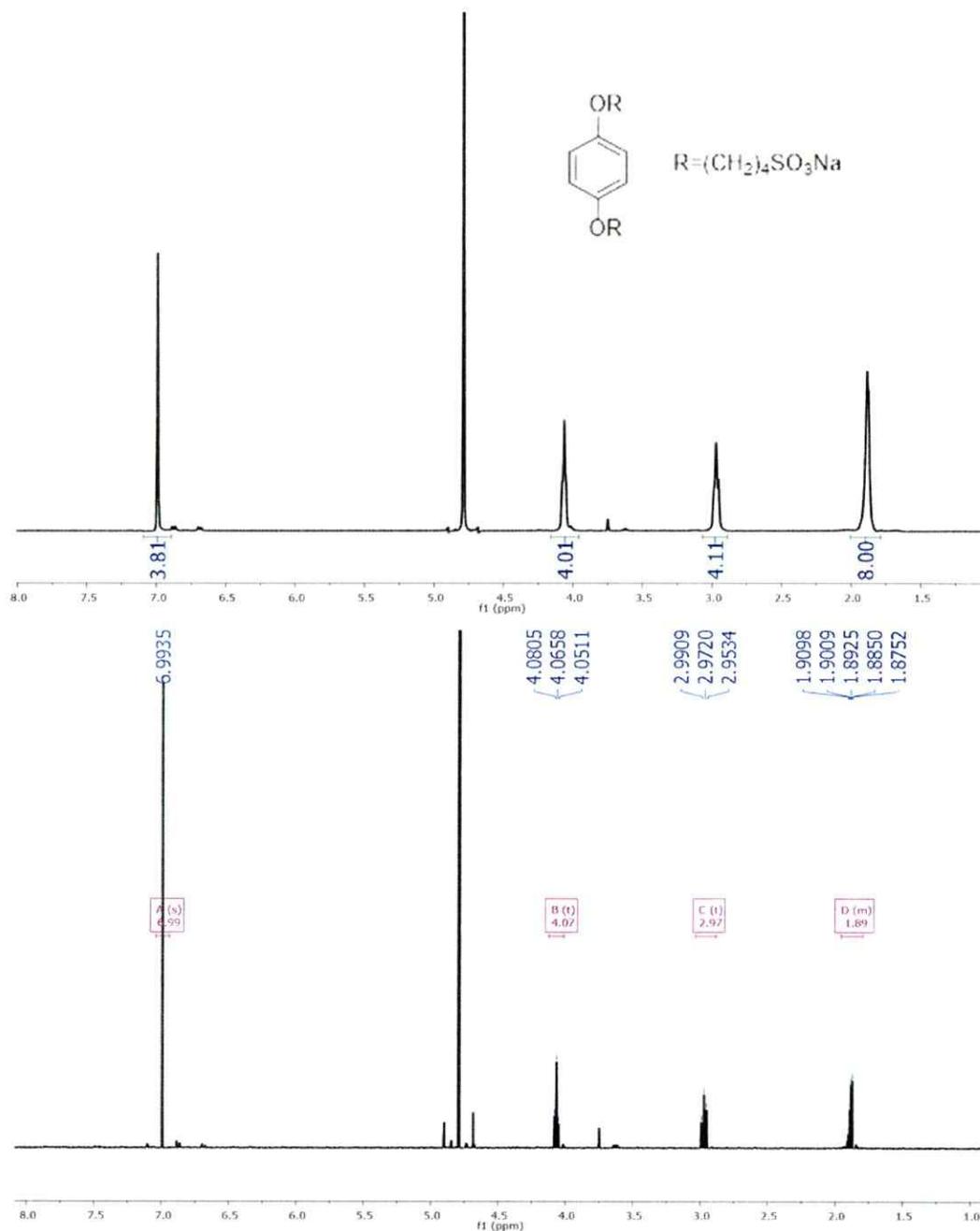


Figura A8: Espectro 1H -RMN (400 MHz, D_2O) de hidroquinona C4-wall. *Arriba:* Integración de señales; *abajo:* aumento de resolución para calcular constantes de acoplamiento

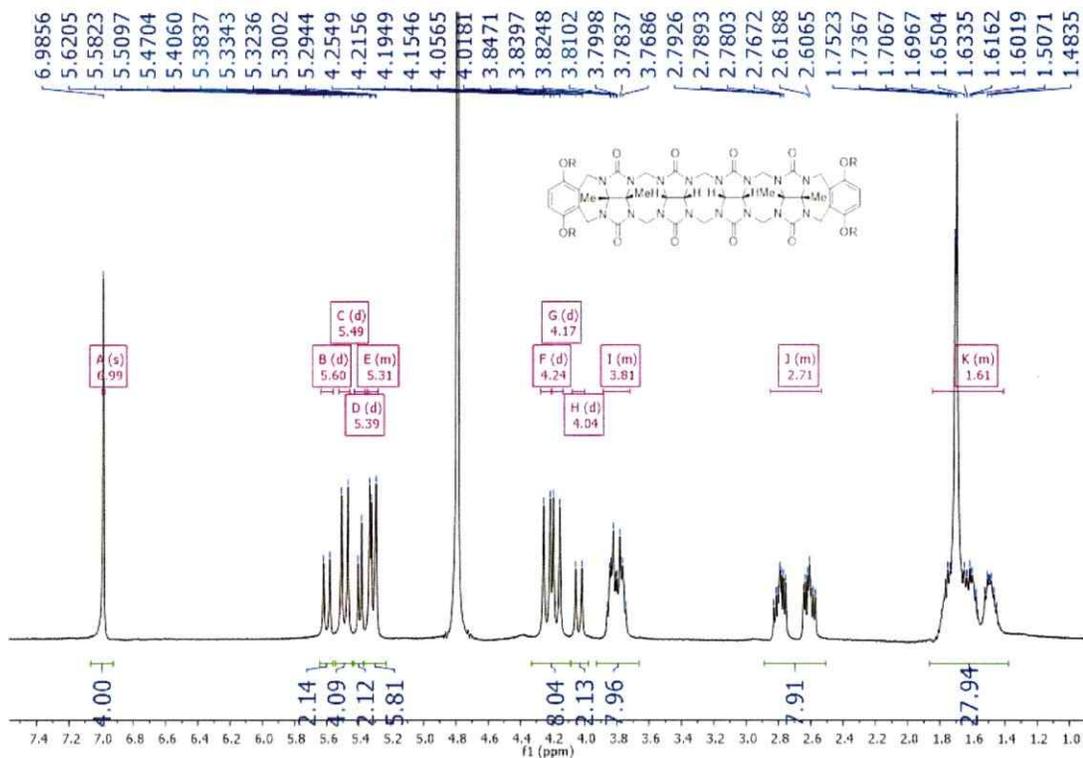


Figura A9: Espectro ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) de Motor 1

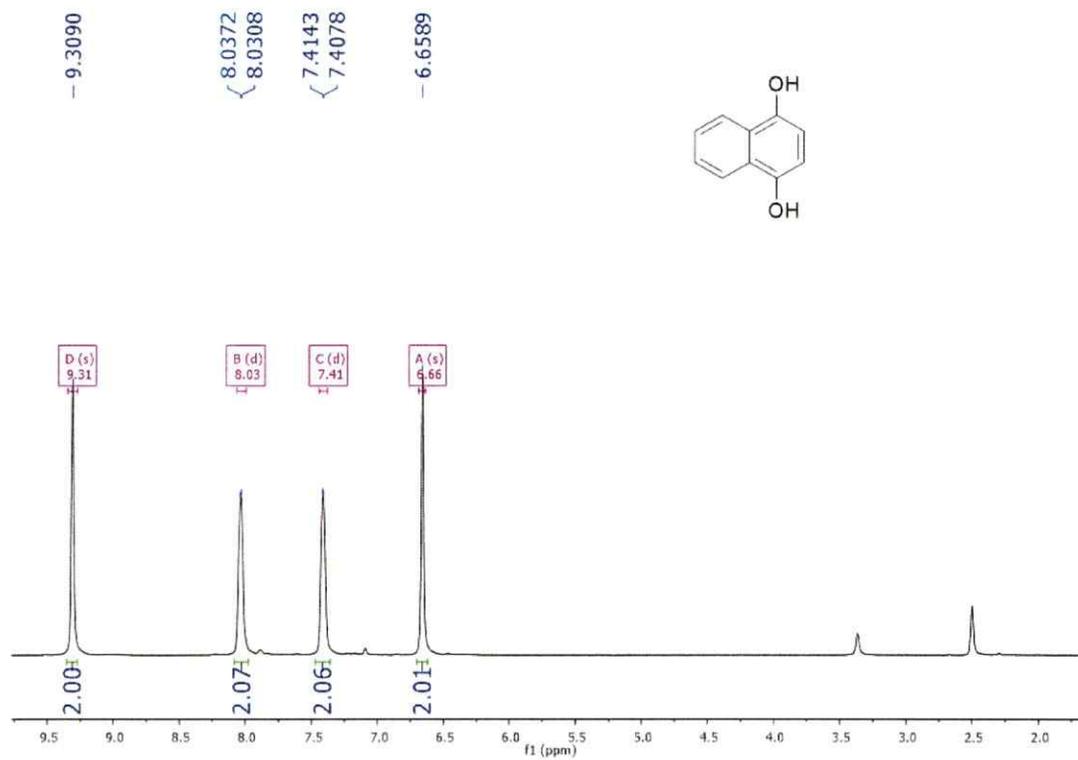


Figura A10: Espectro ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de 1,4-dihidroxi-naftaleno

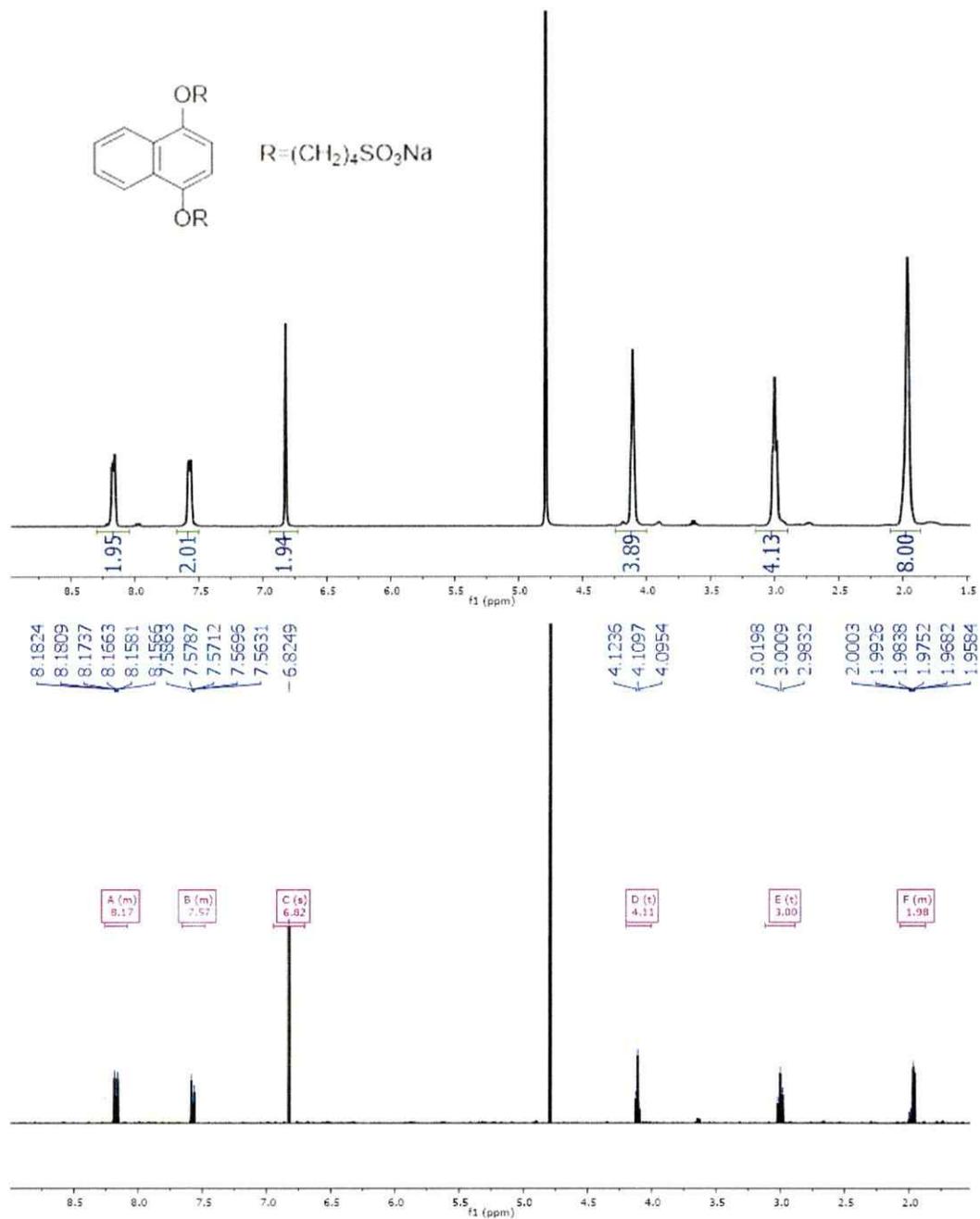


Figura A11: Espectro 1H -RMN (400 MHz, D_2O) de naftoquinona C4-wall. *Arriba:* Integración de señales; *abajo:* aumento de resolución para calcular constantes de acoplamiento

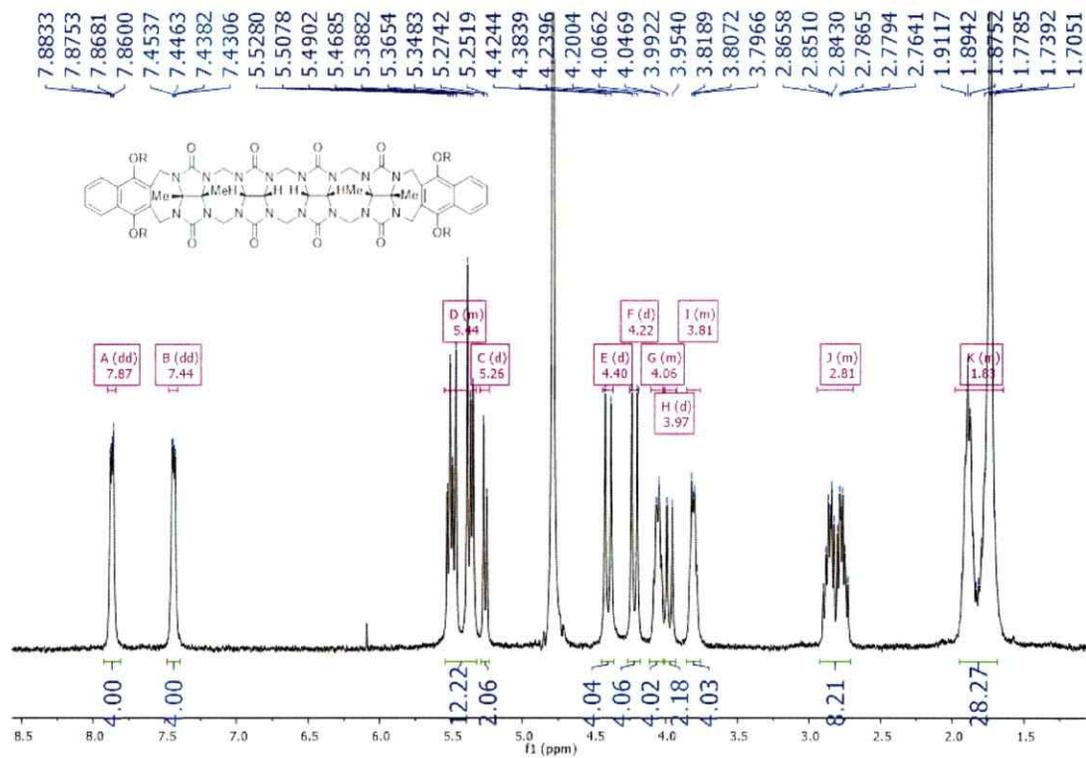


Figura A12: Espectro ¹H-RMN (400 MHz, D₂O) de Motor 2

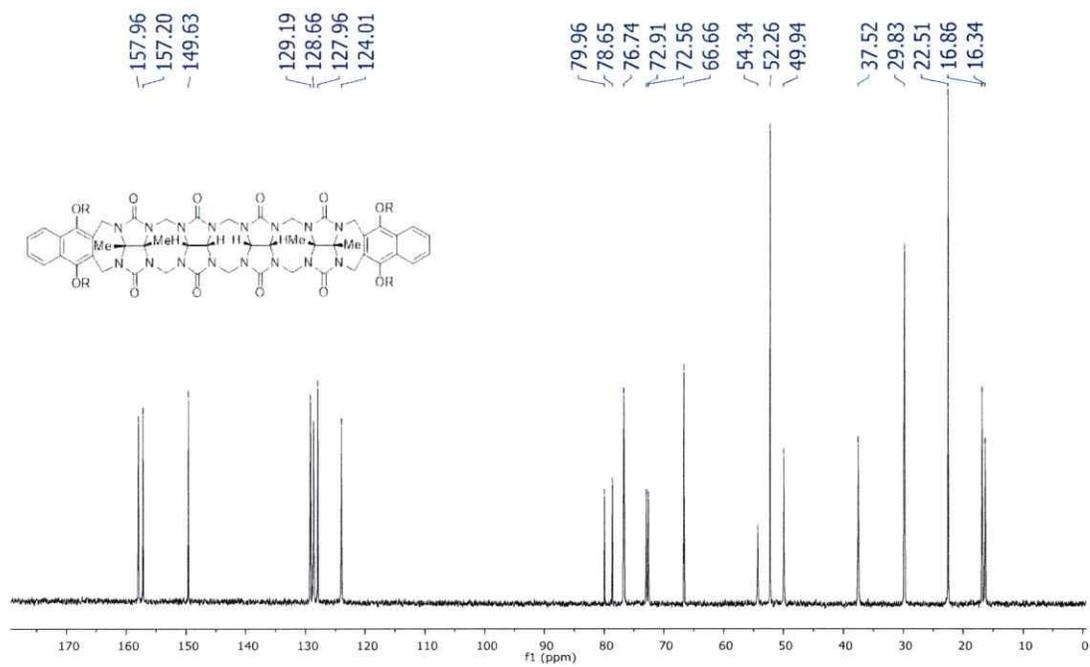


Figura A13: Espectro ¹³C-RMN (126 MHz, D₂O) de Motor 2

B. Estudio de constantes de asociación de los compuestos formados mediante espectroscopía UV-Vis y espectroscopía de fluorescencia

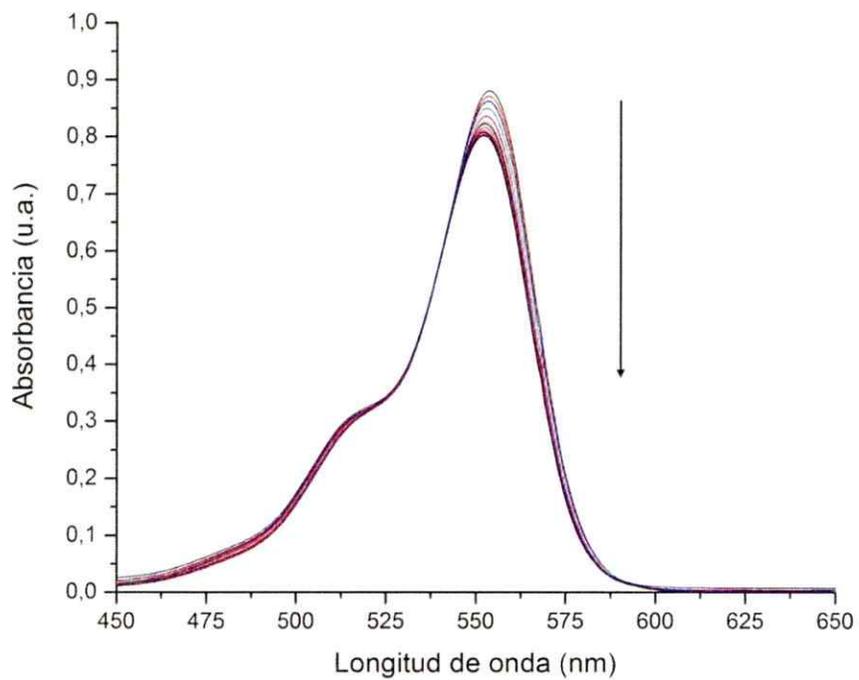


Figura B1: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con β-ciclodextrina.

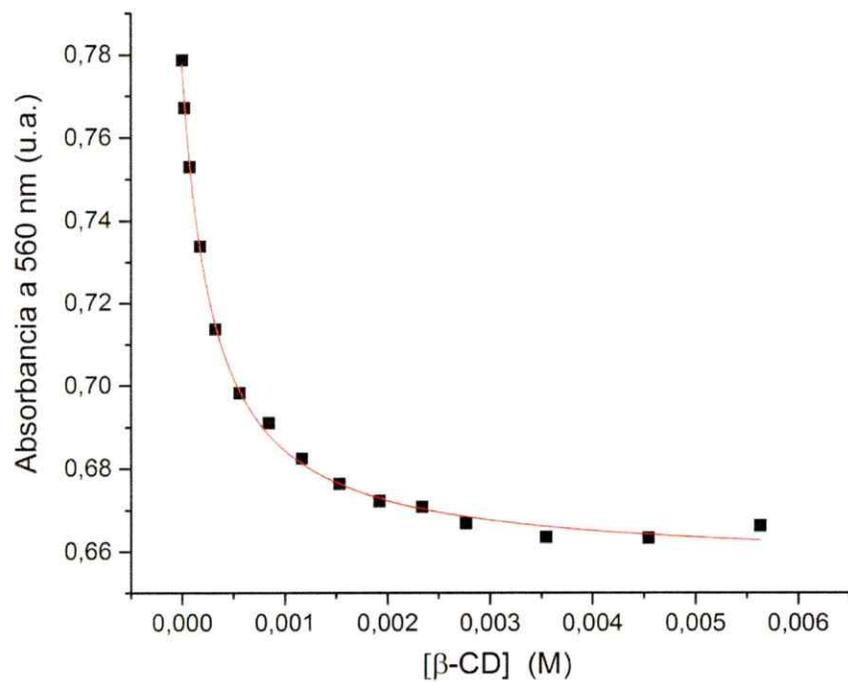


Figura B2: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con β-ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1

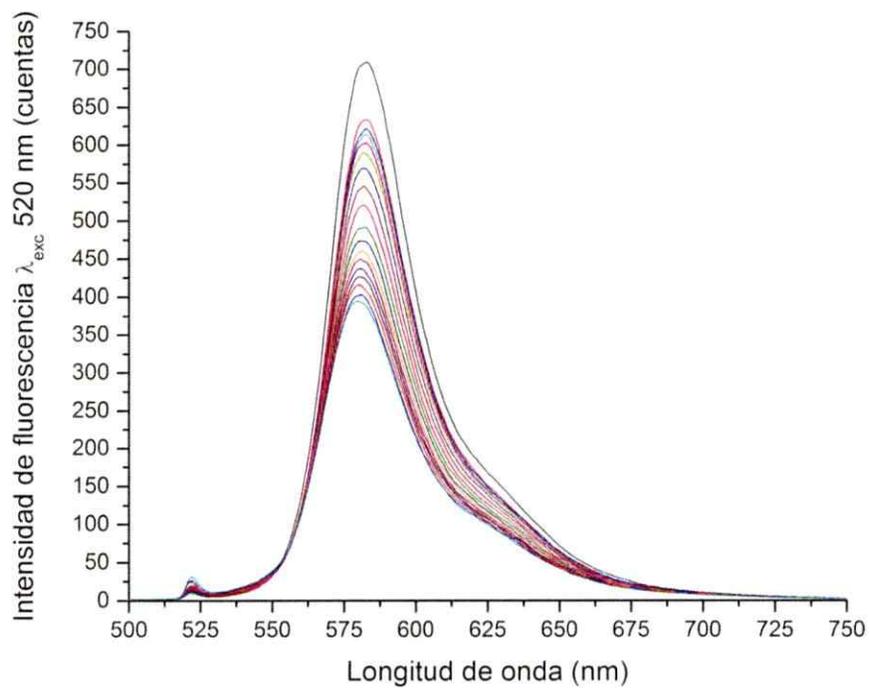


Figura B3: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con β-ciclodextrina.

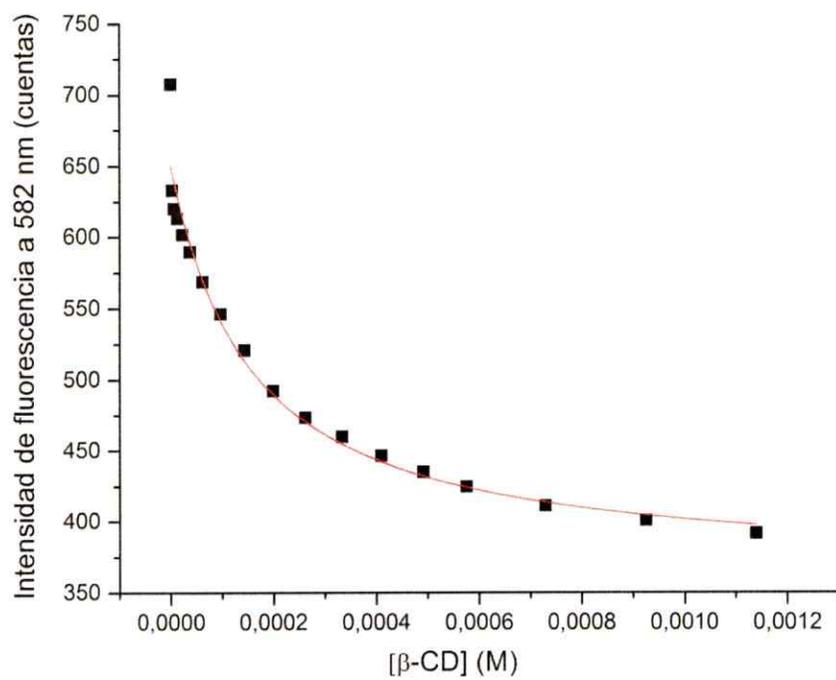


Figura B4: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1

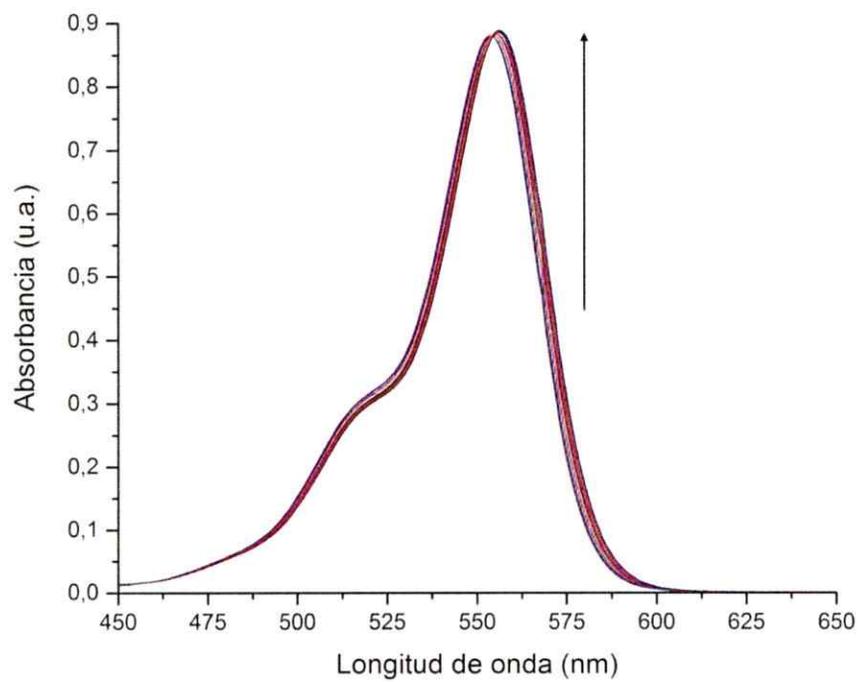


Figura B5: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con CB[7]

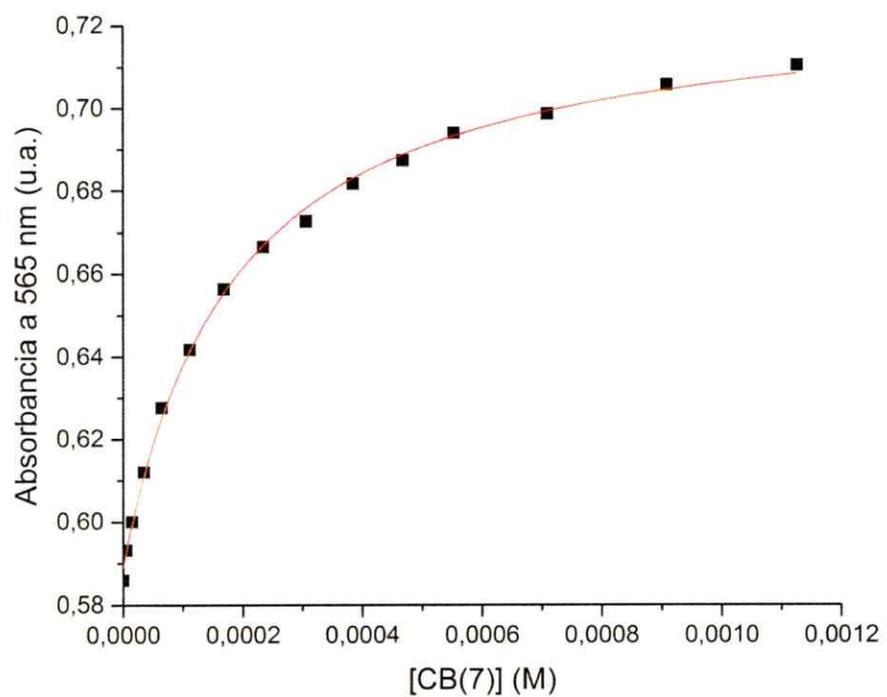


Figura B6: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con CB[7]. Modelo de asociación 1:1

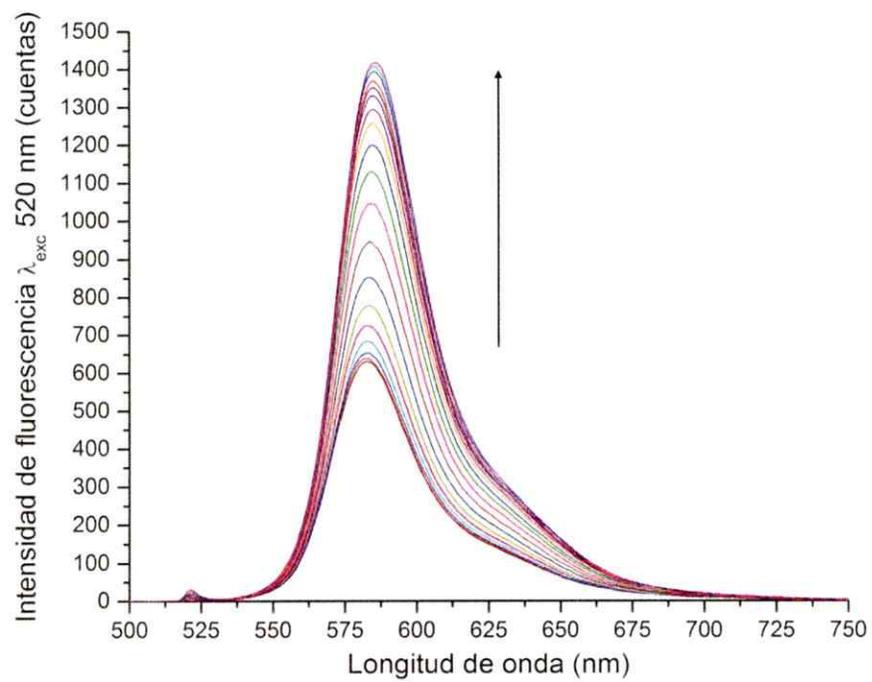


Figura B7: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con CB[7]

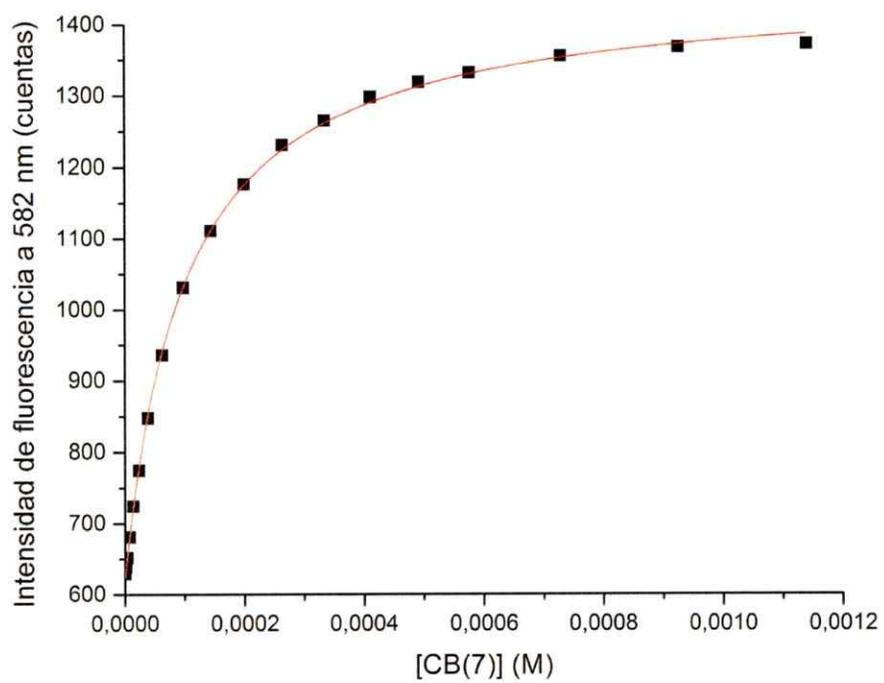


Figura B8: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con CB[7]. Modelo de asociación 1:1

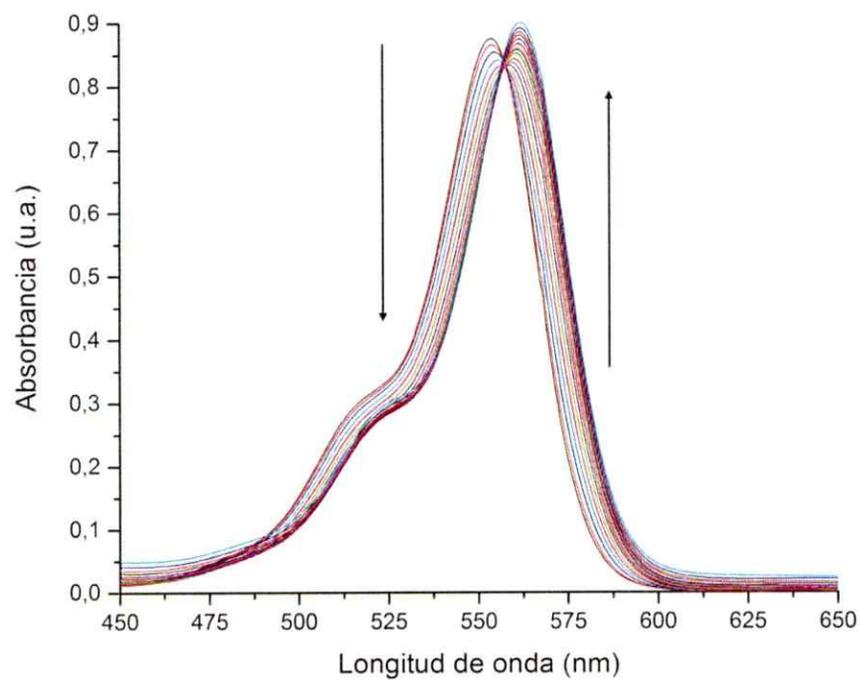


Figura B9: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con MIC4

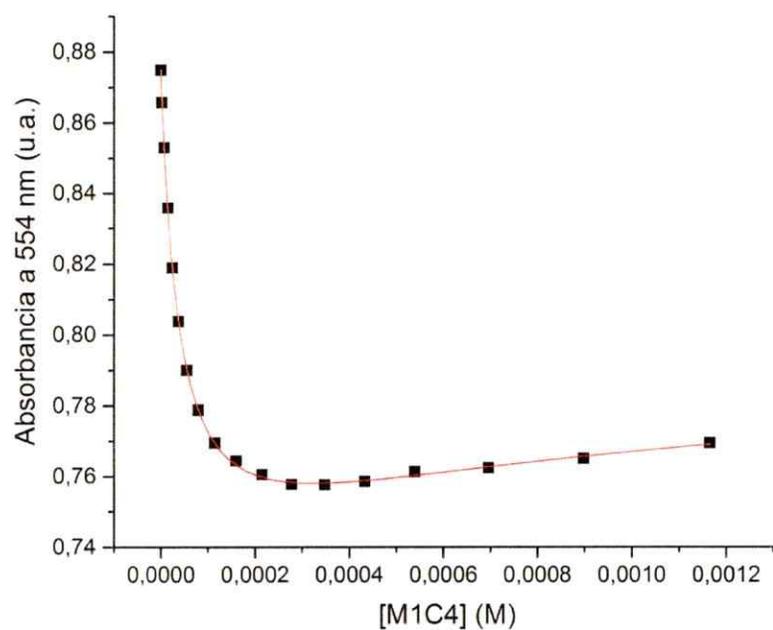
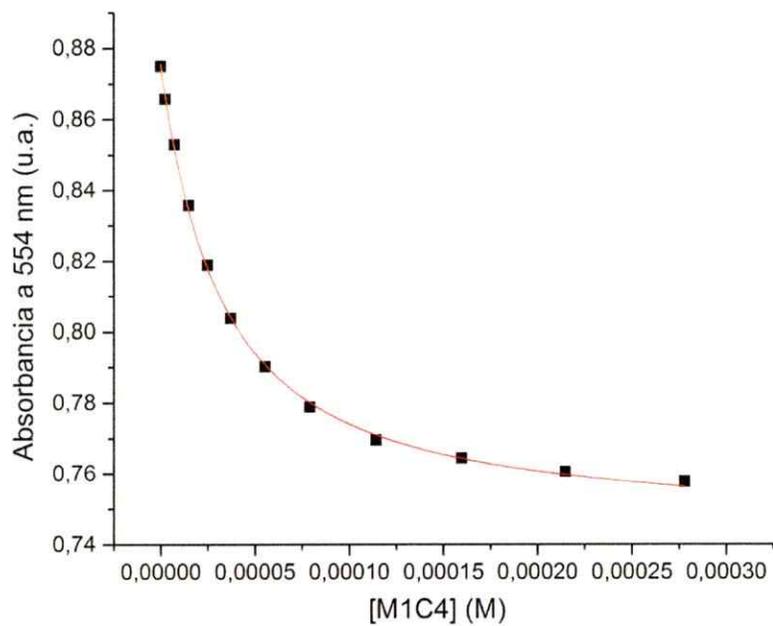


Figura B10: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con M1C4. *Superior:* Modelo de asociación 1:1. *Inferior:* Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped

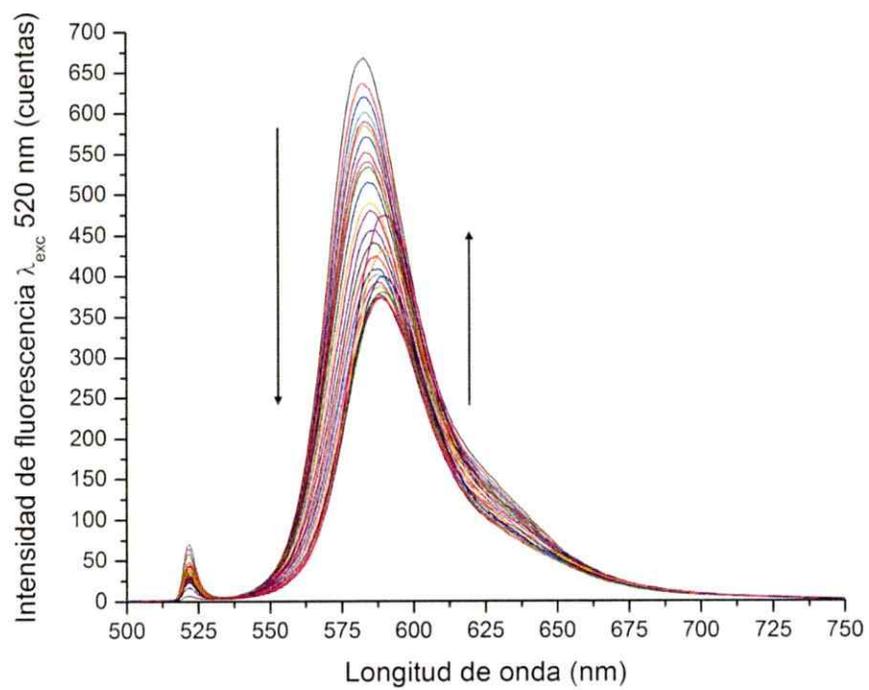


Figura B11: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con MIC4

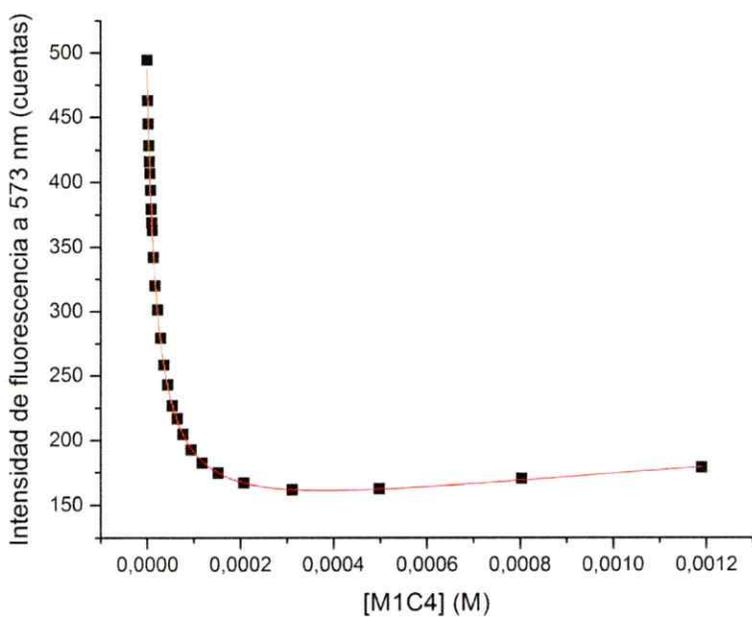
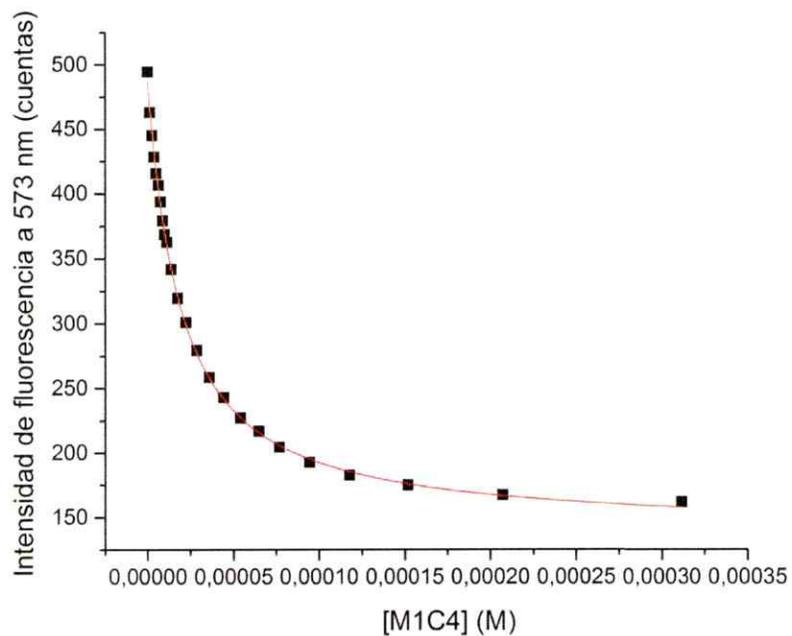


Figura B12: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con M1C4. *Superior:* Modelo de asociación 1:1. *Inferior:* Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped

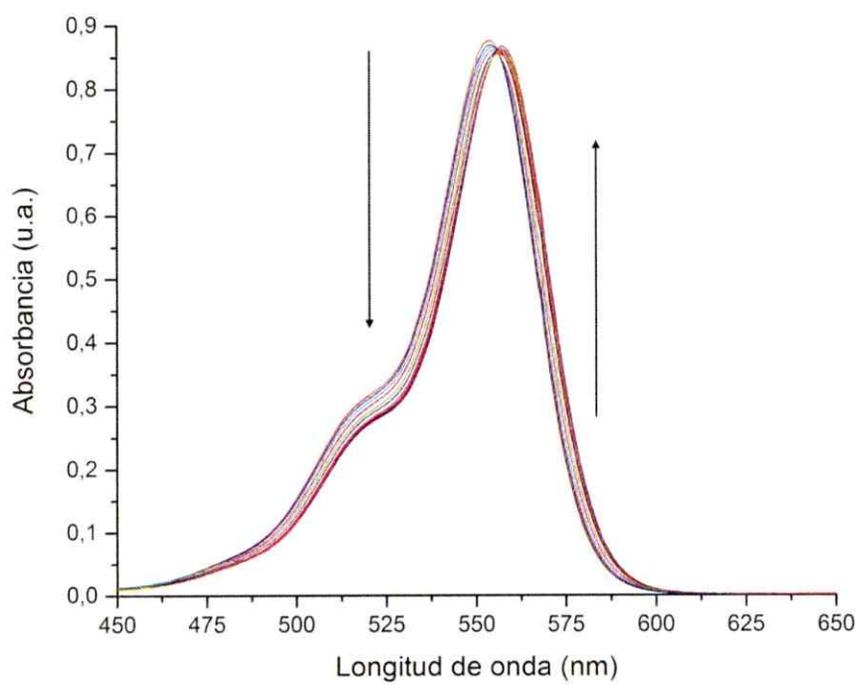


Figura B13: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B (7 μM) con M2C4

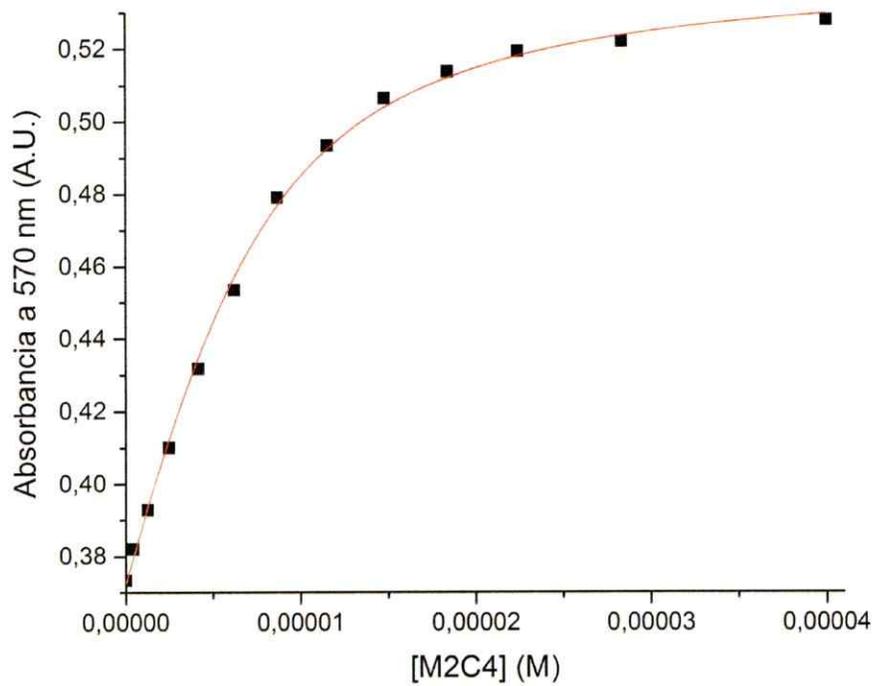


Figura B14: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de rodamina B con M2C4. Modelo de asociación 1:1

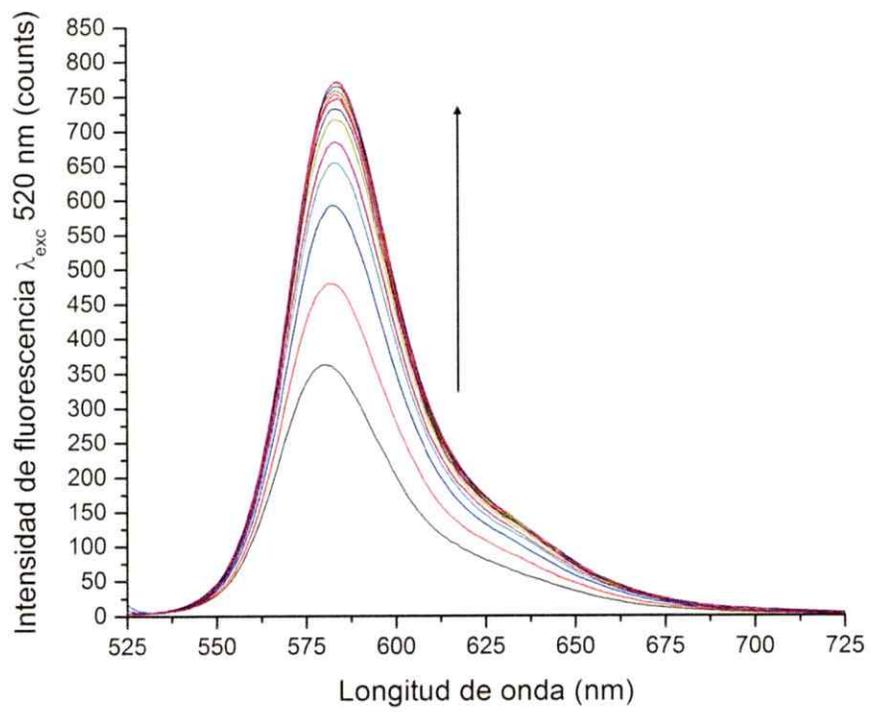


Figura B15: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B (2,5 μM) con M2C4

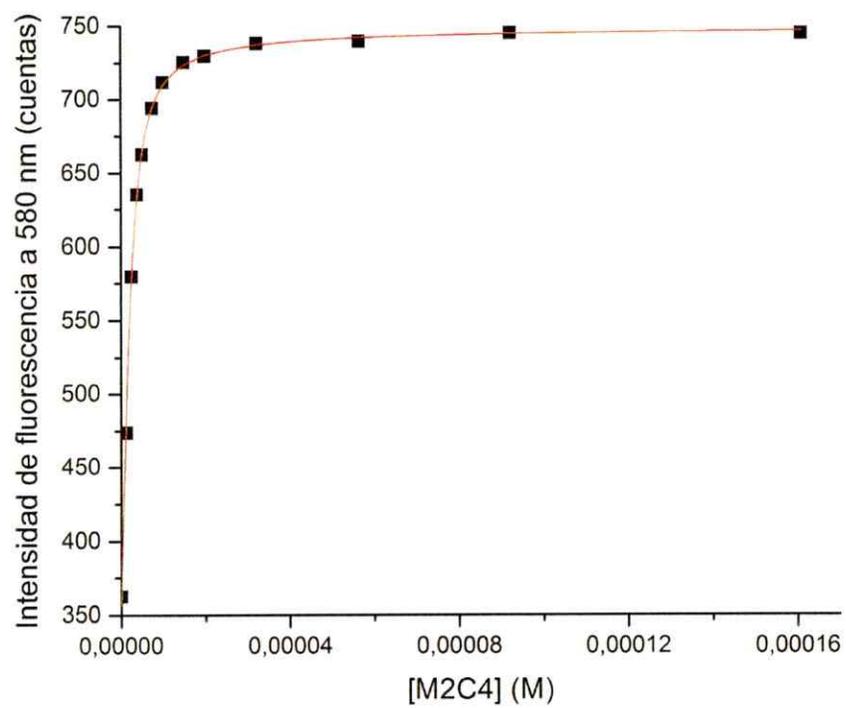


Figura B16: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de rodamina B con M2C4. Modelo de asociación 1:1

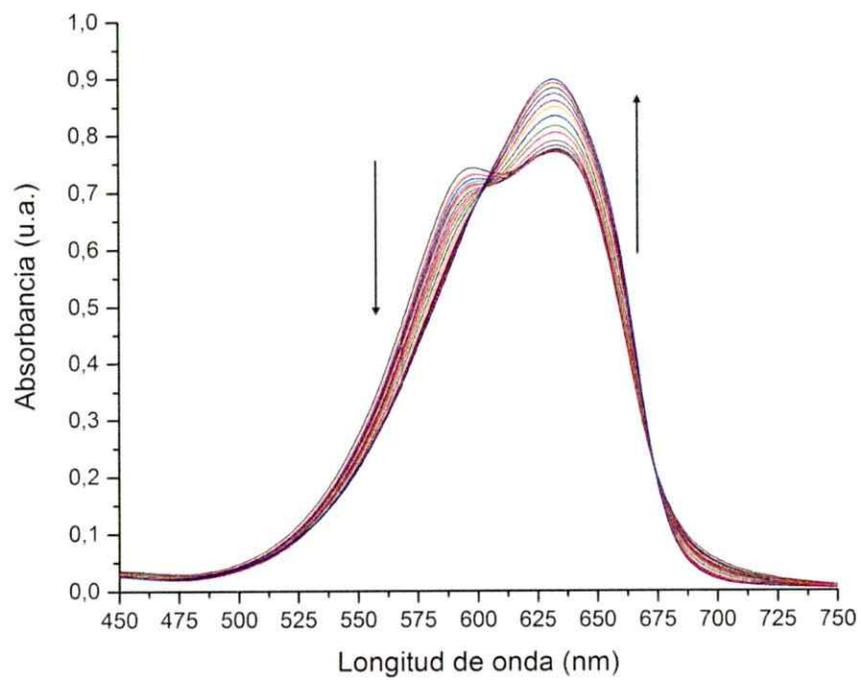


Figura B17: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con β -ciclodextrina.

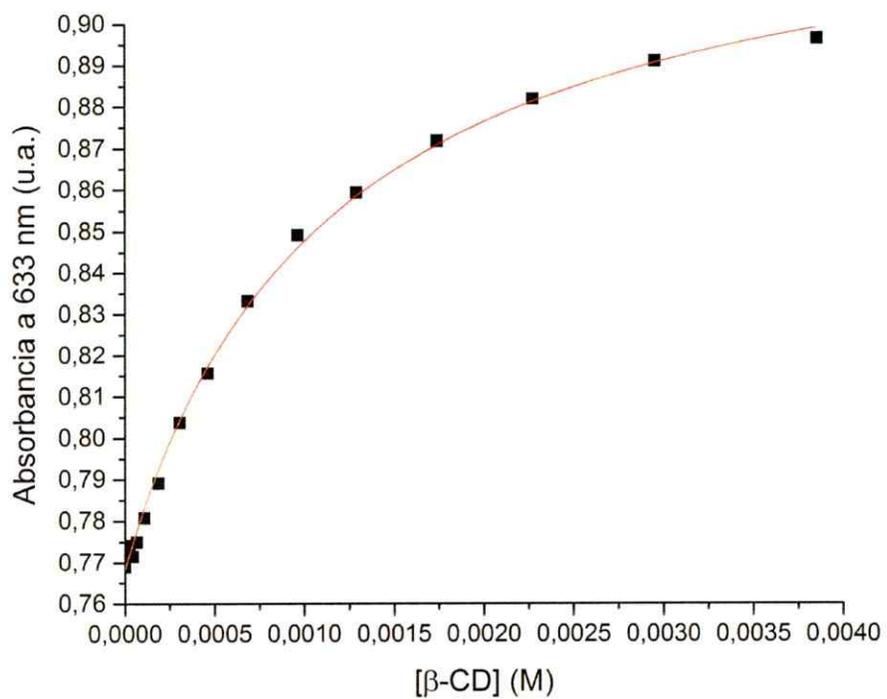


Figura B18: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1

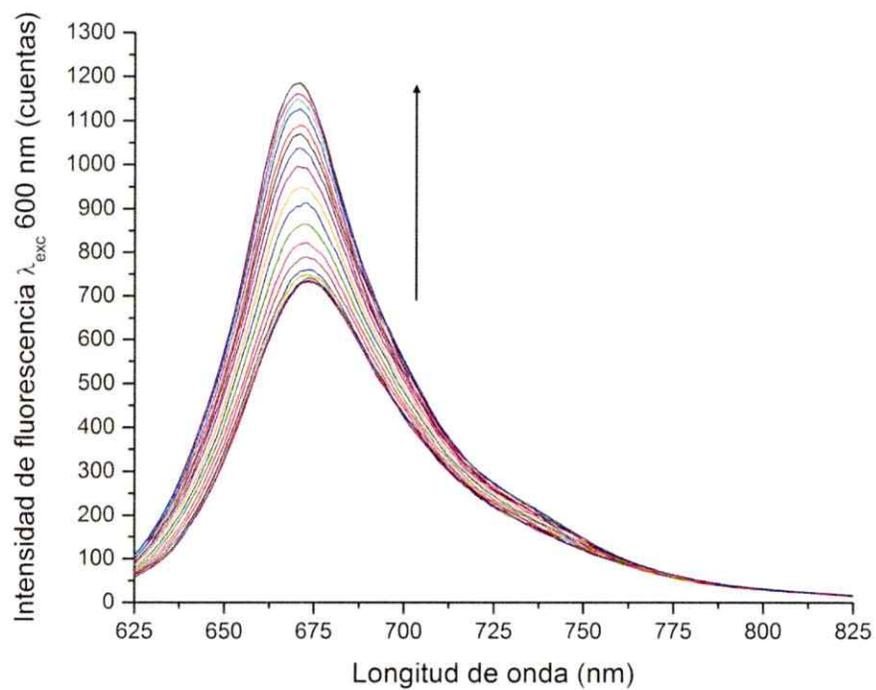


Figura B19: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con β-ciclodextrina.

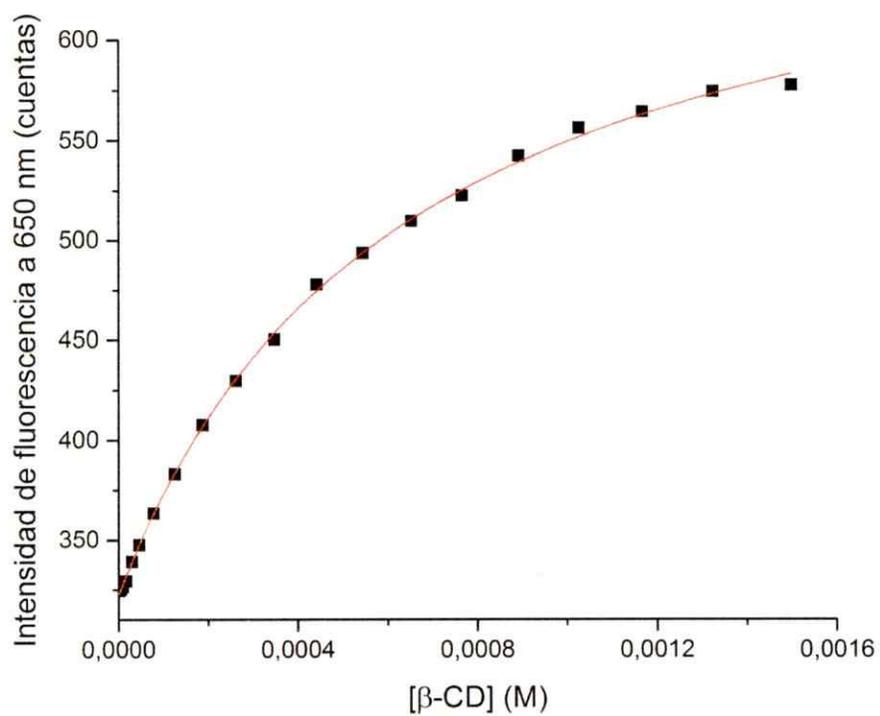


Figura B20: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1

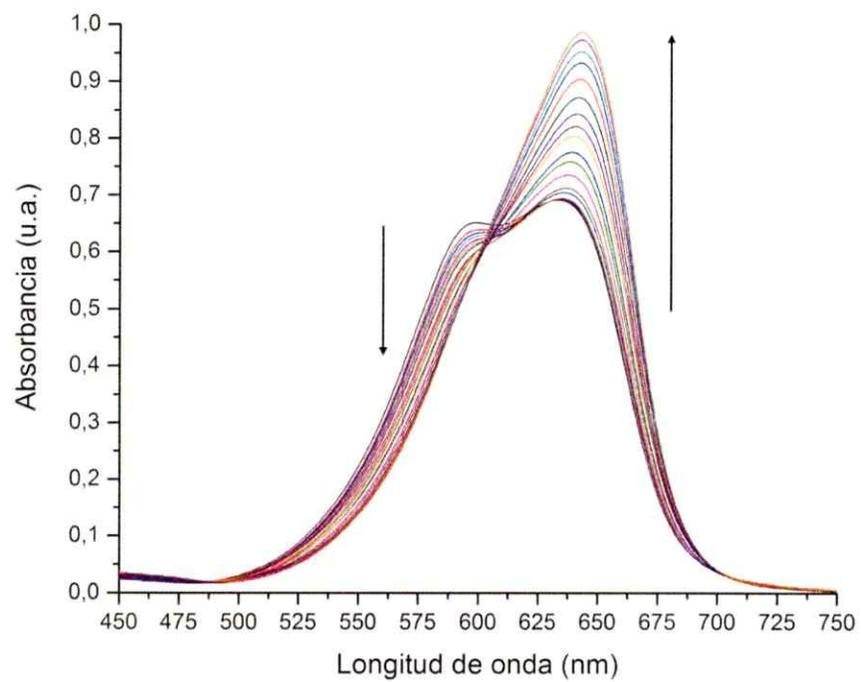


Figura B21: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con CB[7]

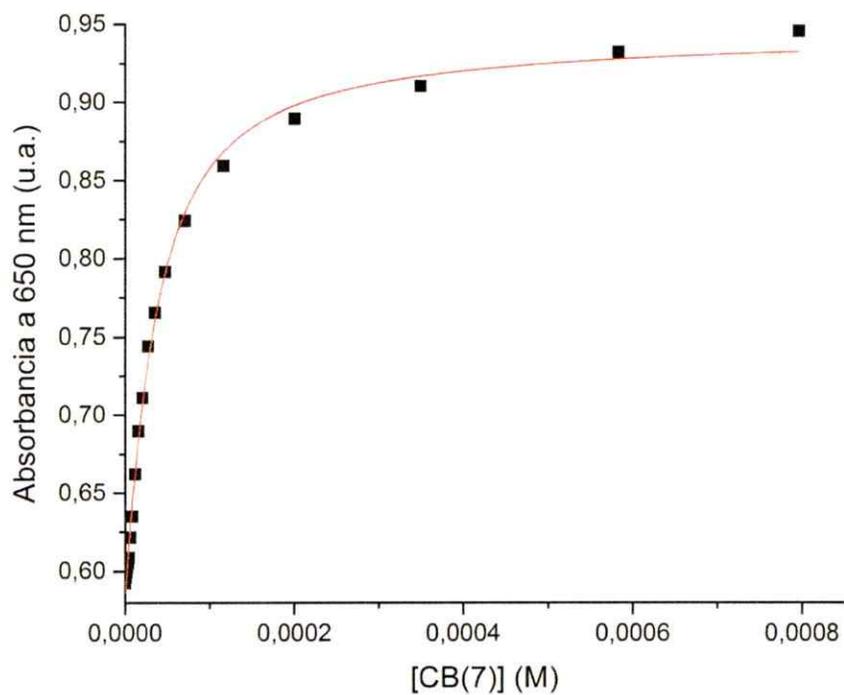


Figura B22: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con CB[7]. Modelo de asociación 1:1

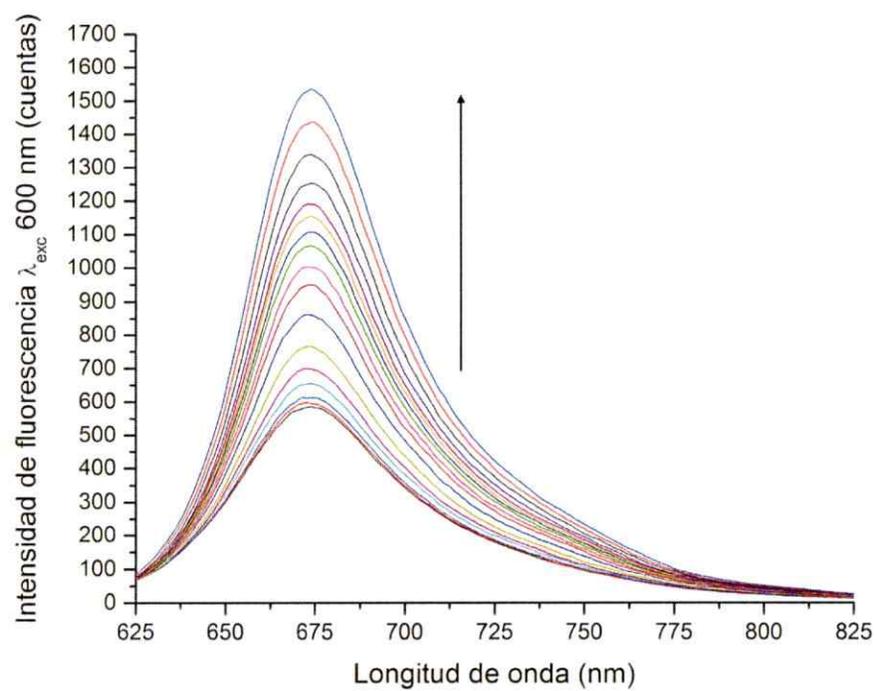


Figura B23: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con CB[7]

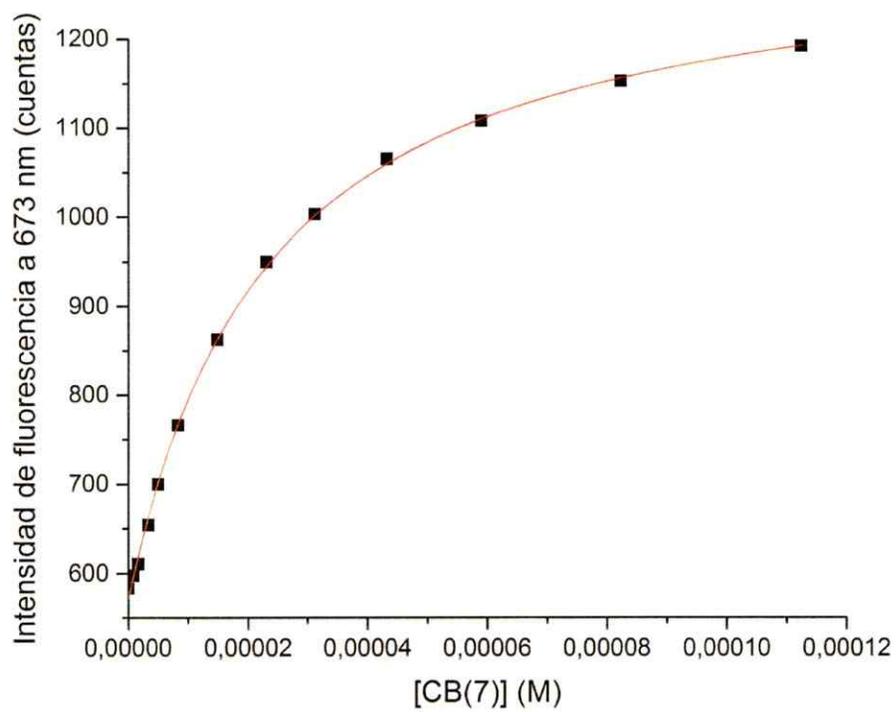


Figura B24: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con CB[7]. Modelo de asociación 1:1

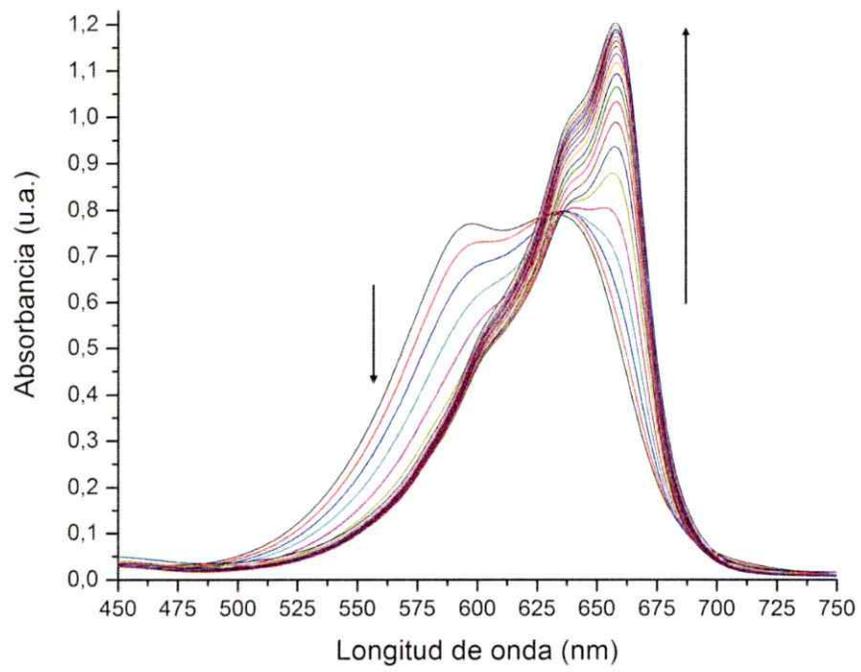


Figura B25: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con M1C4

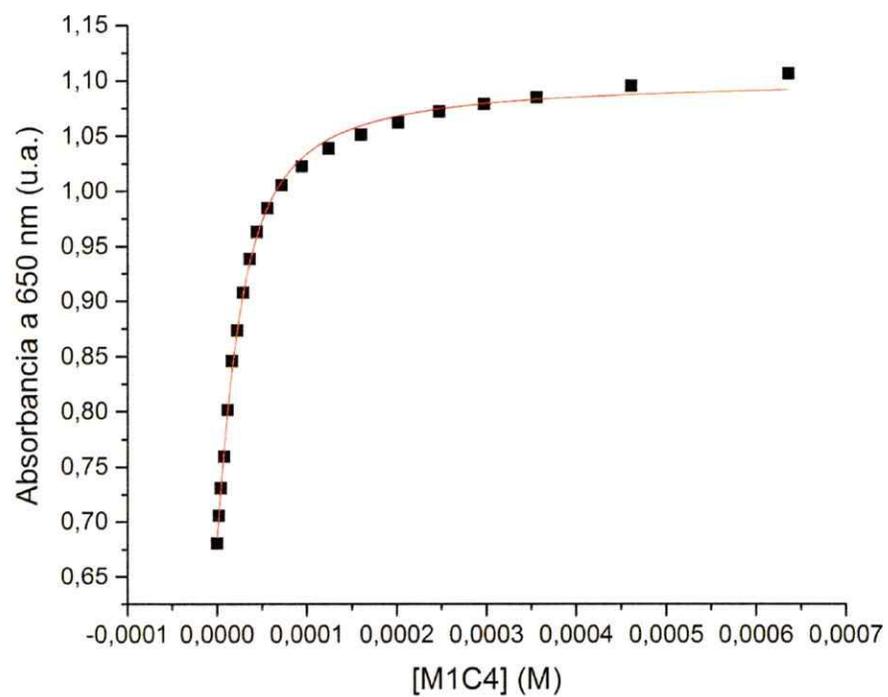


Figura B26: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo con MIC4. Modelo de asociación 1:1

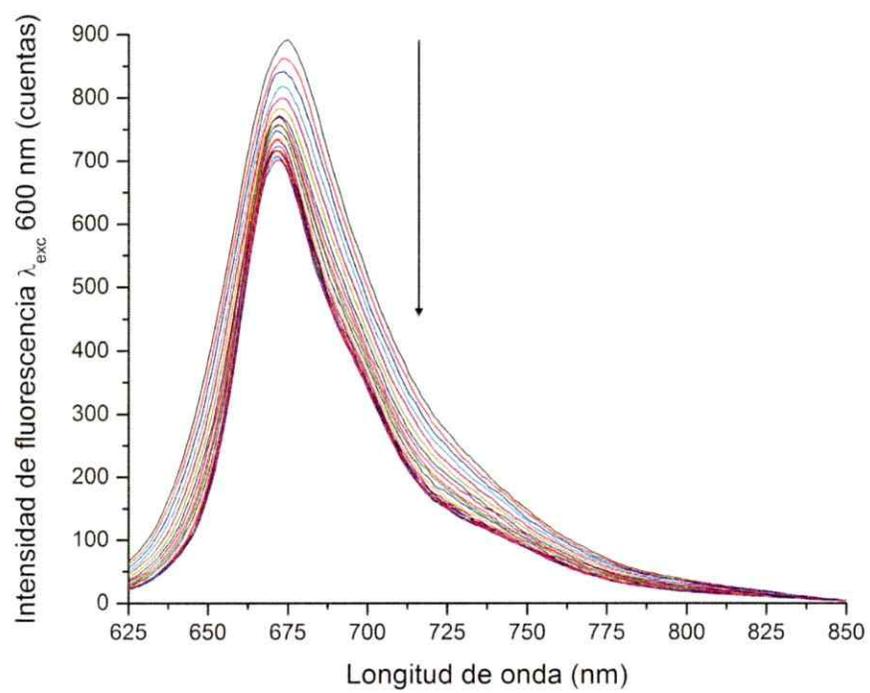


Figura B27: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (2 μM) con MIC4

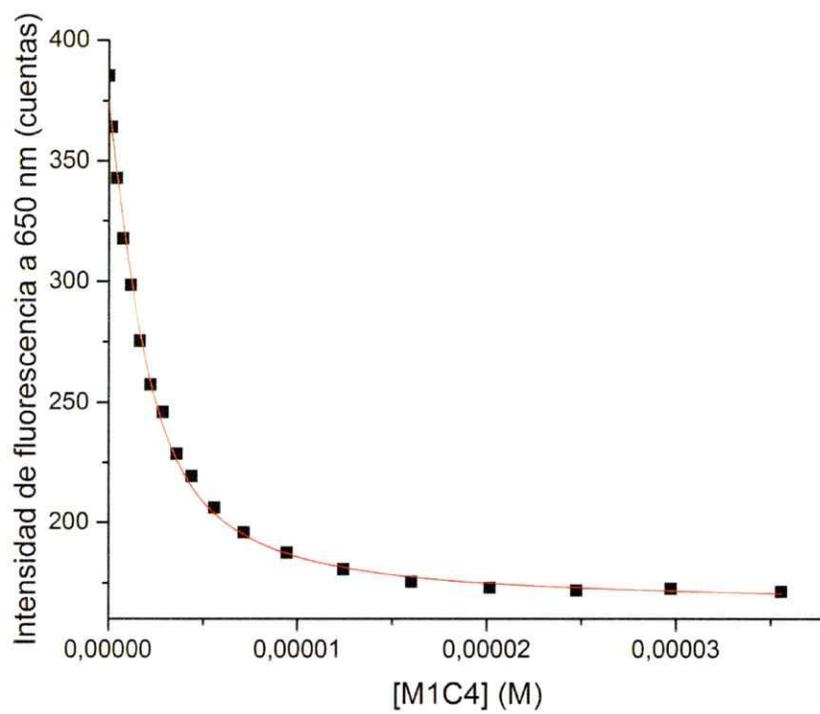


Figura B28: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con MIC4. Modelo de asociación 1:1

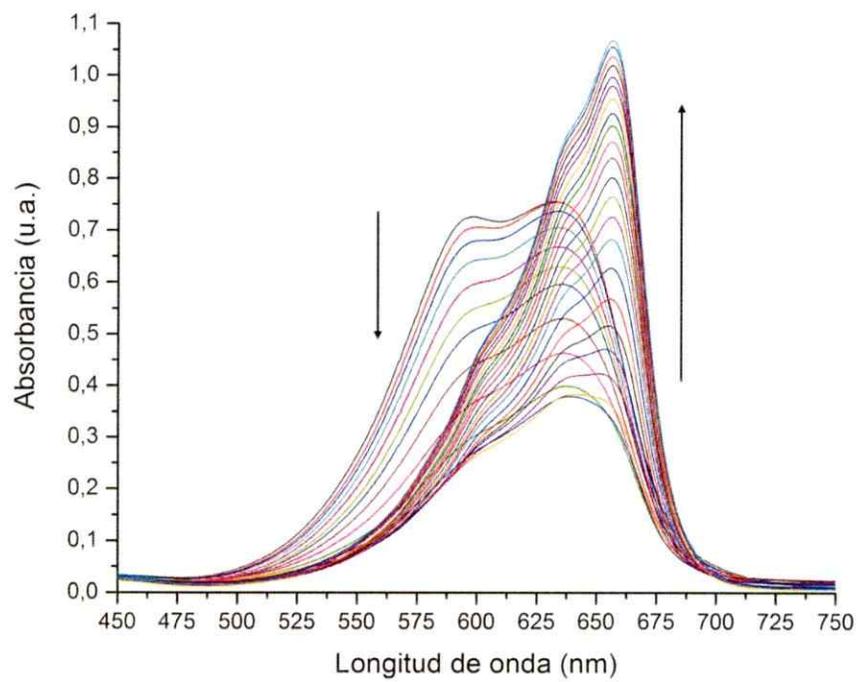


Figura B29: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de azul nilo (20 μM) con M2C4

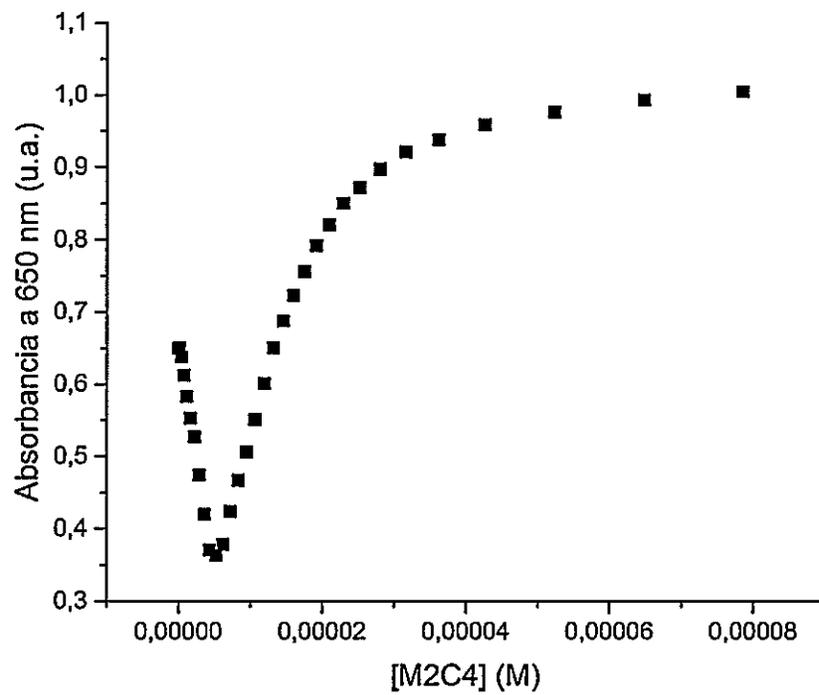


Figura B30: Variación del máximo de absorción a 650 nm en función de la concentración de M2C4 agregado en la titulación

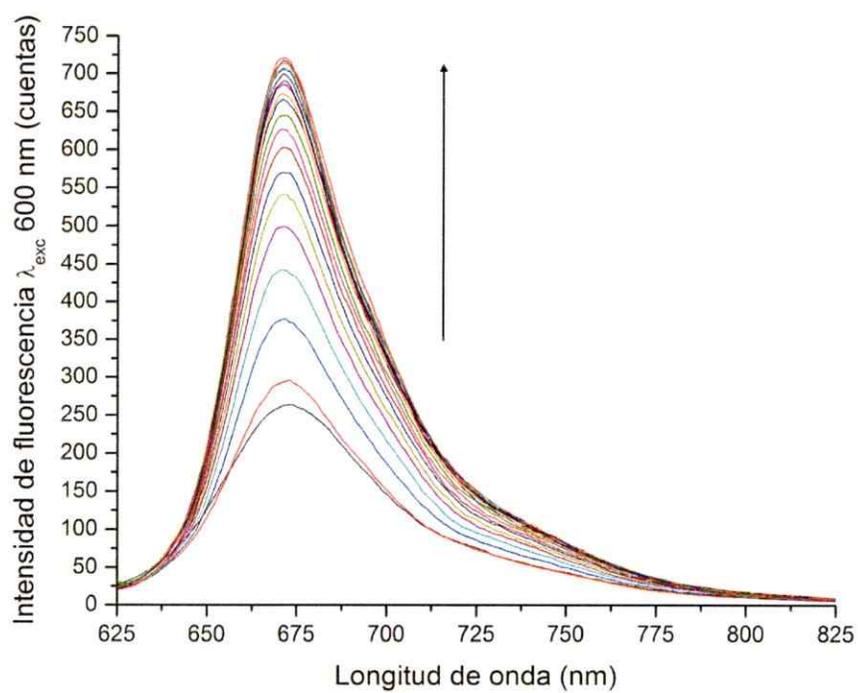


Figura B31: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo (0,2 μM) con M2C4

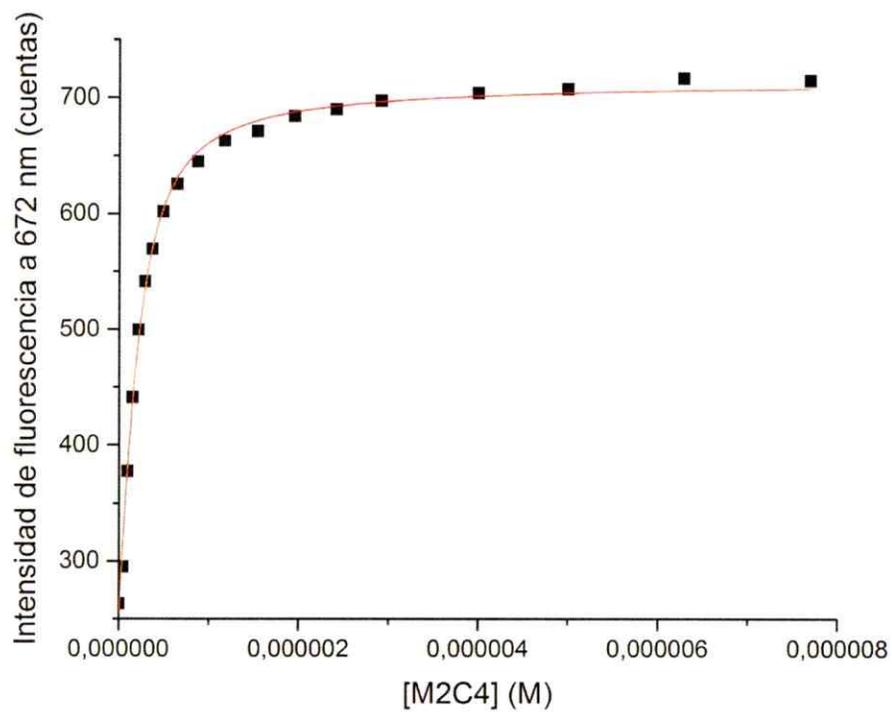


Figura B32: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de azul nilo con M2C4. Modelo de asociación 1:1

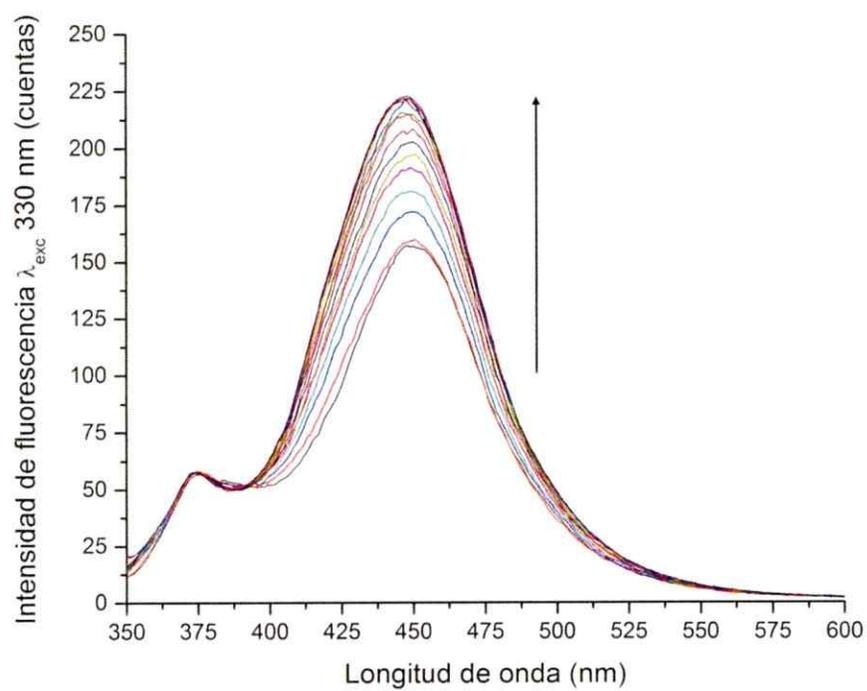


Figura B33: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T ($3 \mu\text{M}$) con β -ciclodextrina

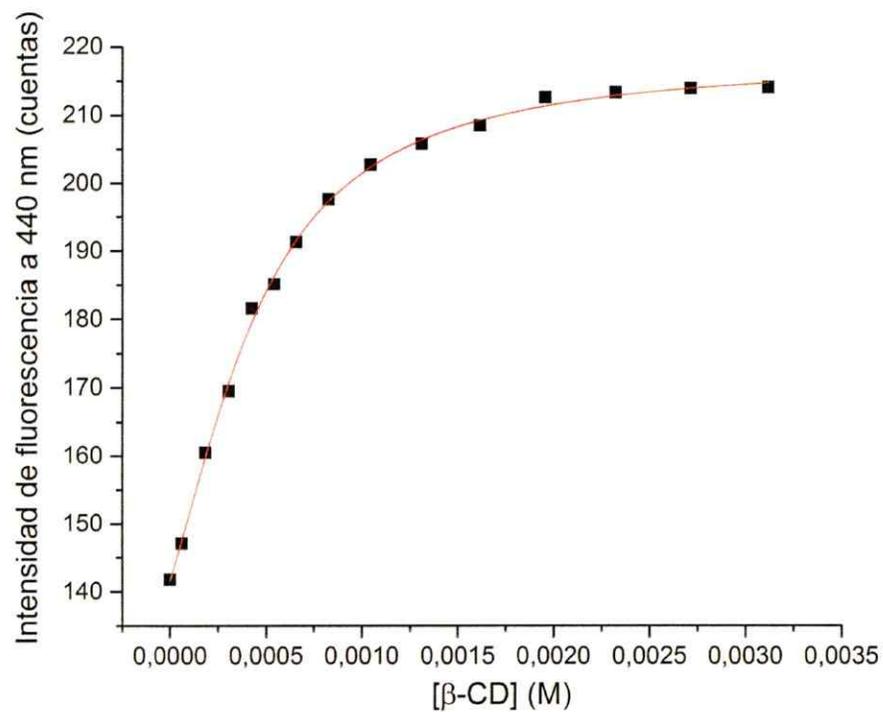


Figura B34: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia tioflavina T con β -ciclodextrina. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped

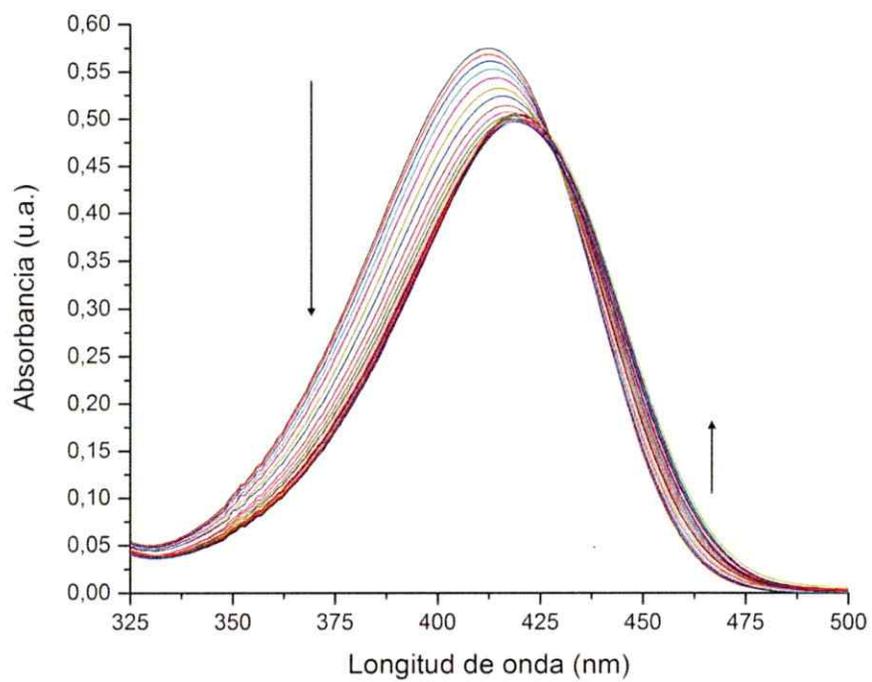


Figura B35: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μM) con CB[7]

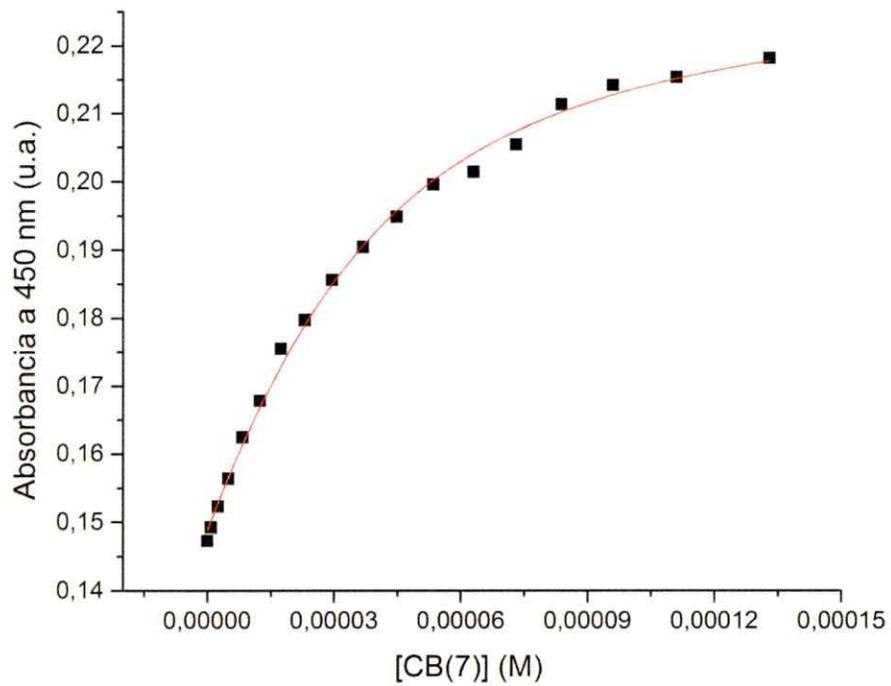


Figura B36: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1

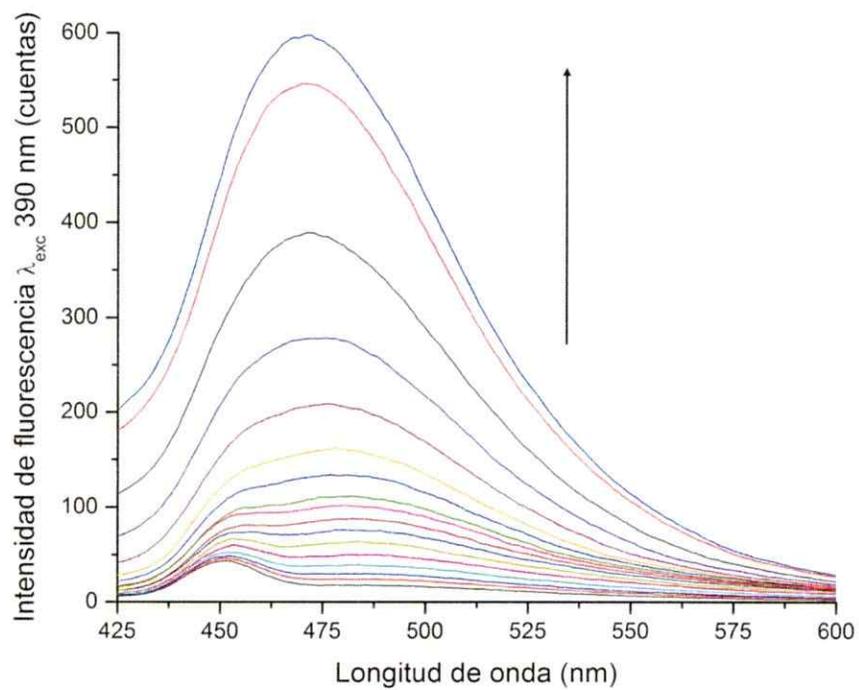


Figura B37: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T ($3 \mu\text{M}$) con CB[7]

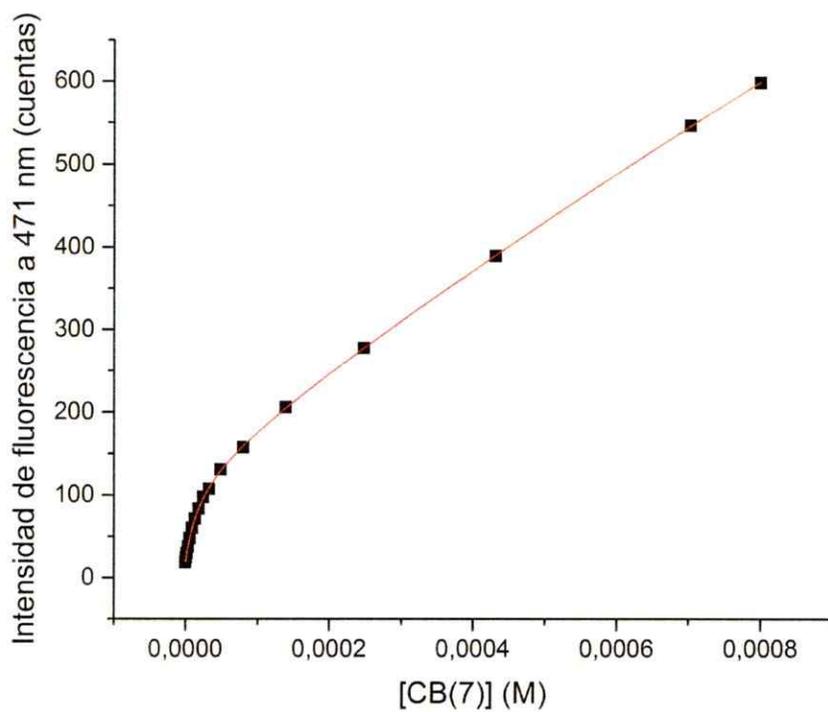


Figura B38: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped

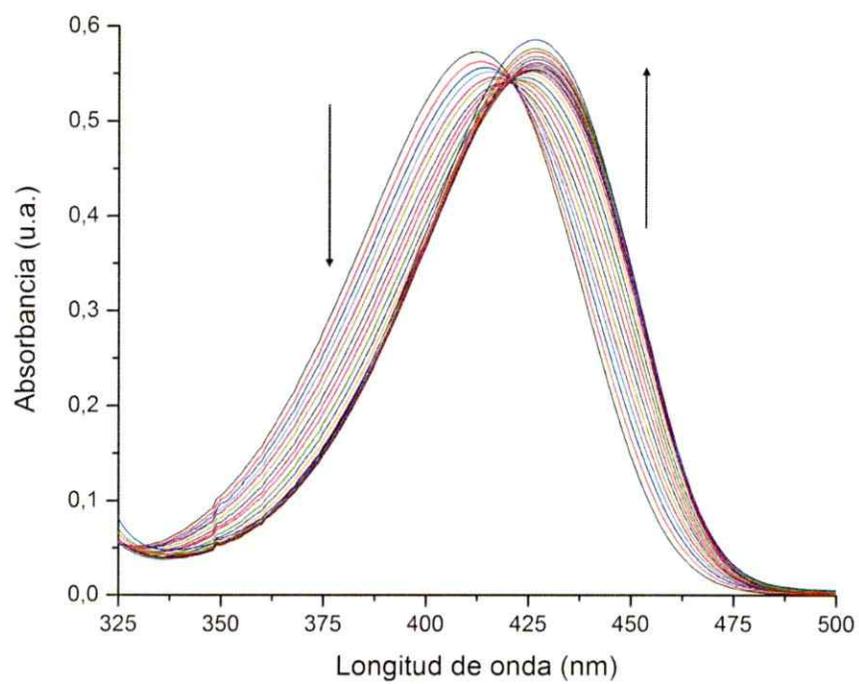


Figura B39: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μM) con MIC4

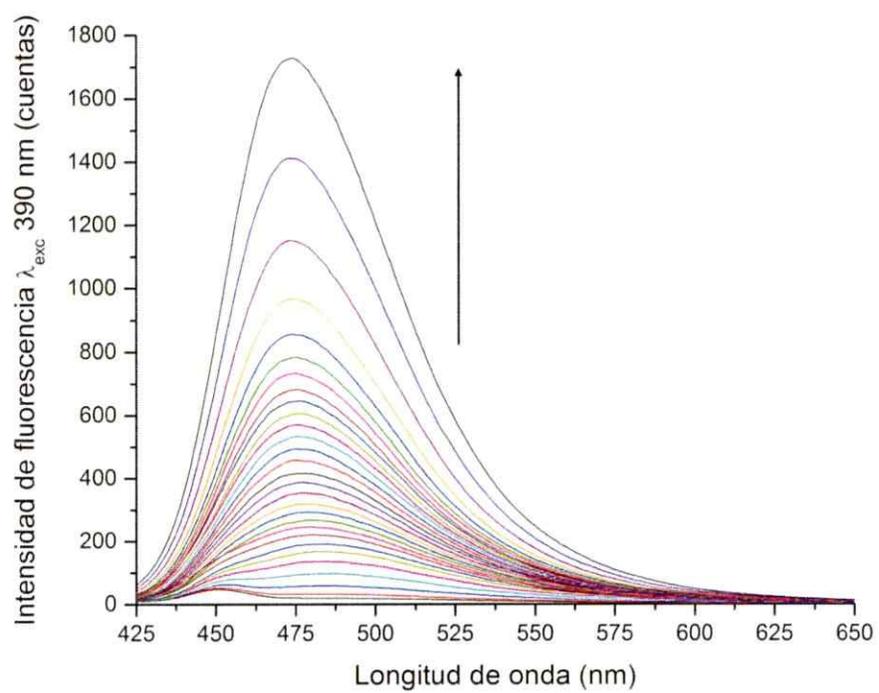


Figura B41: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con MIC4

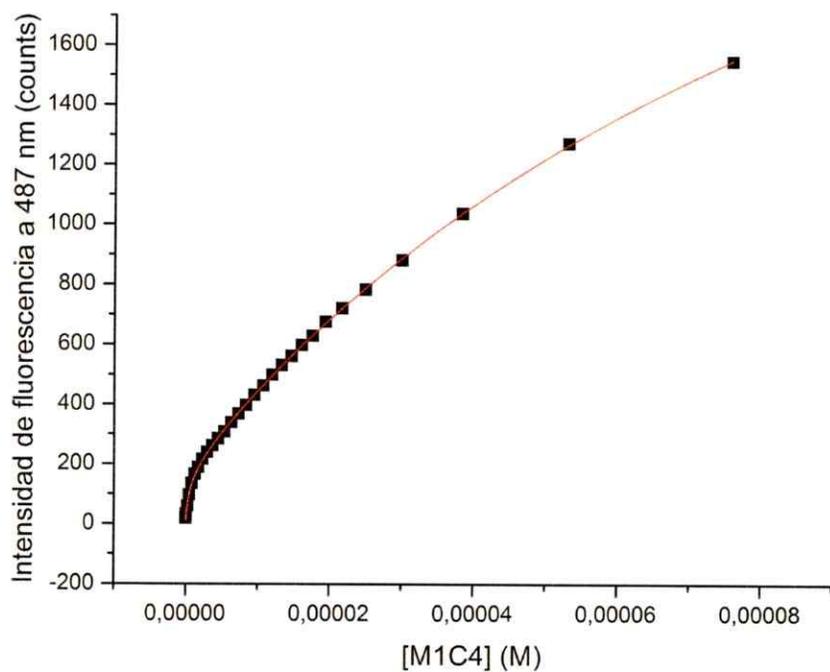


Figura B42: Ajuste de la curva de titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T con CB[7]. Modelo de asociación 1:1 – 2:1 matriz:huésped

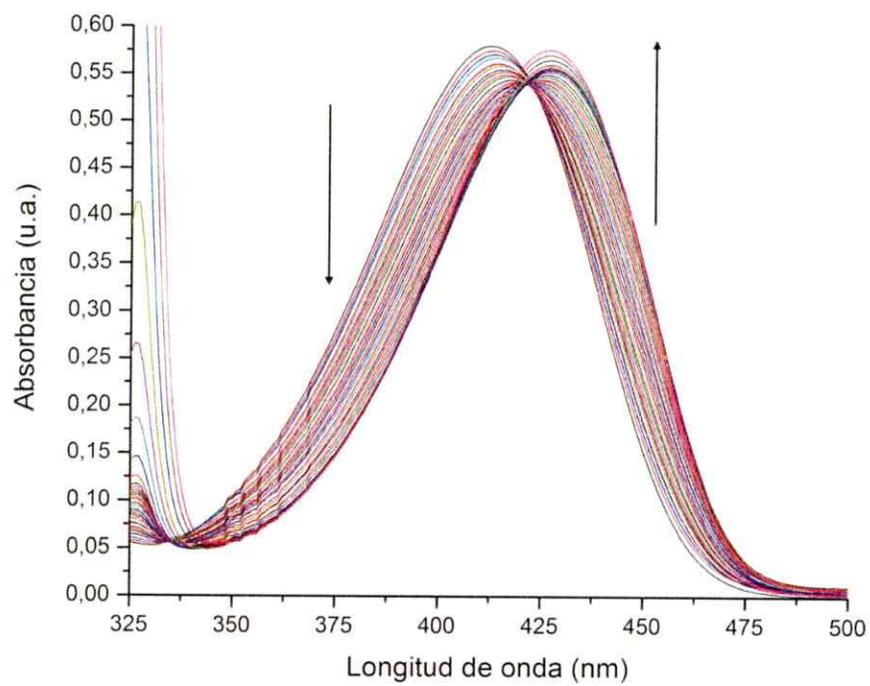


Figura B43: Titulación espectrofotométrica UV-Vis de tioflavina T (30 μ M) con M2C4

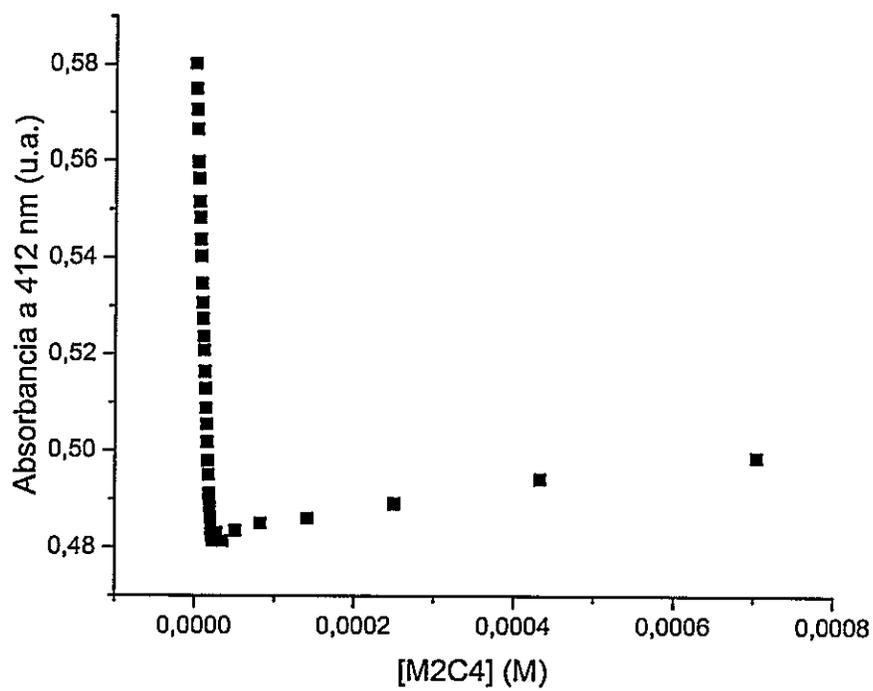


Figura B44: Absorción a 412 nm de tioflavina T en función de la concentración de M2C4 agregado en la titulación espectrofotométrica UV-Vis

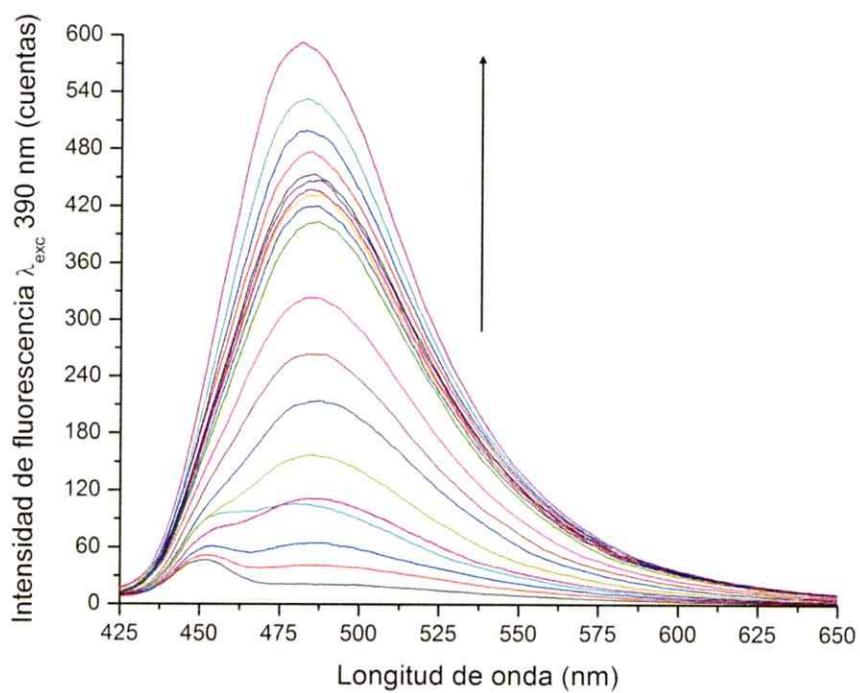


Figura B45: Titulación espectrofotométrica de fluorescencia de tioflavina T (3 μM) con M2C4

C. Método de las variaciones continuas y gráficos de Job de los compuestos de inclusión preparados en este estudio

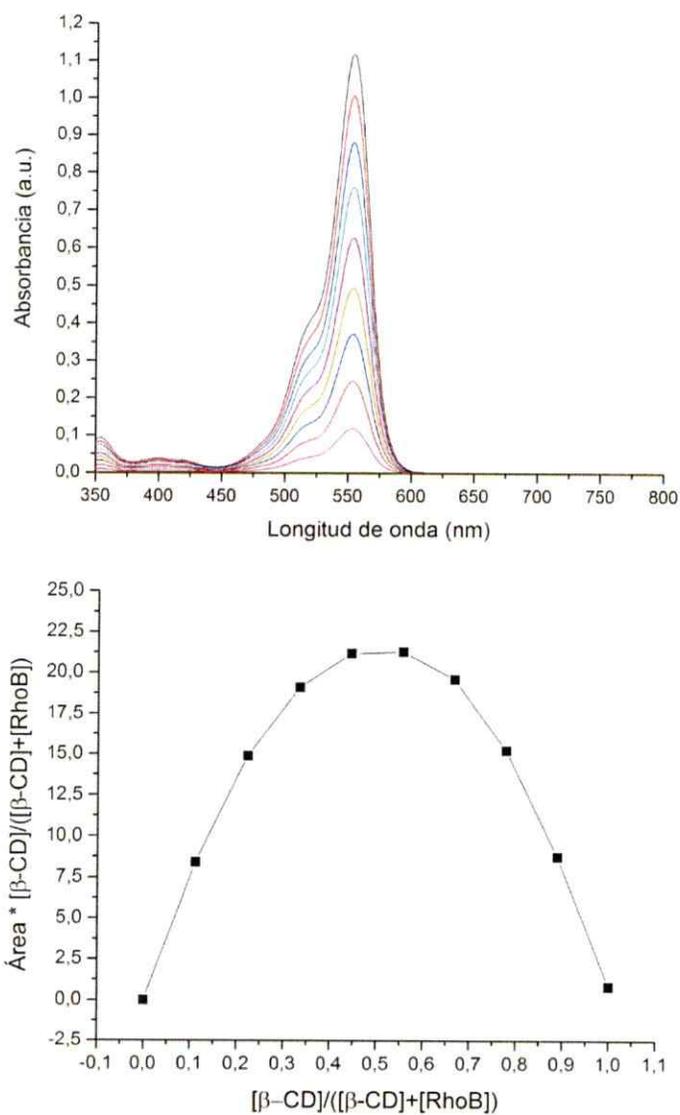


Figura C1: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@ β -ciclodextrina

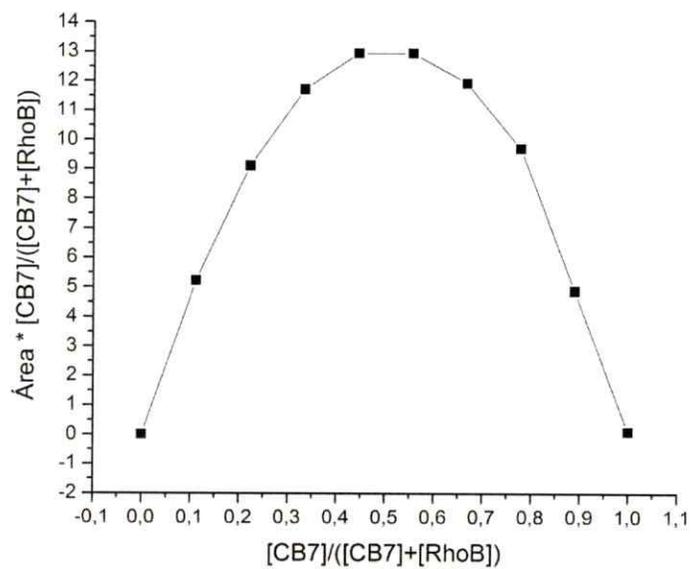
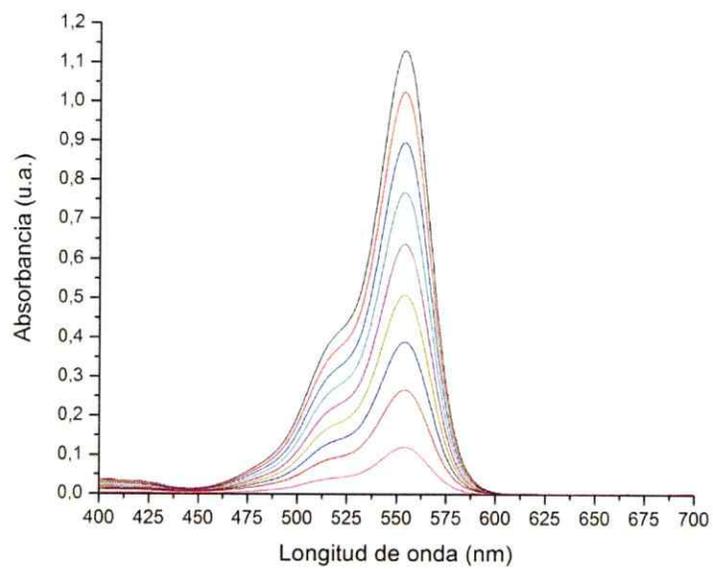


Figura C2: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@CB[7]

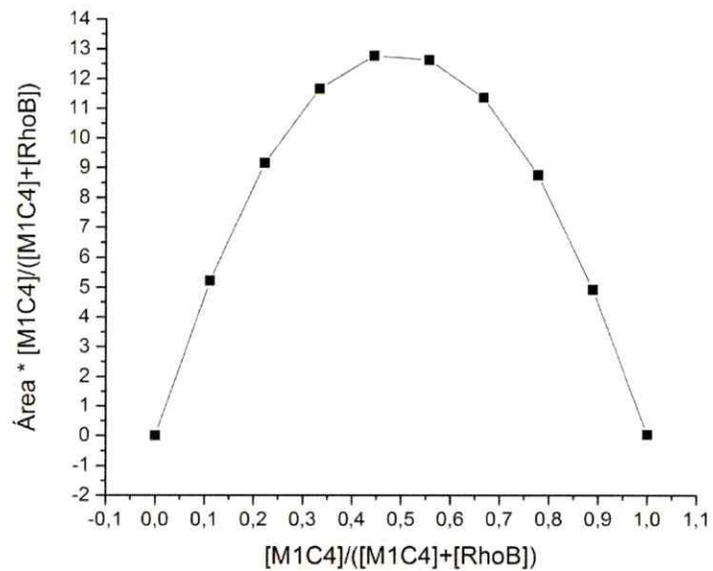
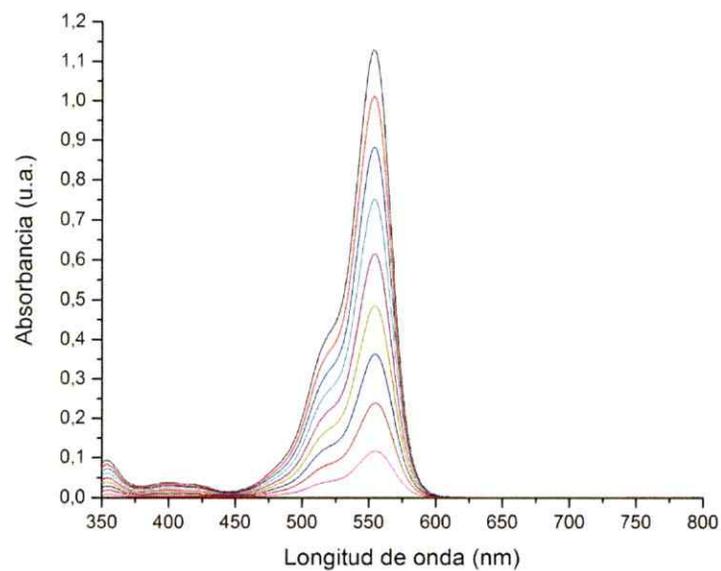


Figura C3: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@M1C4

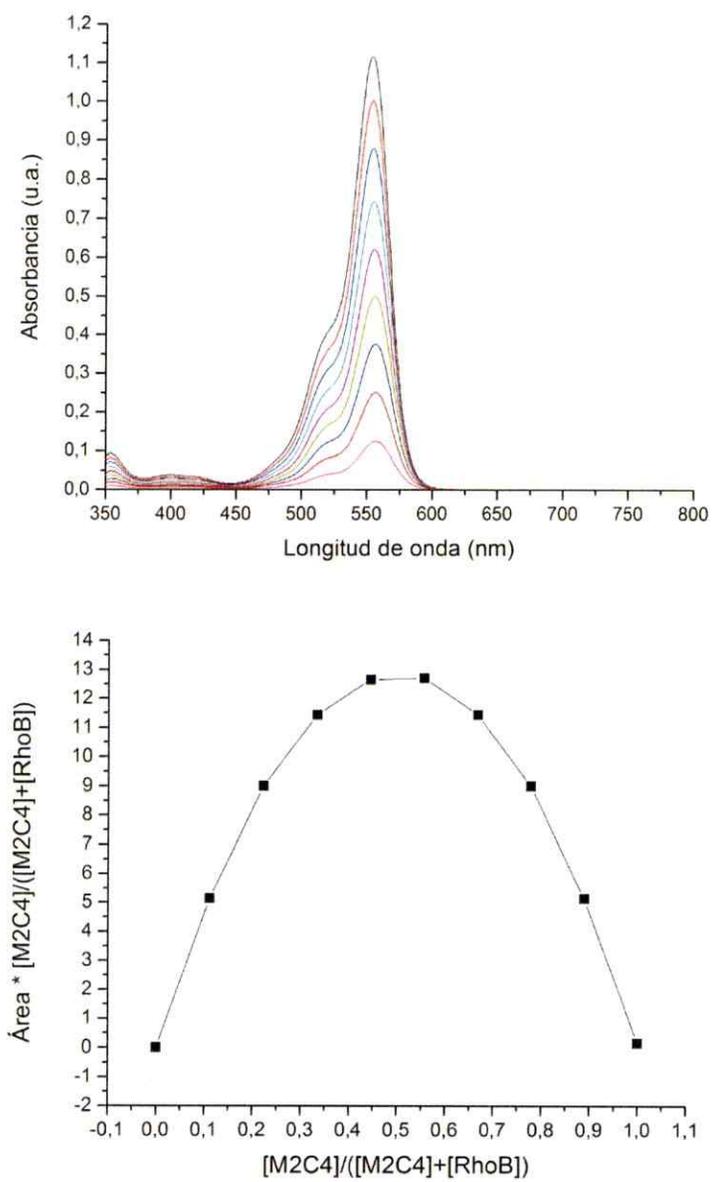


Figura C4: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de rodamina B@M2C4

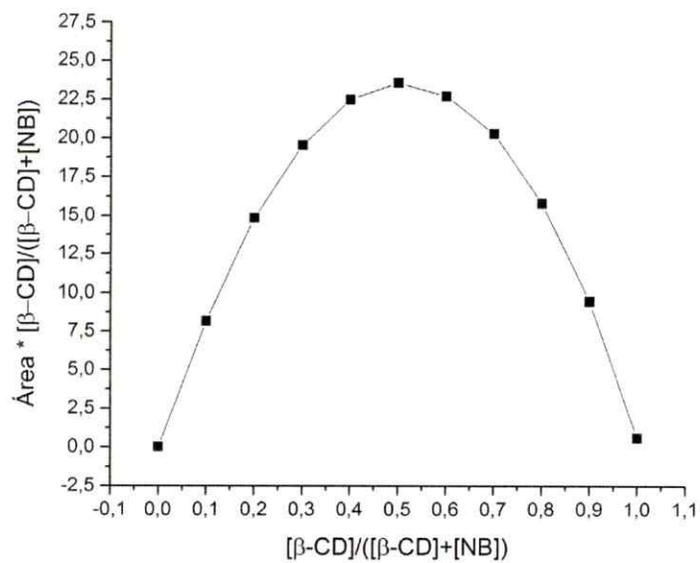
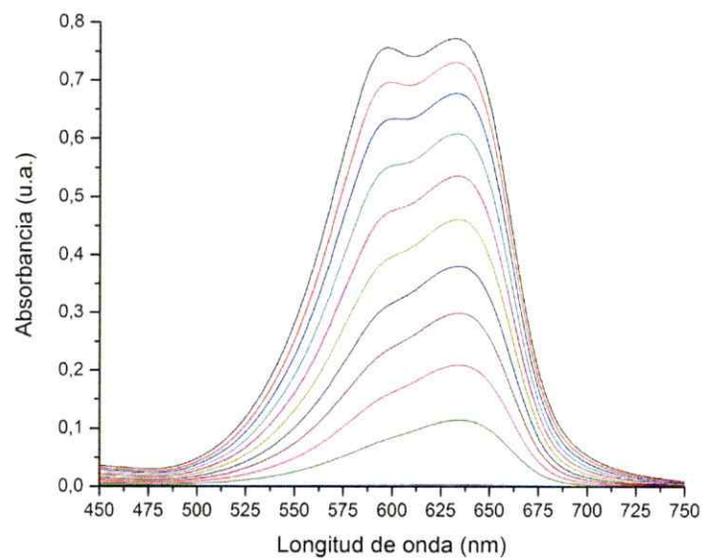


Figura C5: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@β-ciclodextrina

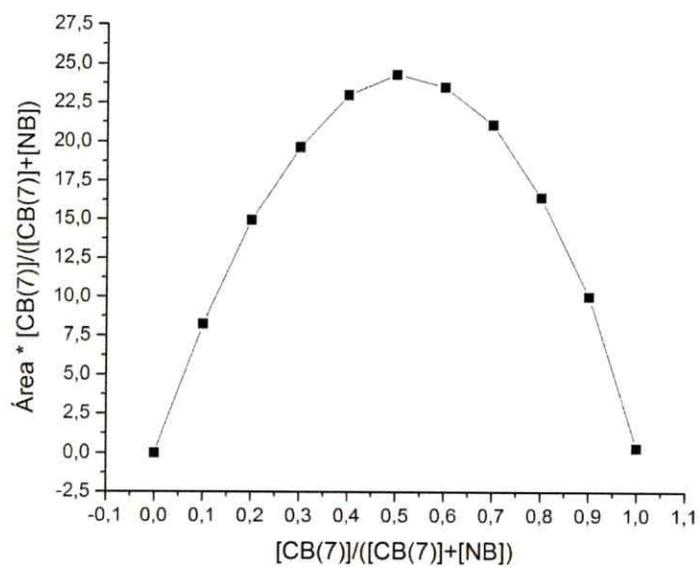
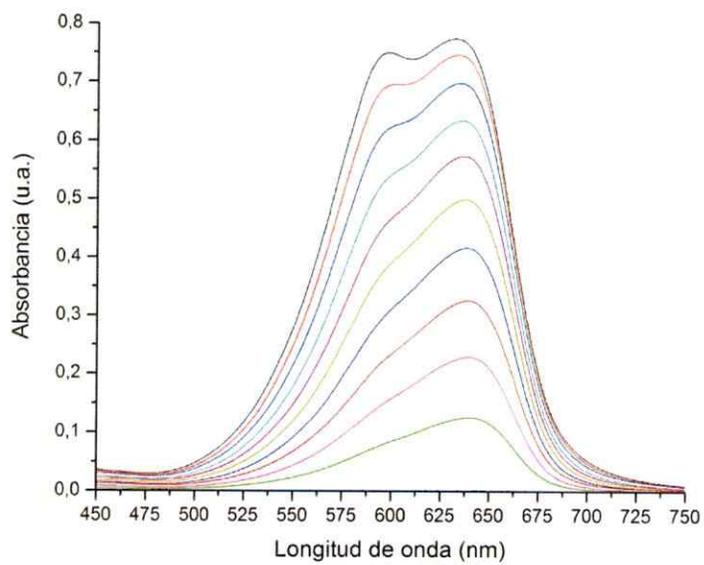


Figura C6: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@CB[7]

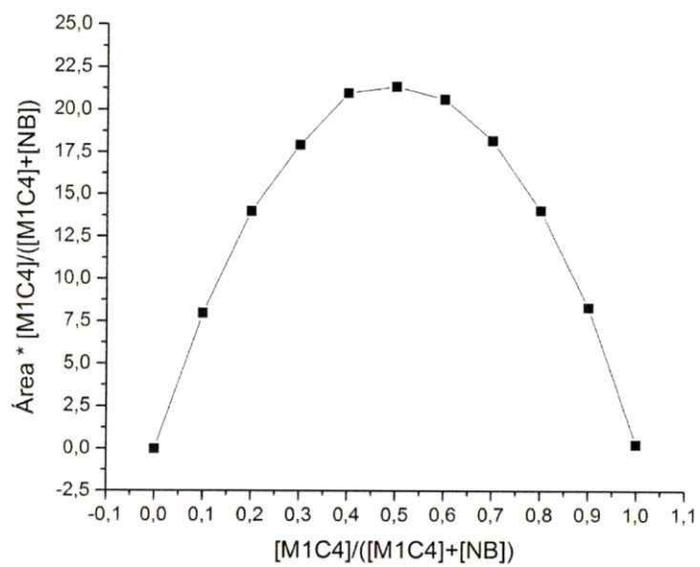
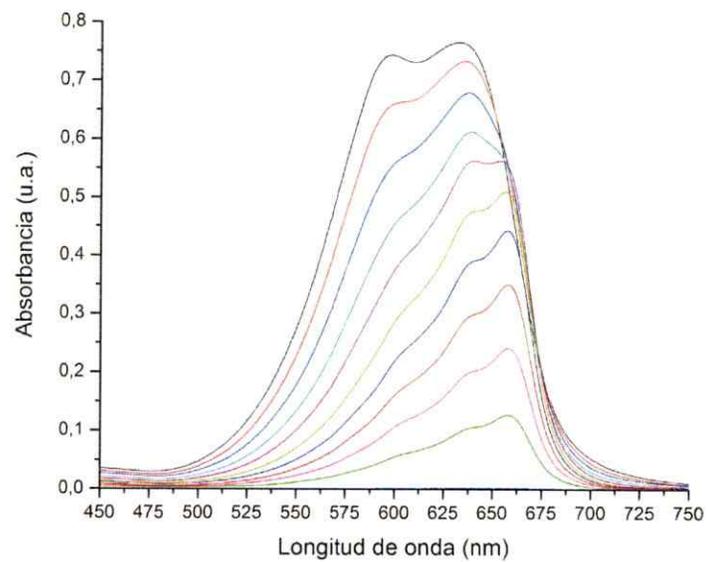


Figura C7: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@M1C4

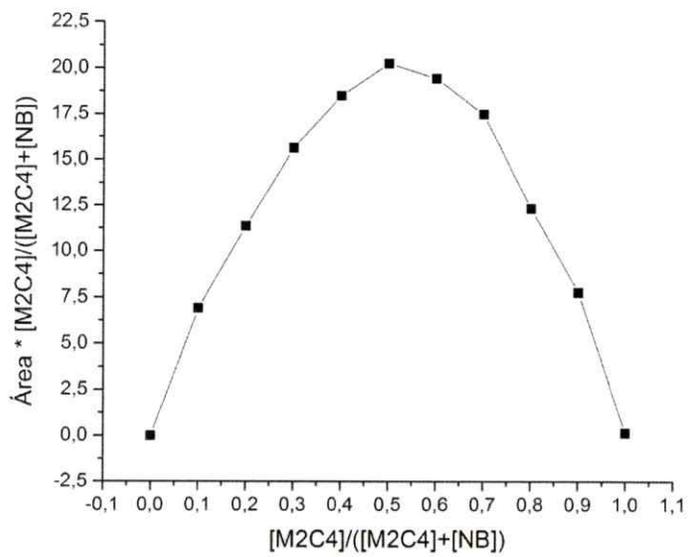
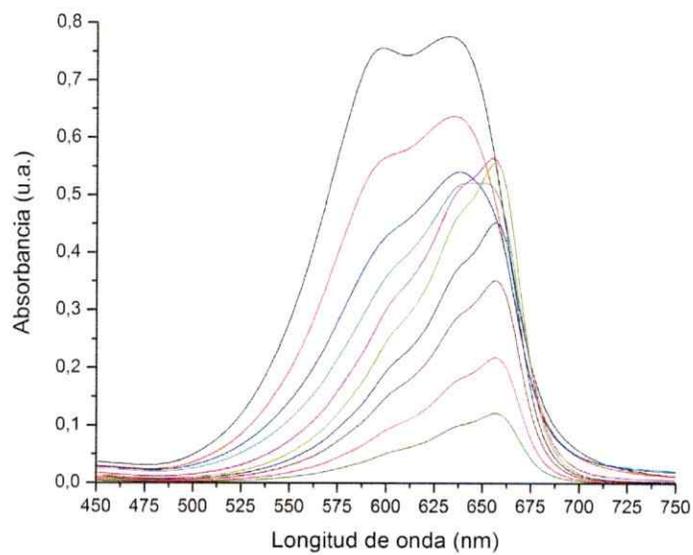


Figura C8: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de azul nilo@M2C4

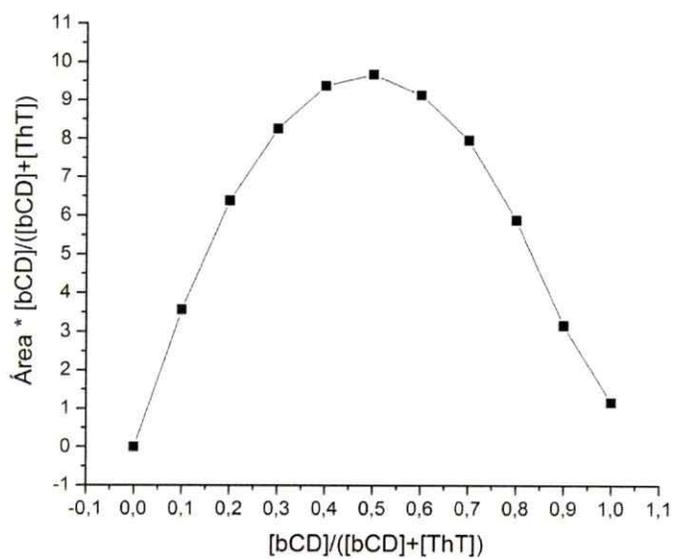
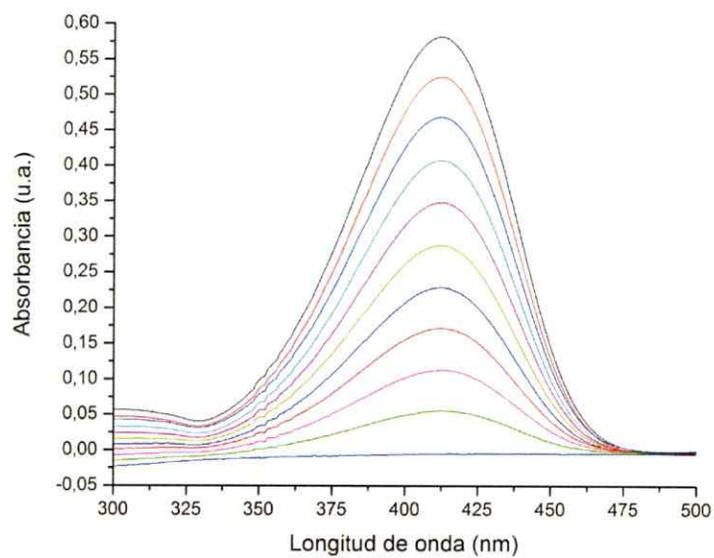


Figura C9: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@β-ciclodextrina

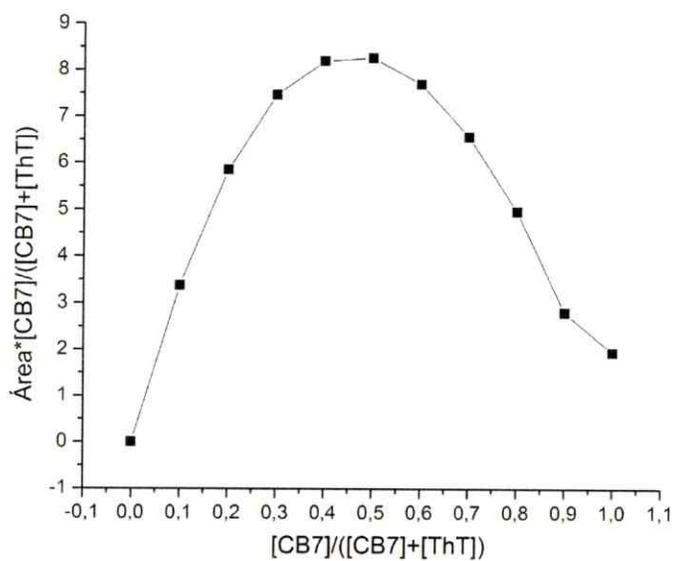
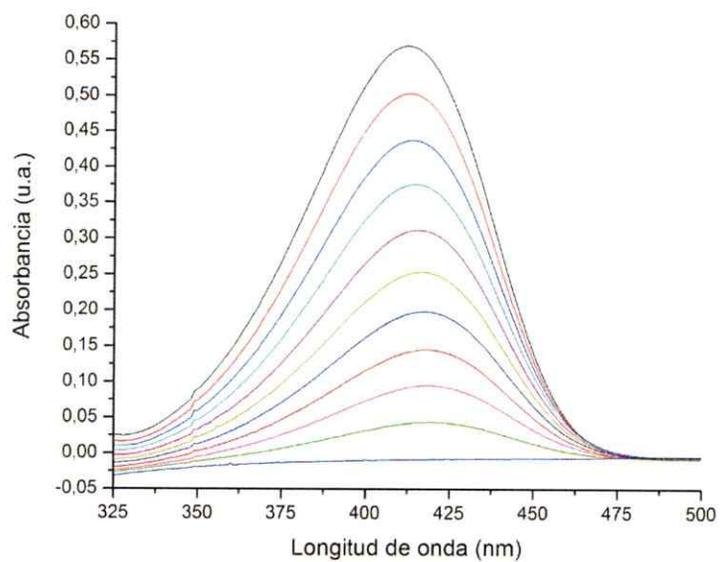


Figura C10: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@CB[7]

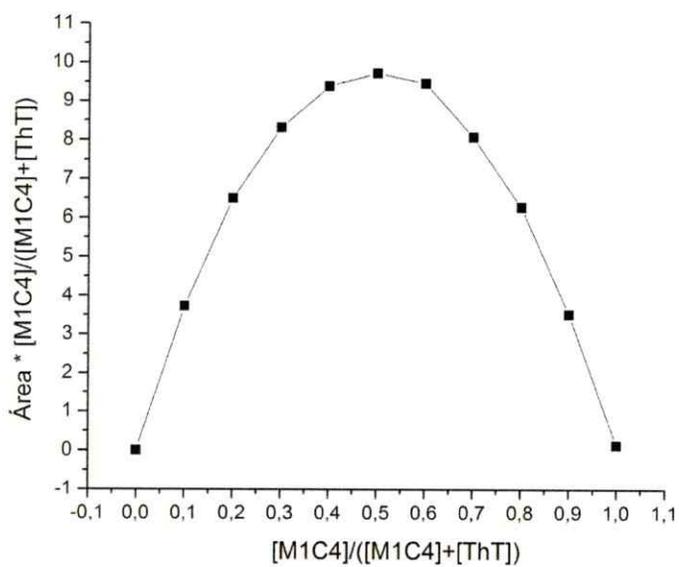
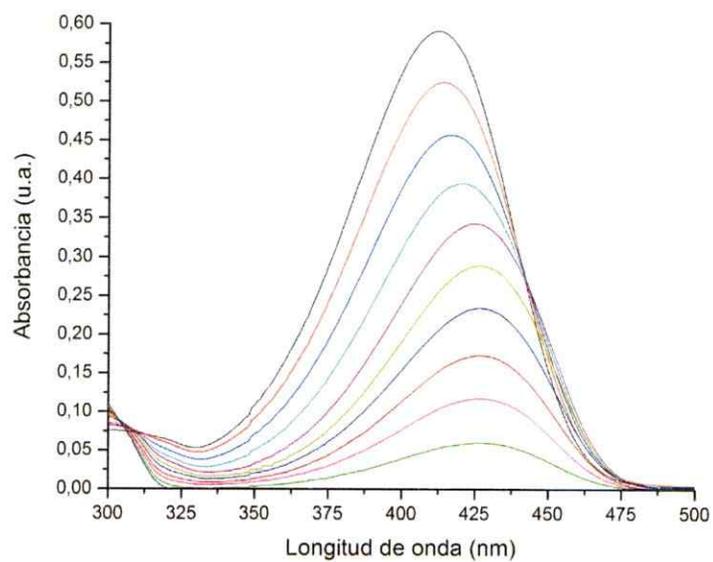


Figura C11: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@MIC4

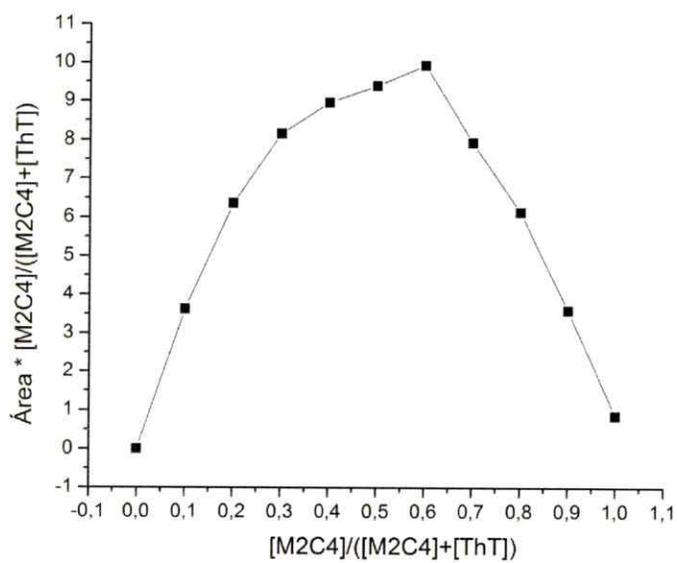
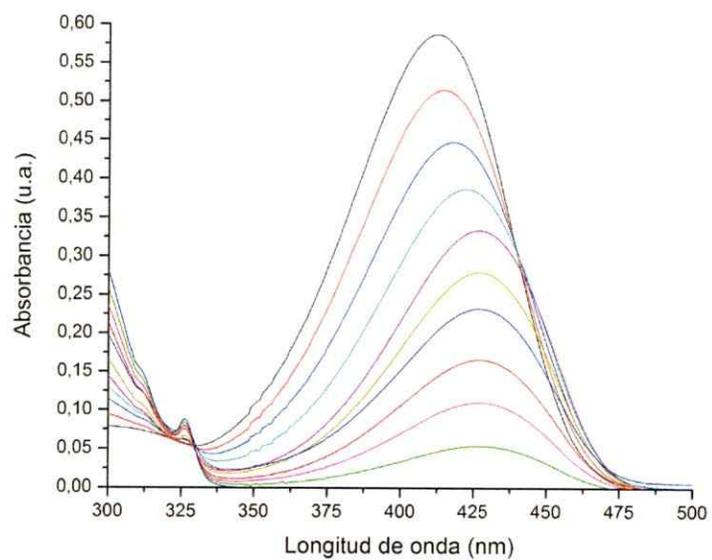


Figura C12: Método de las variaciones continuas y gráfico de Job para la formación del compuesto de tioflavina T@M2C4

D. Espectros de fluorescencia en estado sólido de los fluoróforos estudiados y de sus compuestos de inclusión sobre vidrio y vidrio modificado con nanopartículas de plata

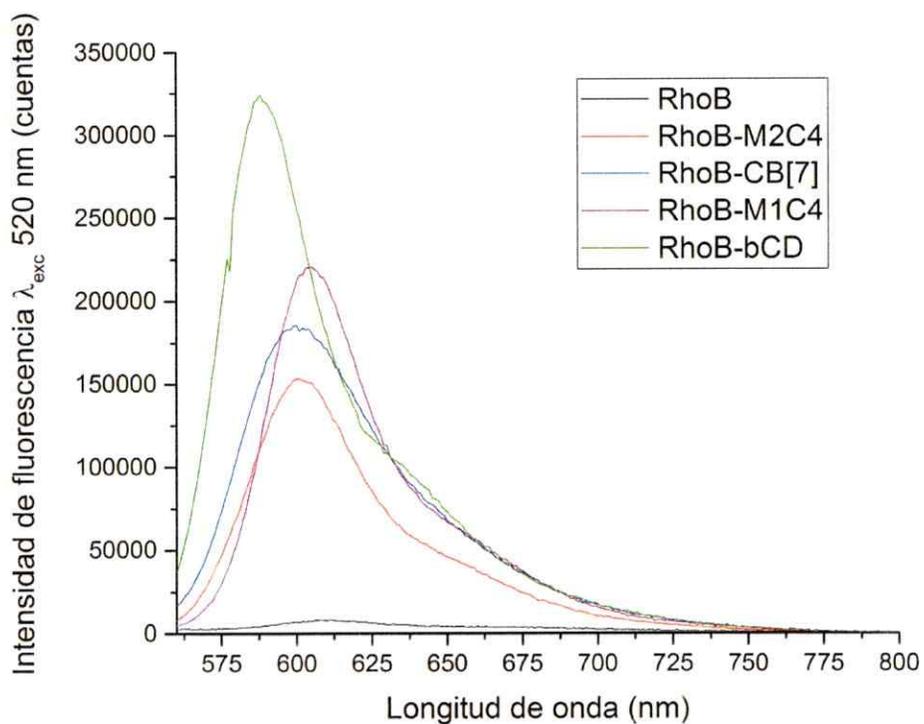


Figura D1: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B y de los compuestos inclusión de ésta con las matrices supramoleculares en estudio, sobre vidrio sin modificar.

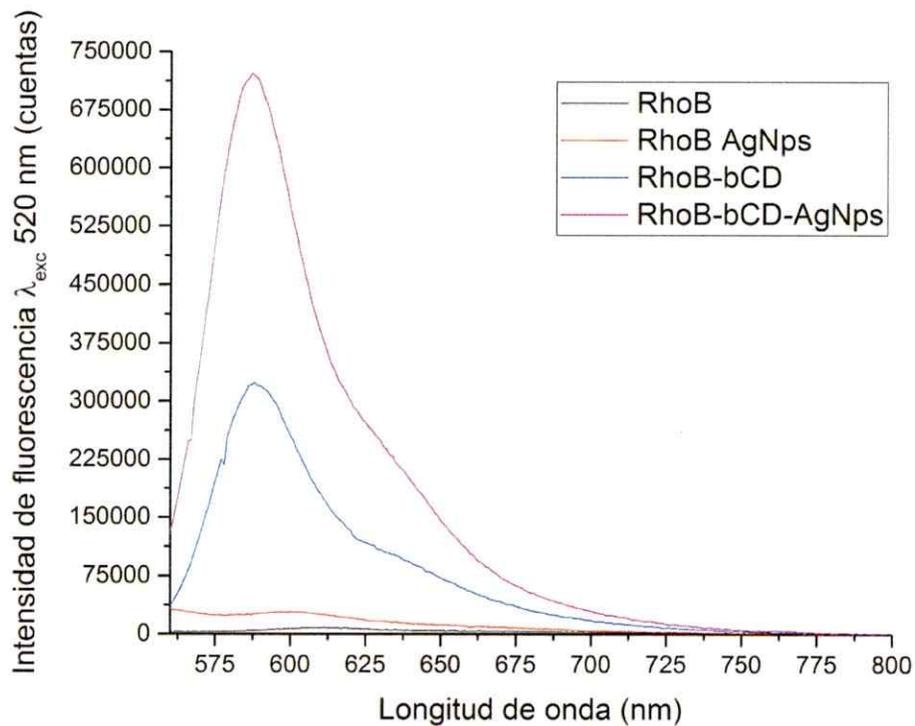


Figura D2: Espectros de fluorescencia en estado sólido de rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@ β -ciclodextrina (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

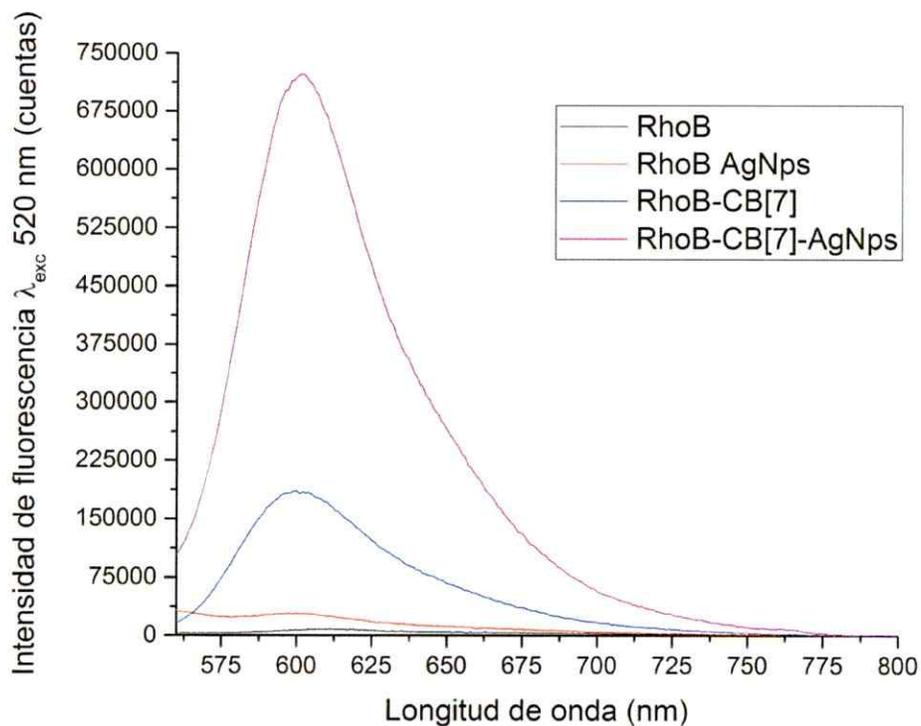


Figura D3: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@cucurbit[7]uril (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

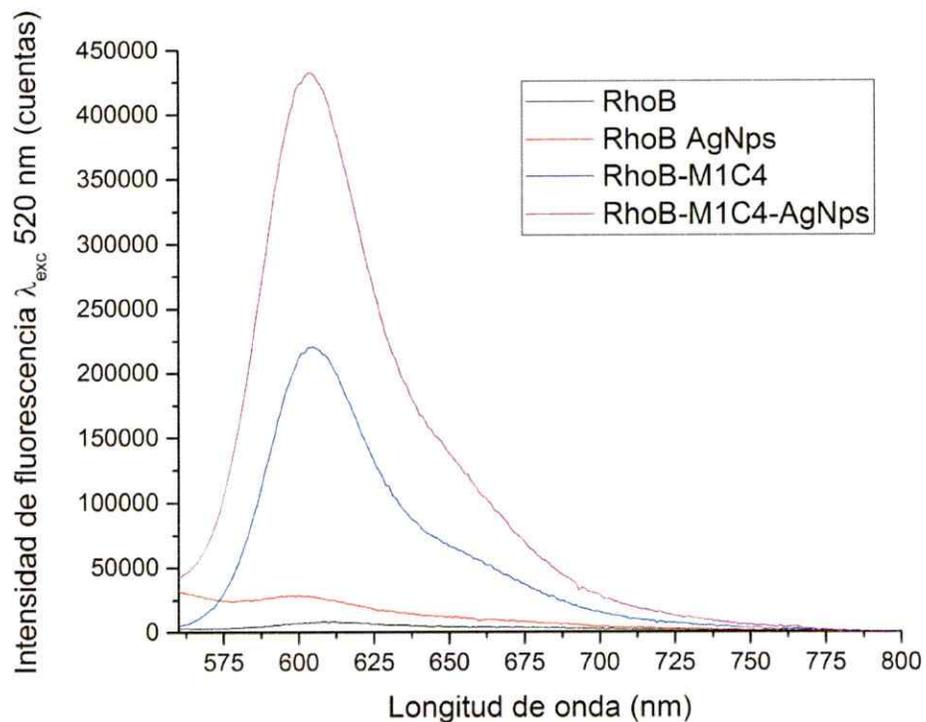


Figura D4: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@M1C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

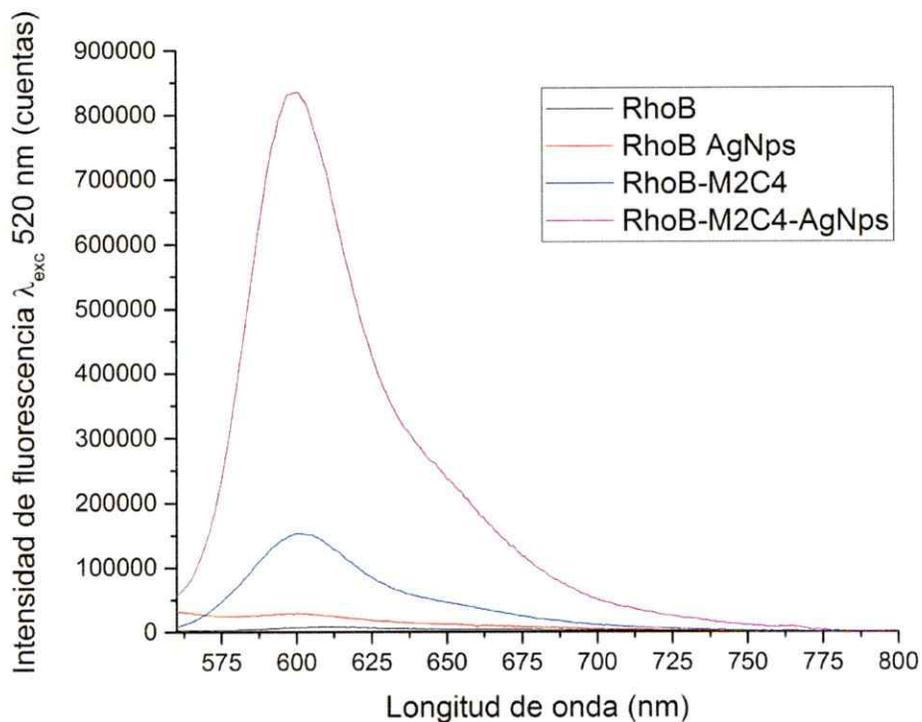


Figura D5: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la rodamina B (negro), del compuesto de inclusión rodamina B@M2C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

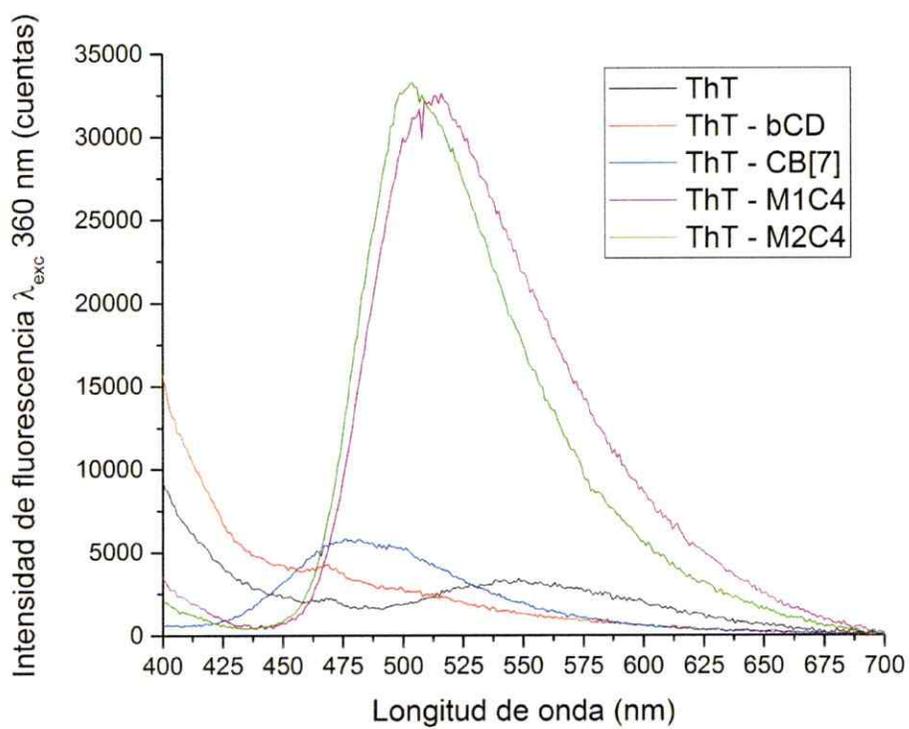


Figura D6: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T y de los compuestos inclusión de ésta con las matrices supramoleculares en estudio, sobre vidrio sin modificar.

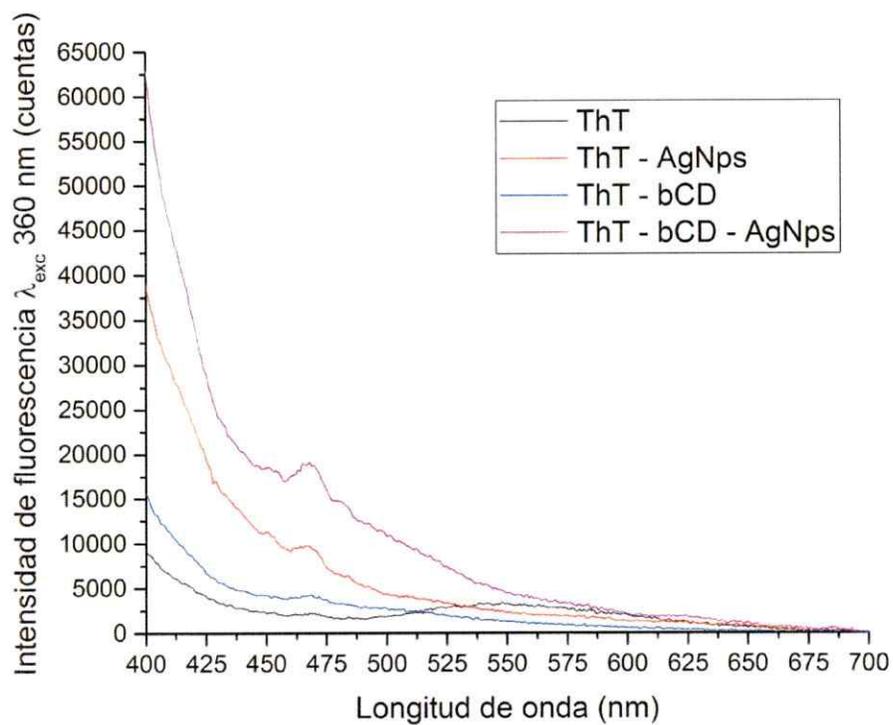


Figura D7: Espectros de fluorescencia en estado sólido de tioflavina T (negro), del compuesto de inclusión tioflavina T@ β -ciclodextrina (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

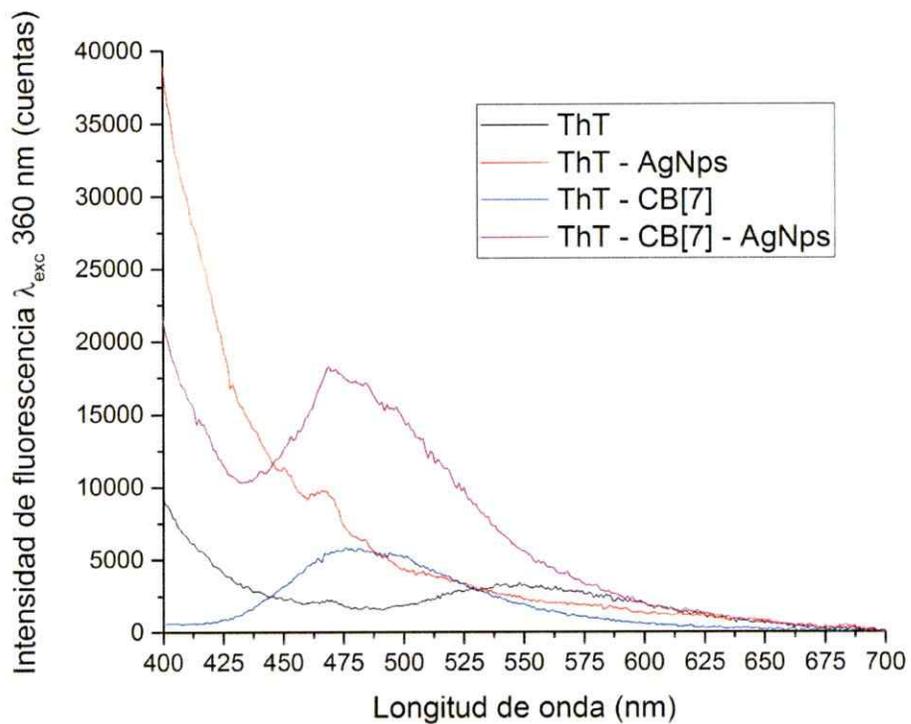


Figura D8: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del compuesto de inclusión tioflavina T@cucurbit[7]uril (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

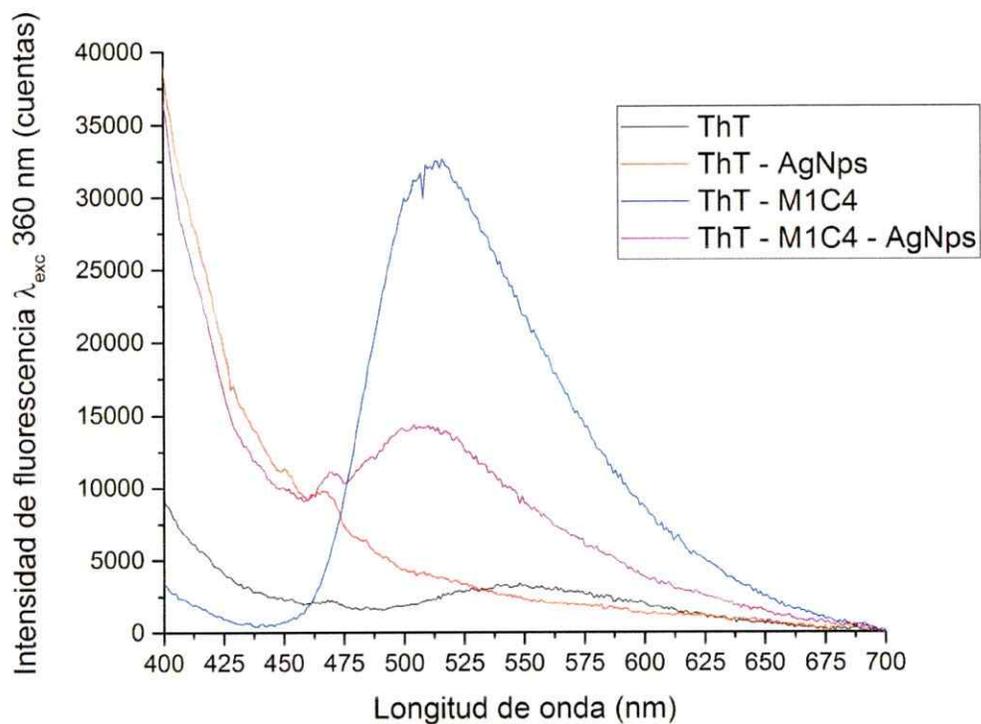


Figura D9: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del compuesto de inclusión tioflavina T@M1C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma rodamina B (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.

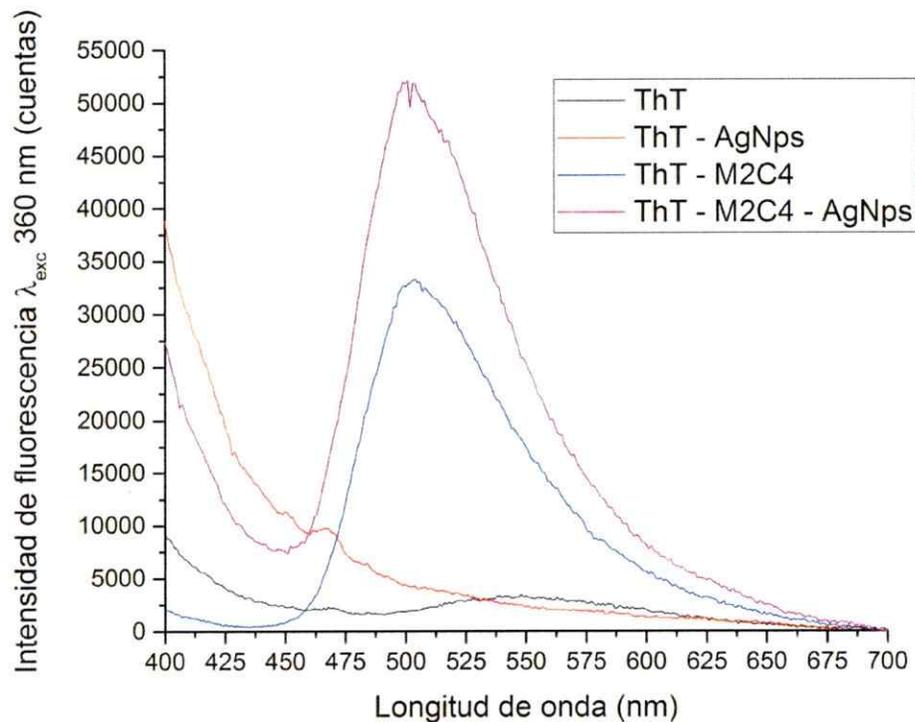


Figura D10: Espectros de fluorescencia en estado sólido de la tioflavina T (negro), del compuesto de inclusión tioflavina T@M2C4 (azul) sobre vidrio sin modificar. Además, se muestran los espectros de fluorescencia en estado sólido de la misma tioflavina T (rojo) y del compuesto de inclusión (rosado) sobre vidrio modificado con nanopartículas de plata.