



**Máster Universitario en Investigación Química y  
Química Industrial**

Trabajo de Fin de Máster

**Expandiendo y contrayendo las dimensiones de la  
“redbox”**

**Expandindo e contraendo as dimensións da  
“redbox”**

**Expanding and contracting the dimensions of the  
“redbox”**

**Natalia Fernández Labandeira**

Curso 2021 – 2022

Convocatoria: Julio

**Directores: Marcos Daniel García Romero**

**Arturo Blanco Gómez**

**QUIMOLMAT-Supra, Centro de Investigaciones Científicas  
Avanzadas (CICA). Universidad de A Coruña.**



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar las gracias en primer lugar a mis dos tutores, Dr. Marcos D. García Romero y Dr. Arturo Blanco Gómez, y al Dr. Carlos Peinador Veira, por permitirme formar parte de este proyecto tan emocionante y adentrarme en el fascinante mundo de la Química Supramolecular. En especial a Arturo, por su orientación, paciencia y consejos en el laboratorio y por iniciarme en el mundo de la investigación.

También gracias a Lili, miembro del grupo QUIMOLMAT-Supra del CICA, por ser un referente, ayudarme siempre y por todo lo que me has enseñado. A Mauro y a Alex, por apoyarme y ayudarme en todo.

Por último, gracias a mi familia, por todo.



## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

1,5-DHN	1,5-dihidroxi-naftaleno
$^1\text{H}$ RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C}$ RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
CENSO	<i>Command-line ENergetic Sorting</i> (Clasificación energética de línea de comandos)
Conf	Confórmero
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i> $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Espectroscopía de Correlación)
$\delta$	Desplazamiento químico
DCC	Química Covalente Dinámica
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Mejora sin distorsión por transferencia de polarización)
d	Doblete
eq	Equivalentes
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas con ionización por electrospray)
EXSY	<i>EXchange SpectroscopY</i> (Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser)
HA	Dialdehído
HH	Dihidrazona
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlación Heteronuclear de Enlace Múltiple)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
HSQC	<i>Heteronuclear Simple Quantum Correlation</i> (Correlación Heteronuclear de un Único Cuanto)
$J$	Constante de acoplamiento
$K_a$	Constante termodinámica de asociación receptor-substrato
$\lambda$	Longitud de onda
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MIMs	<i>Mechanically Interlocked Molecules</i> (Moléculas Mecánicamente Entrelazadas)

<i>m</i> -RB	Macro ciclo <i>meta-red box</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> (Espectroscopia de mejoramiento nuclear de Overhauser)
<i>o</i> -RB	Macro ciclo <i>orto-red box</i>
RB	Macro ciclo <i>red box</i>
s	Singulete
$S_N2$	Reacción de sustitución nucleófila biomolecular
t	Triplete
TBACl	Cloruro de tetrabutilamonio
TFA	Ácido trifluoroacético
VT	Temperatura variable

## CRONOGRAMA



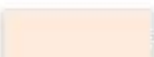
Febrero 2022						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28						

Marzo 2022						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

Abril 2022						
L	M	M	J	V	S	D
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	

Mayo 2022						
L	M	M	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30				

Junio 2022						
L	M	M	J	V	S	D
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30			

	Consulta bibliográfica
	Trabajo experimental
	Análisis de resultados y elaboración de la memoria

## RESUMEN

En los últimos años, el desarrollo de nuevos receptores catiónicos ha adquirido una gran importancia en el campo de la Química Supramolecular y, especialmente, de la Química *host-guest*, haciendo uso de diferentes interacciones no covalentes, como el enlace de hidrógeno, el efecto hidrofóbico o las interacciones  $\pi$ - $\pi$ .

Tomando como base al conocido ciclofano tetracatiónico *blue box* desarrollado por Stoddart, se ha desarrollado un análogo hidrazona, el macrociclo *red box*. Este trabajo se centra en la síntesis de dos nuevos análogos hidrazona similares a la *red box*, en los cuales se reduce la distancia entre los lados largos del macrociclo, el *meta-red box* ( $m\text{-RB}^{4+}$ ) y el *orto-red box* ( $o\text{-RB}^{4+}$ ). Así, se han sintetizado los precursores de ambos de forma sencilla y eficaz, y estos se han autoensamblado con éxito a los consiguientes macrociclos, haciendo uso de la química covalente dinámica de iminas. Todos los compuestos han sido debidamente caracterizados mediante las técnicas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN y espectrometría de masas.

Debido a la presencia de unidades aromáticas aceptoras de piridinio,  $m\text{-RB}^{4+}$  y  $o\text{-RB}^{4+}$  formarían complejos de inclusión con sustratos  $\pi$ -excedentes de interés, como el 1,5-dihidroxinaftaleno. A pesar de ello, se observa que solo  $m\text{-RB}^{4+}$  se compleja con dicho sustrato, ya que su cavidad presenta el tamaño y complementariedad adecuada. Además, al tener dos grupos hidrazona, podrían interaccionar con aniones mediante enlaces de hidrógeno a través de sus grupos N-H. El estudio de la respuesta de  $o\text{-RB}^{4+}$  con  $\text{Cl}^-$  muestra la fuerte interacción existente entre ellos.

## PALABRAS CLAVE

Química supramolecular, química covalente dinámica, macrociclos, ciclofanos, sensor molecular.

## ABSTRACT

In recent years, the development of new cationic receptors has acquired great importance in the field of Supramolecular Chemistry and, especially, in host-guest Chemistry, making use of different non-covalent interactions, such as the hydrogen bond, the effect hydrophobic or  $\pi$ - $\pi$  interactions.

Based on the well-known tetracationic *blue box* cyclophane developed by Stoddart, a hydrazone analogue, the *red box* macrocycle, has been developed. This work focuses on the synthesis of two new hydrazone analogues similar to the *red box*, in which the distance between the long sides of the macrocycle is reduced, the *meta-red box* ( $m\text{-RB}^{4+}$ ) and the *ortho-red box* ( $o\text{-RB}^{4+}$ ). Hence, the precursors of both macrocycles have been synthesized in a simple and efficient way and the macrocycles have been assembled successfully, making use of the dynamic covalent chemistry of imines. All compounds have been duly characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and mass spectrometry techniques.

Due to the presence of pyridinium aromatic units in its structures,  $m\text{-RB}^{4+}$  and  $o\text{-RB}^{4+}$  would form inclusion complexes with  $\pi$ -donor substrates of interest, such as 1,5-dihydroxynaphthalene. Despite this, it is observed that only  $m\text{-RB}^{4+}$  is able to complex the above-mentioned substrate, since its cavity has the appropriate size and complementarity. In addition, having two hydrazone groups, the macrocycles could interact with anions through hydrogen bonds through their N-H moieties. The study of the response of  $o\text{-RB}^{4+}$  with  $\text{Cl}^-$  shows the strong interaction between them.

## KEYWORDS

Supramolecular chemistry, dynamic covalent chemistry, macrocycles, cyclophanes, molecular sensor.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Química supramolecular .....	1
1.2. Química <i>host-guest</i> .....	2
1.3. Química covalente dinámica de iminas.....	2
1.4. Receptores supramoleculares de iones.....	3
1.5. Antecedentes: los ciclofanos <i>blue box</i> , <i>white box</i> y <i>red box</i> .....	6
2. OBJETIVOS .....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
3.1. Síntesis y caracterización de los <i>bloques de construcción</i> .....	10
3.1.1. Síntesis de la <i>meta</i> -dihidrazona ( <i>m</i> -HH·2Br) .....	10
3.1.2. Síntesis del <i>meta</i> -dialdehido ( <i>m</i> -HA·2Br) .....	12
3.1.3. Síntesis de la <i>orto</i> -dihidrazona ( <i>o</i> -HH·2Br) .....	14
3.1.4. Síntesis del <i>orto</i> -dialdehido ( <i>o</i> -HA·2Br) .....	16
3.2. Síntesis y caracterización de los macrociclos .....	18
3.2.1. Ensamblaje de los macrociclos análogos a la <i>red box</i> , <i>m</i> -RB·4X y <i>o</i> -RB·4X.....	18
3.2.2. Elucidación estructural de <i>m</i> -RB <sup>4+</sup> y <i>o</i> -RB <sup>4+</sup> .....	19
3.3. Estudio de complejación entre <i>m</i> -RB <sup>4+</sup> y <i>o</i> -RB <sup>4+</sup> y un sustrato modelo....	28
3.4. Estudio de complejación entre <i>o</i> -RB <sup>4+</sup> y el anión Cl <sup>-</sup> .....	30
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1. Materiales y equipos usados.....	34
4.2. Procesos experimentales .....	34

4.2.1.	Síntesis de la <i>meta</i> -dihidrazona ( <i>m</i> -HH·2Br) .....	34
4.2.2.	Síntesis del <i>meta</i> -dialdehído ( <i>m</i> -HA·2Br) .....	36
4.2.3.	Ensamblaje y purificación del macrociclo <i>meta-red box</i> ( <i>m</i> -RB·4X) .	36
4.2.4.	Ensamblaje y purificación del macrociclo <i>orto-red box</i> ( <i>o</i> -RB·4X) ...	37
4.2.5.	Síntesis de los complejos de inclusión de <i>m</i> -RB·4TFA y <i>o</i> -RB·4TFA con 1,5-dihidroxi-naftaleno (1,5-DHN).....	38
4.2.6.	Estudio mediante <sup>1</sup> H RMN del complejo de inclusión de 1,5-DHN⊂ <i>m</i> -RB·4TFA en medio ácido (pD = 6.3) y básico (pD = 10.9).....	39
4.2.7.	Valoración de <i>o</i> -RB·4PF <sub>6</sub> con TBACl mediante espectroscopia UV-vis en medio orgánico (acetona).....	39
4.2.8.	Valoración de <i>o</i> -RB·4PF <sub>6</sub> con TBACl mediante <sup>1</sup> H RMN en CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> .....	40
4.3.	Cálculos computacionales de los conformeros de <i>o</i> -RB <sup>4+</sup> .....	40
5.	CONCLUSIONES .....	42
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	43
	ANEXOS .....	47

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Química supramolecular

La Química Supramolecular (QS) hace referencia a la rama de la química dedicada a la creación de estructuras complejas mediante el autoensamblaje de componentes moleculares más simples.<sup>1</sup> El nacimiento de la QS está estrechamente ligado a los trabajos iniciales de Pederson, Lehn y Cram acerca de éteres corona, criptandos y esferandos, respectivamente. Por dichos trabajos pioneros en el campo se les concedió el Premio Nobel de Química en 1987.<sup>2,3</sup>

En comparación con la química covalente tradicional, la QS emplea interacciones no covalentes reversibles, como son el enlace de hidrógeno, las interacciones ion-ion, ion-dipolo, apilamiento  $\pi$ - $\pi$ , las fuerzas de Van der Waals o el efecto hidrofóbico, bajo control termodinámico, de forma que se establece un equilibrio entre los productos de partida y el macrociclo.<sup>1,4,5</sup>

El empleo de este tipo de interacciones permite la integración rápida y reversible de los componentes para la formación de complejos *host-guest* y les confiere a estos sistemas propiedades únicas como la reversibilidad, capacidad de auto-reparación, de sufrir cambios conformacionales o la degradabilidad. Además, la posibilidad de modificar fácilmente su estructura aplicando cambios en el diseño de los materiales de partida posibilita tener estructuras multivalentes. Cabe destacar también su capacidad de respuesta ante estímulos externos, como la temperatura, el pH o la luz, pudiendo modificarse hacia formas más estables termodinámicamente, lo que permitiría a estos sistemas su adaptación a los medios biológicos.<sup>6,7</sup>

Es por ello que parte de la investigación actual se centra en el desarrollo de receptores moleculares con respuesta a estímulos (pH, luz, redox, etc.), los interruptores moleculares, de forma que se puede tener un mayor control del proceso de agregación para el desarrollo de sensores, materiales, catalizadores o máquinas moleculares.<sup>8,9</sup>

En las últimas décadas, se han diseñado multitud de receptores moleculares, como éteres corona, calixarenos, ciclodextrinas (CDs), cucurbiturilos (CBs) y pilarenos; macrociclos capaces de reconocer selectivamente y almacenar en su interior sustratos de tamaño y complementariedad adecuada mediante fuerzas no covalentes.<sup>6,7</sup> Así, se ha hecho uso del autoensamblaje para la síntesis de receptores complejos y de MIMs

(*Mechanically Interlocked Molecules*), como rotaxanos y catenanos, moléculas compuestas por dos o más componentes entrelazados y unidos mediante un “enlace mecánico” que no se pueden separar sin la ruptura o distorsión de los enlaces covalentes que forman el macrociclo.<sup>8</sup> En el año 2016, Ben Feringa, J. Fraser Stoddart y Jean-Pierre Sauvage fueron galardonados con el Premio Nobel de Química por “el diseño y síntesis de las máquinas moleculares”.<sup>10</sup>

## 1.2. Química *host-guest*

La química *host-guest* fue definida por Donald Cram como la unión de dos moléculas, un receptor (*host*) y un sustrato (*guest*), unidos mediante fuerzas intermoleculares débiles, de forma que hay una disposición estereoelectrónica complementaria de los sitios de unión (**Figura 1**). El receptor es, generalmente, un compuesto cíclico con una cavidad central y posee sitios de unión convergentes (átomos dadores tipo bases de Lewis, enlaces de hidrógeno dadores, etc.) con los que interaccionar con sustratos de diversa naturaleza. Por otro lado, el sustrato (cationes, aniones, proteínas, etc.) tiene que poseer sitios de unión divergentes (aceptor de enlace de hidrógeno, átomos aceptores tipo ácidos de Lewis, etc.) y un tamaño y complementariedad adecuada para interactuar con el receptor.<sup>3</sup>

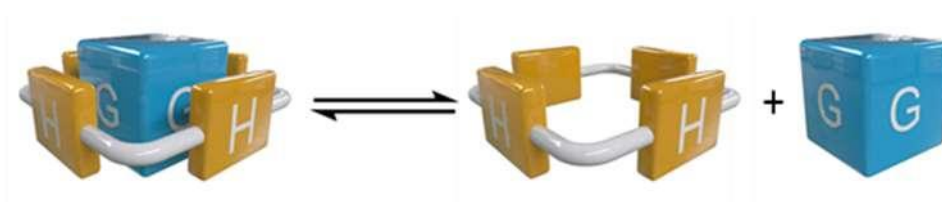


Figura 1. Representación del equilibrio de disociación *host-guest*  $H \cdot G \rightleftharpoons H + G$ .<sup>9</sup>

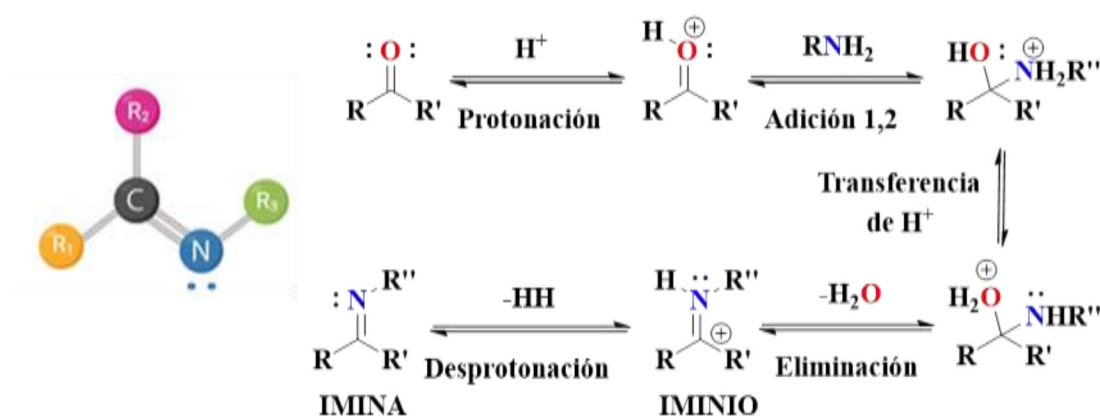
## 1.3. Química covalente dinámica de iminas

En una reacción bajo control cinético, se forma un nuevo enlace covalente irreversiblemente, y la proporción relativa de los productos finales depende de la diferencia de energía entre los estados de transición, en definitiva, de la velocidad de su formación. A diferencia de esta, la química covalente dinámica (DCC) permite la formación reversible de enlaces covalentes. Si el proceso es lo suficientemente rápido se originan productos bajo control termodinámico cuya proporción depende solo de la estabilidad relativa de los mismos.<sup>11</sup>

Dentro de las reacciones que forman parte de la DCC, podemos encontrar reacciones de condensación reversible entre dos moléculas para generar un nuevo

producto, en donde se libera una pequeña molécula (por ejemplo, agua), como en las reacciones de formación de enlaces imina y disulfuro. Otro tipo de reacciones son las de intercambios directos, cuando productos iniciales y finales presentan el mismo tipo de enlace covalente, como ocurre en reacciones de transesterificación o transiminación.<sup>6</sup>

El enlace imina  $RR_1C=NR_2$  (**Figura 2**) se ha utilizado profusamente en DCC porque se pueden obtener productos bajo control termodinámico cinéticamente inertes en un corto período de tiempo. Se originan por condensación reversible entre una amina y un compuesto carbonílico. Se forma un nuevo enlace  $C=N$  intra o intermolecular, en condiciones azeotrópicas y/o con catálisis ácida y se elimina una molécula de agua. Por contar con un doble enlace presentan isomería E/Z, siendo generalmente más estable el isómero E.<sup>12</sup> Además, pueden experimentar otras transformaciones como las reacciones de intercambio del grupo R (transiminación) o la metátesis.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Enlace imina,  $R_1R_2C=NR_3$ , ( $R_{1-3}$  = arilo, alquilo o H) y su mecanismo de reacción.

Otros grupos funcionales muy relacionados con las iminas son las hidrazonas ( $R_1R_2=NNHR_3$ ) y las oximas ( $R_1R_2=NOH$ ) que muestran una reactividad análoga a estas y experimentan las mismas reacciones de hidrólisis, intercambio y metátesis bajo catálisis ácida.<sup>13</sup> Ambas son consideradas cinéticamente inertes en condiciones neutras y en agua pura por el menor carácter electrófilo del enlace  $C=N$  a causa de un efecto mesomérico del heteroátomo en posición  $\alpha$ . Por ello, son compuestos de interés para la síntesis de MIMs para su aplicación en medicina, materiales inteligentes y en catálisis.<sup>12</sup>

#### 1.4. Receptores supramoleculares de iones

Los aniones se encuentran en todos los sistemas biológicos, en donde desempeñan un papel importante en una amplia gama de procesos químicos y biológicos. Se encargan desde el transporte de la información genética hasta de la

regulación de la actividad enzimática.<sup>14</sup> Sin embargo, pueden tener efectos nocivos tanto en el medio ambiente como en la salud humana. Todo ello justifica la demanda de quimiorreceptores para la detección selectiva y el reconocimiento de aniones biológicamente importantes.<sup>15, 16</sup>

Algunos de los aniones más importantes en biología son el fluoruro, que se considera esencial para el crecimiento de huesos y dientes pero es tóxico en dosis superiores a 1 ppm y puede causar fluorosis y disfunción del estómago o riñón; o el cloruro que mantiene el balance electrolítico pero que a niveles altos indica una regulación deficiente de su transporte lo que está relacionado con enfermedades como la fibrosis quística. Otros aniones biológicamente significativos son el yoduro, esencial para la biosíntesis de hormonas por parte de la glándula tiroides, así como el anión bicarbonato que es responsable de regular el pH en el cuerpo.<sup>17</sup>

No obstante, no ha sido hasta hace pocos años cuando el desarrollo de estos receptores de iones ha adquirido una cierta importancia dentro de la química *host-guest*.<sup>14,16</sup> El estudio de receptores de aniones sigue siendo un desafío ya que los aniones son más grandes que los cationes isoelectrónicos. Por lo tanto, tienen una relación carga-radio más baja, de modo que la unión electrostática anión-receptor es menos efectiva. Además, los aniones tienen una amplia gama de geometrías, son sensibles al pH y están fuertemente solvatados por solventes polares, lo que resulta en una mayor complejidad en el diseño y la síntesis de los receptores.<sup>15,17</sup>

Generalmente, para la detección cuantitativa de iones se utilizan métodos de cromatografía o electrodos selectivos de iones, entre otros, pero son procesos costosos y complicados y no se pueden utilizar para la detección *in situ* y en células vivas.<sup>16,18</sup> Por otra parte, el uso de moléculas orgánicas con unidades cromogénicas o fluorescentes de señalización han mostrado características adecuadas para la detección óptica *in vivo* e *in situ*, siendo fáciles de manipular y con bajos límites de detección.<sup>18</sup>

La complejación de aniones implica interacciones supramoleculares reversibles, como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones anión- $\pi$  y enlaces de halógeno, incluidas combinaciones binarias o terciarias, entre un receptor bien adaptado y el anión. En comparación con los receptores acíclicos, los receptores de aniones macrocíclicos permiten mejorar la eficiencia de unión y la selectividad debido al efecto macrocíclico. Así, estudios recientes muestran distintos macrociclos capaces

de complejar iones: calix[4]pirroles, calix[n]arenos, pillar[n]arenos y ciclofanos).<sup>18</sup> Los motivos estructurales más empleados son aquellos que soportan enlaces de hidrógeno Y-H...X (Y = O, N, etc; X = anión). Por otro lado, estos enlaces de hidrógeno pueden complementarse con otro tipo de interacción utilizando sistemas  $\pi$  y establecer un enlace de hidrógeno tipo [X-H...  $\pi$ ]. Por tanto, se buscan macrociclos capaces de interactuar con aniones a través de diferentes tipos de interacciones no covalentes simultáneamente, para dar lugar a receptores artificiales altamente selectivos y sensibles capaces de detectar aniones en medios acuosos y biológicos.<sup>17</sup>

Uno de los fragmentos más ampliamente utilizados en el diseño de receptores y sensores de aniones son las amidas y las ureas, que puede establecer interacciones complementarias de enlaces de hidrógeno con oxoaniones en forma de Y, como los carboxilatos.<sup>19</sup> Otros grupos empleados son las aminas, pirroles y bases orgánicas de Schiff.<sup>16,20</sup> Sin embargo, dentro de los grupos dadores de enlaces de H, destacan las iminas y, en especial, las hidrazonas ( $R_1R_2=NNHR_3$ ) que han mostrado ser buenos grupos complejantes de  $F^-$ ,  $AcO^-$ ,  $H_2PO_4^-$  y  $Cl^-$ , complejación que suele ir acompañada de un cambio de color.<sup>14</sup>

Recientemente, Hao y colaboradores han desarrollado mediante una condensación de hidrazonas en medio acuoso un sistema que permite la encapsulación simultánea de dos aniones, tanto en medio orgánico como en estado sólido (**Figura 3**). Este receptor hexacatiónico con forma de cápsula está formado por tres “brazos” biscatiónicos y presenta un total de doce dadores de enlace de hidrógeno (3 enlaces NH y 9 CH), permitiendo el reconocimiento selectivo de parejas de aniones, como  $Cl^- \cdot NO_3^-$ ,  $Cl^- \cdot Br^-$  y  $Cl^- \cdot Cl^-$ .<sup>21</sup>

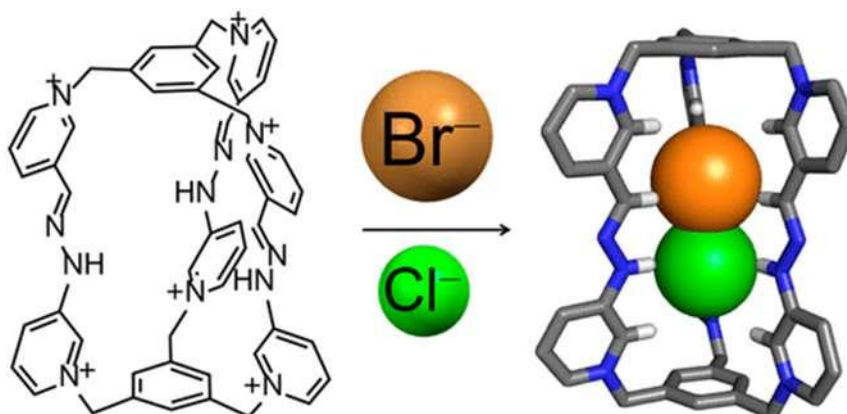
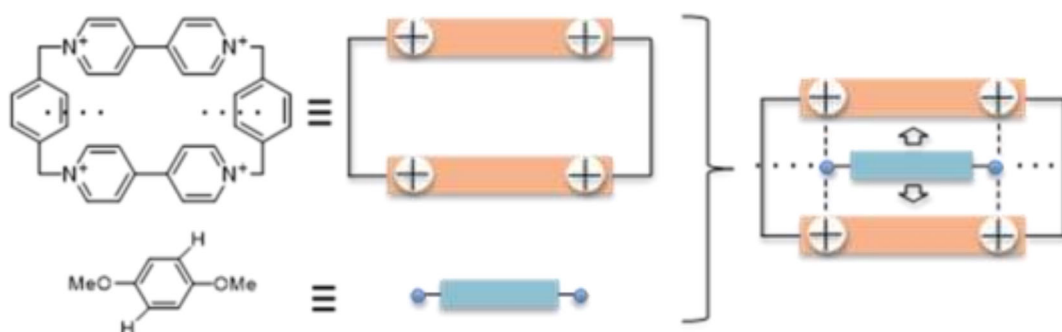


Figura 3. Receptor hexacatiónico desarrollado por Hao et al.<sup>21</sup>

### 1.5. Antecedentes: los ciclofanos *blue box*, *white box* y *red box*

Una de las moléculas cíclicas más estudiadas como receptor, tanto de iones como de moléculas orgánicas, es el ciclofano ciclobis(paraquat-*p*-fenileno) o *blue box* ( $\mathbf{BB}^{4+}$ ) desarrollada por Stoddart y colaboradores. Es un macrociclo tetracatiónico formado por dos unidades de 4,4'-bipiridinio unidas a través de grupos *p*-xileno formando una cavidad hidrofóbica (**Figura 4**). Las unidades de bipiridinio aportan a la estructura rigidez estructural y un carácter  $\pi$ -deficiente que le permite reconocer sustratos  $\pi$ -excedentes de pequeño/mediano tamaño. En medio orgánico, además interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el sustrato, los complejos se ven estabilizados por enlaces de hidrógeno [C-H $\cdots\pi$ ]. En cambio, en medio acuoso, el efecto hidrofóbico es la interacción no covalente predominante en la asociación receptor-sustrato, a mayores de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y [C-H $\cdots\pi$ ].<sup>22,23</sup> Además, la fuerza aceptora del macrociclo se puede controlar de forma reversible gracias a la existencia de un equilibrio redox (*redox-switchable ligands*), por la reducción de las unidades bipiridinio, que conduce a la formación de un catión radical estabilizado de color azul intenso, el cual da nombre al receptor.<sup>24</sup>



**Figura 4.** Representación esquemática del *cyclobis paraquat-p-phenylene* como receptor.<sup>21</sup>

Sin embargo, la síntesis de estos macrociclos se lleva a cabo típicamente mediante ciclaciones bajo control cinético, con muchas etapas irreversibles y bajos rendimientos; típicos de la química covalente tradicional. Además, la construcción de sistemas con autoensamblaje predecible en agua sigue siendo un gran desafío para la química supramolecular, ya que las interacciones no covalentes direccionales, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones donante-aceptor, se interrumpen principalmente debido al efecto dominante del agua en los procesos de asociación.<sup>22</sup>

Para mejorar en parte algunos de estos inconvenientes en la síntesis de receptores, se puede emplear la química covalente dinámica basada en hidrazona bajo



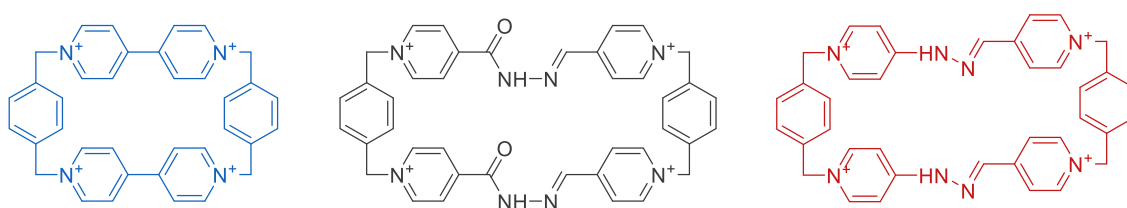
control termodinámico. De esta forma, se pueden obtener compuestos enlaces imínicos altamente conjugados de una forma sencilla y efectiva. La presencia del enlace hidrazona aporta propiedades ventajosas, ya que las hidrazonas son sensibles al pH, modulables, estables y con elevada diversidad funcional, por lo que presentan las características ideales para su uso como receptores moleculares.<sup>12</sup>

En esta línea de trabajo, el grupo QUIMOLMAT-Supra ha desarrollado recientemente análogos de la *blue box* cuya síntesis es más sencilla, eficiente y económica, y que, a diferencia de esta, presentan un carácter dinámico, por poseer un enlace imina.<sup>25</sup> En el año 2018, se sintetizó un primer análogo de la *blue box*, la *white box* (**WB**<sup>4+</sup>) mediante enlaces reversibles acil hidrazona en agua, a partir de una mezcla equimolar de dos moléculas complementarias de bis(piridinio)xilileno, bajo catálisis ácida, haciendo uso de un exceso de 2,7-dihidroxi-naftaleno (2,7-DHN) como *template*. Aplicando esta metodología puede controlarse el autoensamblaje de la *white box* mediante control termodinámico sobre la formación/disociación de los enlaces C=N. Al igual que la *blue box*, reconoce moléculas  $\pi$ -excedentes gracias a interacciones hidrofóbicas,  $\pi$ - $\pi$  y [C-H $\cdots\pi$ ] y, especialmente, destaca por su capacidad de reconocer hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), contaminantes hidrofóbicos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, muy tóxicos y persistentes en el medio ambiente. Además, presenta una gran sensibilidad al pH como consecuencia de la elevada conjugación de los enlaces acil hidrazona, que resulta en un mayor carácter ácido de los protones amida ( $pK_a \sim 7$ ).

Como consecuencia de esta dependencia del pH y debido a la existencia de isomerismo rotacional en condiciones ácidas, en donde tres rotámeros se encuentran en equilibrio, el macrociclo presenta un comportamiento dual como receptor molecular: en condiciones neutras/básicas desaparece la isomería rotacional de los grupos amida debido a la deslocalización de dos cargas negativas generadas en los anillos de piridinio (**WB**<sup>2+</sup>), y el macrociclo se comporta como un receptor rígido que reconoce sustratos mediante un modelo cercano al de llave-cerradura. En cambio, en condiciones ácidas, presenta isomería rotacional, es flexible y sigue el modelo de ajuste inducido en los proceso *host-guest*.<sup>26</sup>

En el año 2019, se sintetizó un nuevo análogo dihidrazona de la *white box*, la *red box* (**RB**<sup>4+</sup>), mediante una reacción de catálisis ácida bajo control cinético en agua sin

*template*. Este macrociclo presenta una mayor estabilidad en agua frente a la hidrólisis del receptor debido a la mayor deslocalización de carga en los anillos de piridinio, al eliminarse los grupos carbonilos existentes en la *white box* (**Figura 5**). Este análogo destaca por su gran estabilidad hidrolítica y su sensibilidad al pH. En medio acuoso, compleja sustratos  $\pi$ -excedentes tanto en su forma básica como ácida ( $pK_a = 8.3$ ). Pero, en medio orgánico, se comporta como un interruptor supramolecular, gracias a la protonación-desprotonación de los hidrógenos imina. Por ello solo puede complejar sustratos en su forma ácida, por la mayor densidad de carga electrónica existente en la base conjugada del *host* y la desaparición del efecto hidrofóbico.



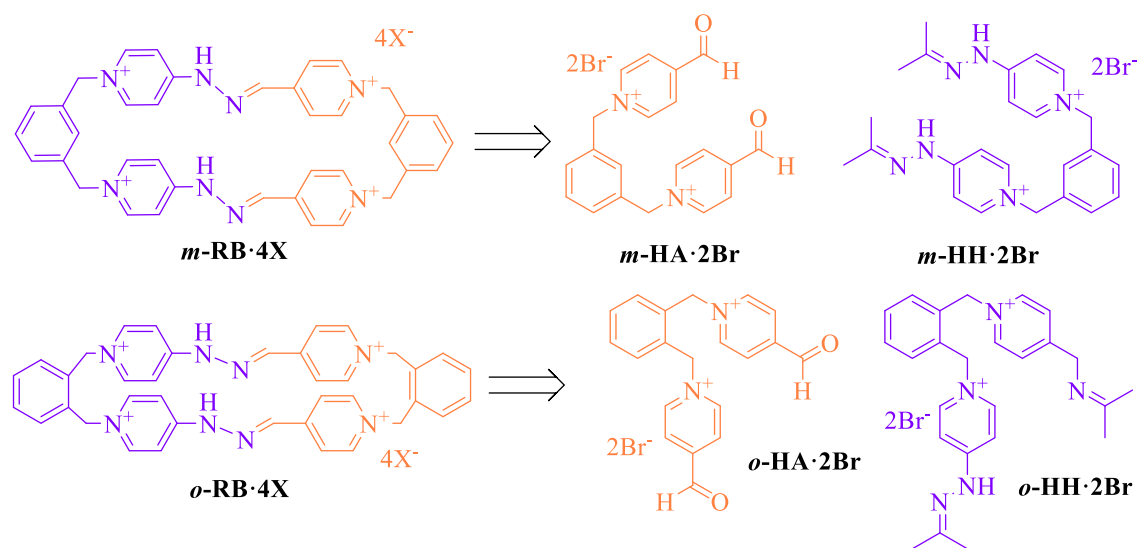
**Figura 5. Estructuras de la *blue box*, *white box* y *red box*, respectivamente.**

Por consiguiente, tanto la *white box* como la *red box* son análogos de la *blue box* más fáciles de preparar, con un menor coste económico, fáciles de funcionalizar y que complejan moléculas aromáticas  $\pi$ -excedentes con mayor o menor fortaleza en función del pH. Así, estos compuestos poseen un potencial muy adecuado como vehículos para fármacos hidrofóbicos o aniónicos facilitando el desarrollo de nuevos productos antitumorales o en catálisis supramolecular.<sup>27</sup>

De este modo, es de especial interés el diseño de receptores capaces de reconocer diferentes aniones, cuya unión no necesariamente se puede anticipar en función de los efectos puramente electrostáticos. En vista del potencial uso de los derivados de urea e hidrazona como sensores de aniones, y en base a los resultados de Hao *et al.* sobre el reconocimiento de aniones con macrociclos catiónicos con hidrazonas, se decide estudiar la capacidad de nuevos macrociclos catiónicos de hidrazonas para reconocer aniones en medios orgánicos, con potenciales aplicaciones de uso en los campos de sensores de aniones, catalizadores de transferencia de fase, electrodos selectivos de aniones, etc.<sup>14</sup>

## 2. OBJETIVOS

De acuerdo a lo expuesto en la introducción, siguiendo con la línea de investigación del grupo QUIMOLMAT-Supra para la síntesis de receptores moleculares de interés derivados de la *blue box*, el objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster es la síntesis de nuevos macrociclos análogos a la *red box*, en donde se disminuye la distancia entre los lados largos del receptor y, por ende, el tamaño de su cavidad (**Esquema 1**). Además, se estudia la formación de complejos de inclusión con sustratos aromáticos e iones de interés.



**Esquema 1. Retrosíntesis de los compuestos objetivo *m-RB·4X* y *o-RB·4X*.**

En concreto, los objetivos específicos del trabajo son:

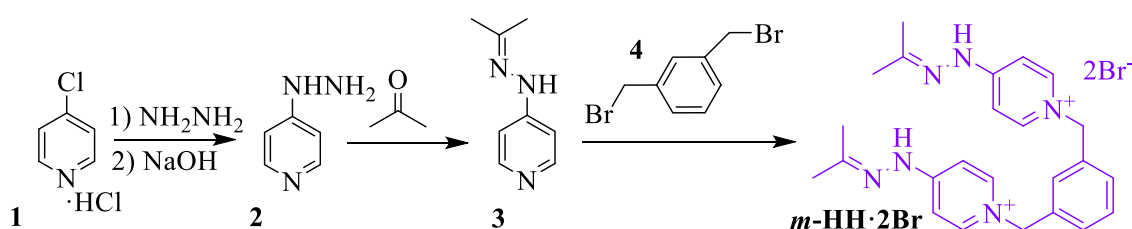
- Síntesis de los *bloques de construcción meta-dihidrazona* ( $m\text{-HH}^{2+}$ ), *meta-dialdehído* ( $m\text{-HA}^{2+}$ ), *orto-dihidrazona* ( $o\text{-HH}^{2+}$ ) y *orto-dialdehído* ( $o\text{-HA}^{2+}$ ), mediante reacciones de sustitución nucleófila.
- Ensamblaje de los análogos de menor tamaño del macrociclo *red box* ( $\text{RB}^{4+}$ ), *meta-red box* ( $m\text{-RB}^{4+}$ ) y *orto-red box* ( $o\text{-RB}^{4+}$ ), a través DCC de iminas.
- Caracterización estructural de todos los compuestos obtenidos haciendo uso de las técnicas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN mono y bidimensionales y espectrometría de masas.
- Estudio de los complejos de inclusión de los macrociclos  $m\text{-RB}^{4+}$  y  $o\text{-RB}^{4+}$  con un sustrato aromático, el 1,5-dihidroxi-naftaleno (1,5-DHN) en medio acuoso, a través de valoraciones de  $^1\text{H}$  RMN.
- Estudio de la respuesta de  $o\text{-RB}^{4+}$  en medio orgánico ante el ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), mediante valoraciones de  $^1\text{H}$  RMN y espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Síntesis y caracterización de los *bloques de construcción*

De acuerdo con el **Esquema 1**, se plantea la síntesis de los receptores macrocíclicos propuestos mediante una reacción de condensación en medio acuoso ácido de *bloques de construcción* de geometría adecuada ( $m\text{-RB}^{4+}:(m\text{-HH}^{2+} + m\text{-HA}^{2+})$ ;  $o\text{-RB}^{4+}:(o\text{-HH}^{2+} + o\text{-HA}^{2+})$ ). A continuación, se discute la síntesis y elucidación estructural de los *bloques de construcción*.

##### 3.1.1. Síntesis de la *meta*-dihidrazona ( $m\text{-HH}\cdot 2\text{Br}$ )



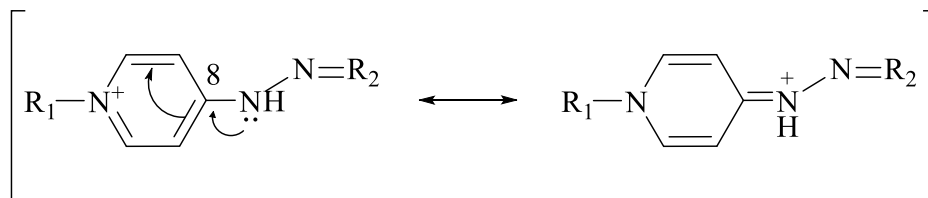
**Esquema 2.** Síntesis de la *meta*-dihidrazona  $m\text{-HH}\cdot 2\text{Br}$ .

En el **Esquema 2** se muestra la síntesis de  $m\text{-HH}^{2+}$  a partir del compuesto comercial cloruro de 4-cloropiridinio **1**, que mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática ( $S_NAr$ ) con hidrazina en propanol a ebullición, origina la hidrazina  $2\cdot 2\text{HCl}$ .

Así, la base libre **2** es obtenida con NaOH (3M) y extracción con acetato de etilo (AcOEt) de la fase acuosa resultante justo antes de su utilización en la siguiente etapa de reacción. Previamente a la reacción de sustitución nucleófila para obtener  $m\text{-HH}^{2+}$ , es fundamental la protección del nitrógeno del grupo amino para que la alquilación se produzca en el nitrógeno de la piridina. La protección se realiza *in situ*, por calentamiento de **2** en acetona. El empleo de acetona se justifica porque no va a interferir en la reacción de ensamblaje del macrociclo, produciéndose esta mediante una transiminación.

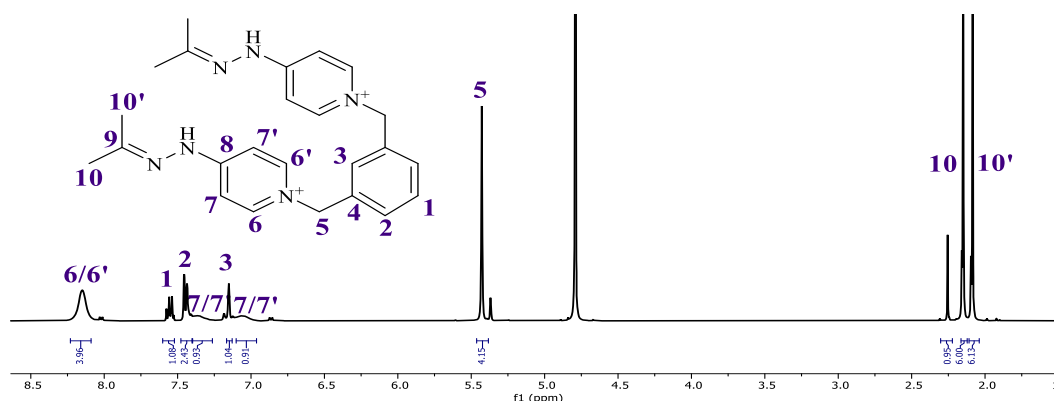
De esta forma, se obtiene la hidrazona **3** que impide la posible formación posterior de productos secundarios por polialquilación del compuesto. A continuación, se añade  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xileno comercial **4** al medio, y se produce la alquilación del nitrógeno del anillo piridinico, formándose la dihidrazona  $m\text{-HH}\cdot 2\text{Br}$ , que se obtiene virtualmente pura con un rendimiento del 85 %.

La estructura de  $m\text{-HH}^{2+}$  se determinó mediante  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN y espectrometría de masas, al igual que el resto de compuestos que no han sido reportados. A la hora de la elucidación estructural de  $m\text{-HH}^{2+}$  mediante  $^1\text{H}$  RMN hay que considerar que en el espectro en  $\text{D}_2\text{O}$  no aparecerán los hidrógenos del grupo amino de la hidrazona y que hay rotación impedida en torno al enlace  $\text{C}_8\text{-N}$  (**Figura 6**).



**Figura 6. Representación de dos formas resonantes para los grupos hidrazona.**

Al analizar el espectro  $^1\text{H}$  RMN de  $m\text{-HH}^{2+}$  (**Figura 7**), se identifican dos singuletes, que integran por 6H, y se corresponden con los Hs de los grupos metilo de la hidrazona no equivalentes ( $\text{H}_{10}$  y  $\text{H}_{10}'$ ), y un singulete, que integra por 4H, y que se identifica con los Hs del grupo metileno ( $\text{H}_5$ ). En la zona de los protones aromáticos, se encuentran varias señales correspondientes con los Hs del fenilo: un singulete, que integra por uno y que se corresponde con el H situado entre las sustituciones en *meta* ( $\text{H}_3$ ); un doble doblete, que integra por dos ( $\text{H}_2$ ) y un doble triplete, que integra por uno ( $\text{H}_1$ ). Además, debido al efecto de rotación restringida comentado anteriormente, los hidrógenos en  $\alpha$  y  $\beta$  en el anillo pirídínico no se muestran como dobletes, si no que aparecen como singuletes anchos de poca intensidad, en una situación de coalescencia en la escala de tiempos de RMN. Esto se justifica por la existencia de una carga positiva en el N piridínico que retira densidad electrónica. Por tanto, la señal más desapantallada, la única que aparece claramente en el espectro, se corresponde con los Hs en posición  $\alpha$  al N ( $\text{H}_6$ ). Del mismo modo, la señal más apantallada, prácticamente en completa coalescencia, sería la de los Hs en  $\beta$  al N, aparece desdoblada ( $\text{H}_7$  y  $\text{H}_7'$ ).



**Figura 7. Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) de  $m\text{-HH}^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.**

En lo referido al espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN, se observan 9 señales diferentes, seis aromáticas y tres alifáticas. Las señales alifáticas se identifican fácilmente haciendo uso del espectro DEPT (**Figura 8**). El carbono terciario que aparece a  $\sim 61$  ppm se identifica con los carbonos secundarios de los grupos metilénicos ( $\text{C}_5$ ). Además, podemos identificar los Cs de los grupos metilo de la hidrazona no equivalentes, a  $\sim 15$  y  $\sim 25$  ppm ( $\text{C}_{10}$  y  $\text{C}_{10'}$ ). En la zona aromática, se identifican los carbonos secundarios del grupo fenilo,  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_3$ . El resto de las señales observadas, que no se ven en el espectro DEPT, son carbonos cuaternarios. Los Cs en  $\alpha$  y  $\beta$  al grupo N no se observan debido a la baja intensidad de sus señales. Para corroborar la asignación de las señales se usan los espectros bidimensionales HSQC y HMBC (ver *Anexos*). Además, se caracterizó a  $m\text{-HH}^{2+}$  mediante espectrometría de masas de ionización por *electrospray* de alta resolución (HR-ESI-MS). En el espectro (ver *Anexos*), se encontraron dos picos de masa exacta del ion  $[\text{M}]^{2+}$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6^{2+}$ ) a 201.1260 m/z y  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ ) a 401.2499 m/z, calcd. para ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6^{2+}$ ) a 201.1261 m/z y ( $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ ) a 401.2499 m/z.

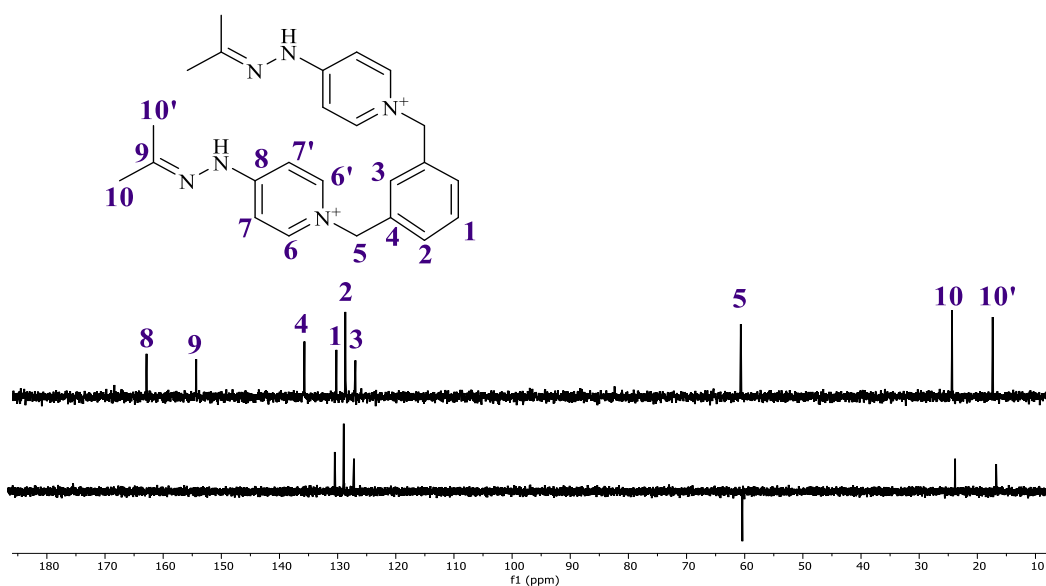
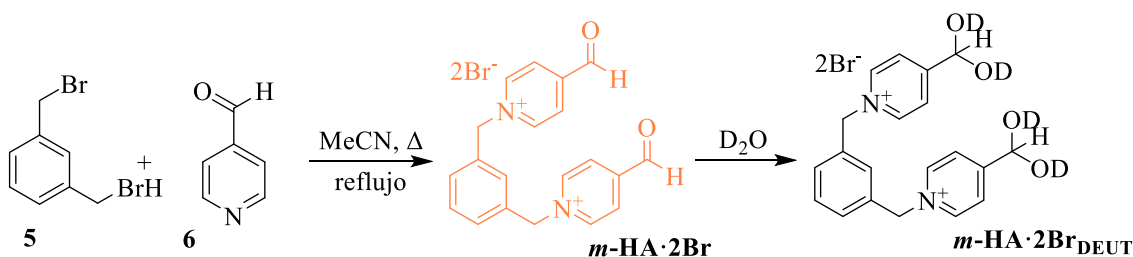


Figura 8. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN/DEPT ( $\text{D}_2\text{O}$ , 101 MHz) de  $m\text{-HH}^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.

### 3.1.2. Síntesis del *meta*-dialdehido ( $m\text{-HA}\cdot 2\text{Br}$ )

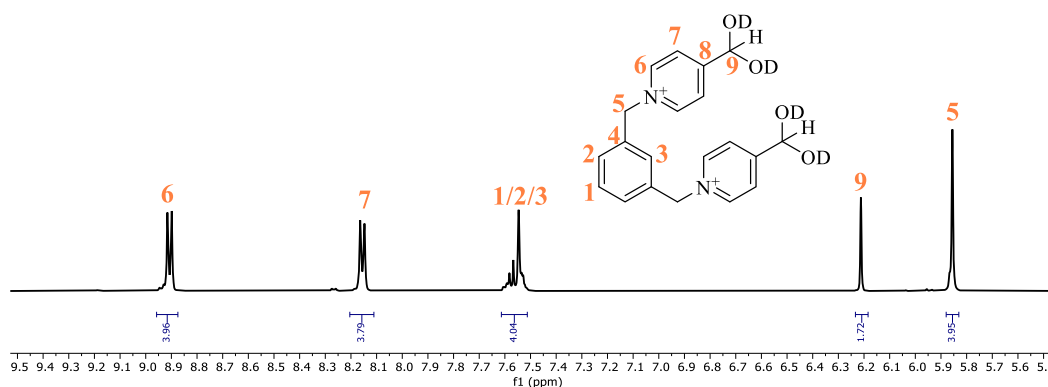


Esquema 3. Síntesis de  $m\text{-HA}\cdot 2\text{Br}$  y equilibrio aldehído-glicol observado en  $\text{D}_2\text{O}$ .

La síntesis de *m*-HA·2Br es una reacción de sustitución nucleófila biomolecular ( $S_N2$ ) entre 4-piridincarboxialdehído **6** y  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xileno **5** en acetonitrilo a ebullición (**Esquema 3**). Esta se favorece en un disolvente polar aprótico como el acetonitrilo, precipitando la sal de piridinio con un 73 % de rendimiento, virtualmente pura en el medio de reacción.

La caracterización completa del compuesto como el esperado se lleva a cabo mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN mono y bidimensional, ya que el compuesto no ha sido previamente reportado. Ha de considerarse que la disolución de *m*-HA $^{2+}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  da como resultado la formación del hidrato muy estable por efecto aceptor de electrones de los grupos piridinio, por lo que el equilibrio hidrato-aldehído existente en los compuestos carbonílicos disueltos en medio acuoso, está completamente desplazado a la formación del hidrato.

De este modo, en la **Figura 9** se pueden observar dos singuletes en la zona alifática, que integran por 4H y que se corresponden con los  $\text{H}_5$  metilénicos y  $\text{H}_9$  resultado de la hidratación del carbonilo, que integran por 4H y por 2H respectivamente. En la zona aromática, se aprecian tres señales aromáticas: el multiplete más desapantallado se identifica con la señal de los H del fenilo ( $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$ ). Los dos dobletes restantes, que integran por 4H, se corresponden con los H en  $\beta$  y  $\alpha$  al N piridínico ( $\text{H}_7$  y  $\text{H}_6$ ). El doblete más desapantallado, se identifica con los protones en  $\alpha$  ( $\text{H}_6$ ), debido a que se encuentran más próximo al nitrógeno y sufrirán más el efecto de la carga parcial positiva.



**Figura 9.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) de *m*-HA $^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.

A continuación, se identifican las señales de los carbonos, haciendo uso del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT (**Figura 10**). En la zona de los carbonos alifáticos se observan dos señales, la señal del carbono terciario del grupo metileno unido al

nitrógeno (C<sub>5</sub>) y la del carbono terciario del diol (C<sub>9</sub>), más desapantallada. Las restantes señales se identifican como carbonos aromáticos. Las señales C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>, son carbonos secundarios unidos a H del grupo fenilo; mientras que las señales C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub>, también unidas a H, se identifican con los carbonos secundarios del anillo piridínico, siendo la señal más desapantallada la del carbono en posición  $\alpha$  al N. Finalmente, las señales que no aparecen en el espectro DEPT se corresponden con carbonos cuaternarios (C<sub>4</sub> y C<sub>8</sub>). Una vez identificados los núcleos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de *m*-HA<sup>2+</sup> en base al correspondiente espectro de RMN monodimensional, se asignan los núcleos usando RMN bidimensionales más complejos, que ayudan a corroborar la elucidación basada en los experimentos monodimensionales (ver *Anexos*).

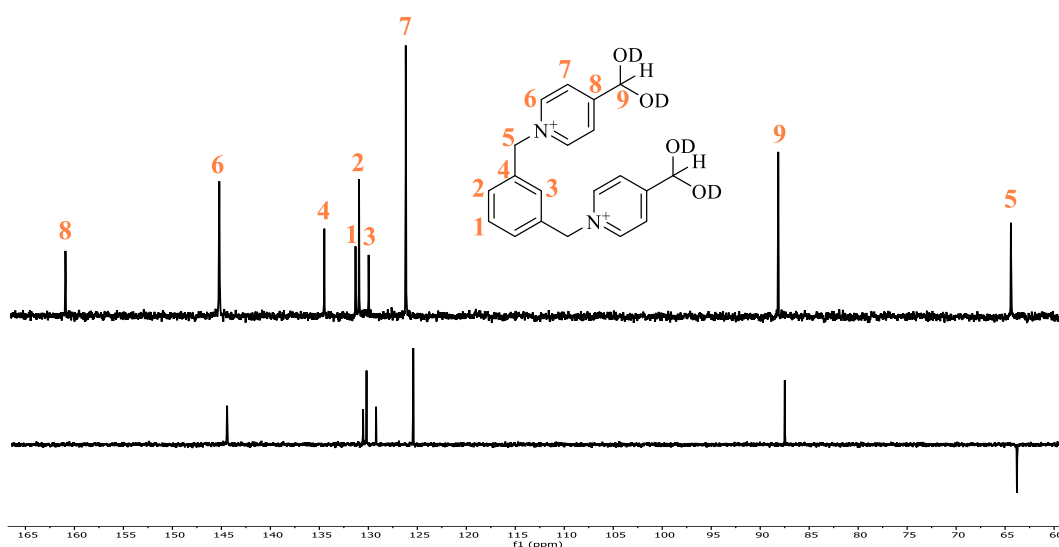
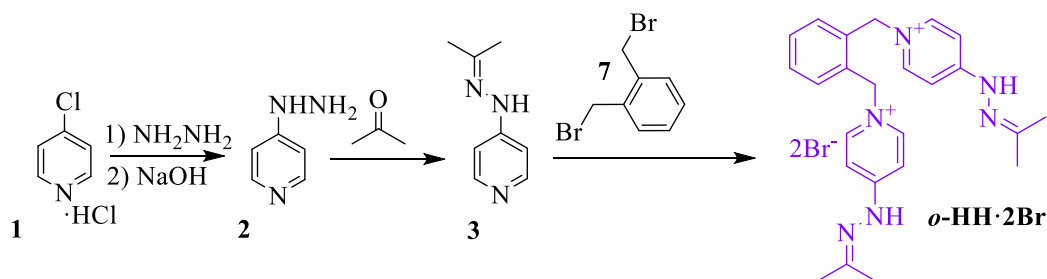


Figura 10. Espectro <sup>13</sup>C RMN/DEPT (D<sub>2</sub>O, 101 MHz) de *m*-HA<sup>2+</sup>, con asignación numérica de las señales.

Asimismo, se caracterizó a *m*-HA<sup>2+</sup> mediante HR-ESI-MS (ver *Anexos*). Se observan dos picos de masa exacta del ion [M+2Me]<sup>2+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>) a 191.0940 m/z y [M+Br]<sup>+</sup> (C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>) a 461.1070 m/z, calcd. para (C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>) a 191.0941 m/z y (C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>) a 461.1071 m/z.

### 3.1.3. Síntesis de la *orto*-dihidrazona (*o*-HH·2Br)

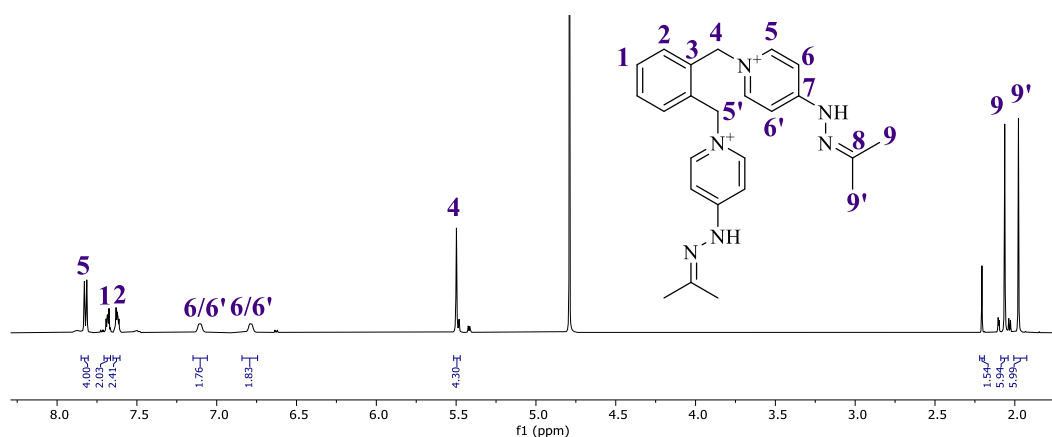


Esquema 4. Síntesis de la *orto*-dihidrazona, *o*-HH·2Br.



La síntesis del componente *orto*-dihidrazona ***o*-HH**·2Br es similar a la de su análogo *meta*-dihidrazona, pero el producto se encuentra sustituido en *orto* (**Esquema 4**). Se parte del producto comercial cloruro de 4-cloropiridinio **1**, que reacciona con hidrazina a través de una reacción  $S_NAr$  para dar lugar al diclorhidrato de **2**·2Cl. Igualmente, se protege al grupo amino de la hidracina con acetona para que el ataque nucleófilo se lleve a cabo con el nitrógeno de la piridina. Una vez protegido (formada la hidrazona), se hace reaccionar con  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno **7**, mediante el ataque nucleófilo del nitrógeno de la piridina ( $S_N2$ ) a los carbonos electrófilos, quedando bromuros como contraiones en el producto final, que precipita en el medio de reacción virtualmente puro en un rendimiento del 87 %.

La obtención de ***o*-HH**<sup>2+</sup> se corrobora mediante el espectro <sup>1</sup>H RMN el cual se corresponde con el esperado para este compuesto (**Figura 11**). Se identifican tres señales a menor desplazamiento, que se corresponden con las señales de los Hs de los grupos metilo de la hidrazona no equivalentes (H<sub>9</sub> y H<sub>9'</sub>), que integran por 6 y se ven como dos singuletes, y un singulete a ~5.5 ppm, que se identifican con los hidrógenos metilénicos (H<sub>4</sub>) y que integra por 4H. En la región aromática, en base a la multiplicidad y a cómo afecta en el desplazamiento la presencia del N en el anillo de piridinio, se observa el doblete a mayor desplazamiento que se corresponde con los H en  $\alpha$  al nitrógeno del anillo (H<sub>5</sub>). A continuación, se observan dos multipletes que corresponden a los H del anillo fenilénico (H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>) y, a menor desplazamiento, se observan dos singuletes anchos y de poca intensidad que se identifican con los Hs en  $\beta$  al N del anillo (H<sub>6</sub> y H<sub>6'</sub>).<sup>25</sup>



**Figura 11.** Espectro <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de ***o*-HH**<sup>2+</sup>, con asignación numérica de las señales.

En cuanto al espectro de <sup>13</sup>C RMN (**Figura 12**), se observan las mismas señales que el caso del discutido para ***m*-HH**<sup>2+</sup>, salvo que aquí se observan las propias de los Cs

secundarios en posición  $\alpha$  y  $\beta$  al N del anillo piridínico ( $C_5$  y  $C_6$ ), ambos con señal en el espectro DEPT. Igualmente, para corroborar la asignación de las señales, se emplean los espectros HSQC y HMBC (ver *Anexos*).

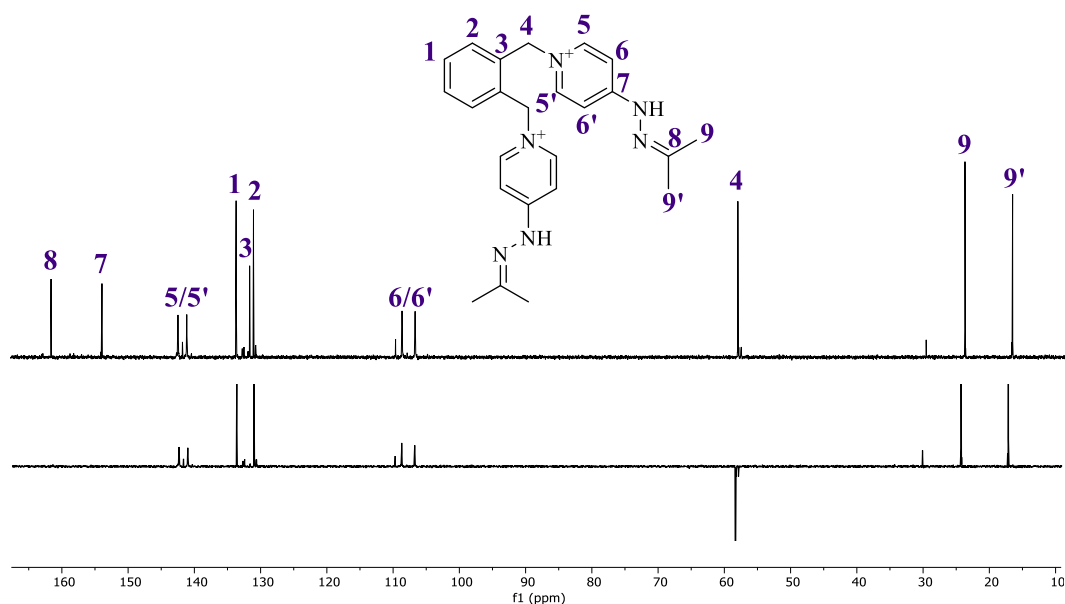
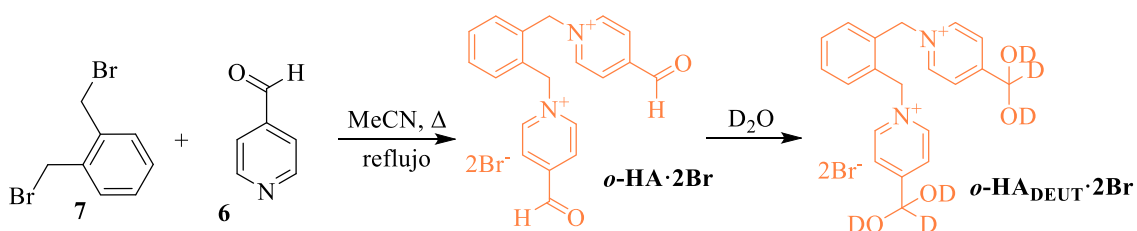


Figura 12. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN/DEPT ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz) de  $o\text{-HH}^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.

También, se realizó el espectro de masas (HR-ESI-MS) (ver *Anexos*), en donde se pueden ver dos picos de masa exacta del ion  $[\text{M}]^{2+}$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6^{2+}$ ) a 201.1260 m/z y  $[\text{M}]^+$  ( $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ ) a 401.2499 m/z, calculado para ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6^{2+}$ ) a 201.1261 m/z y ( $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ ) a 401.2499 m/z.

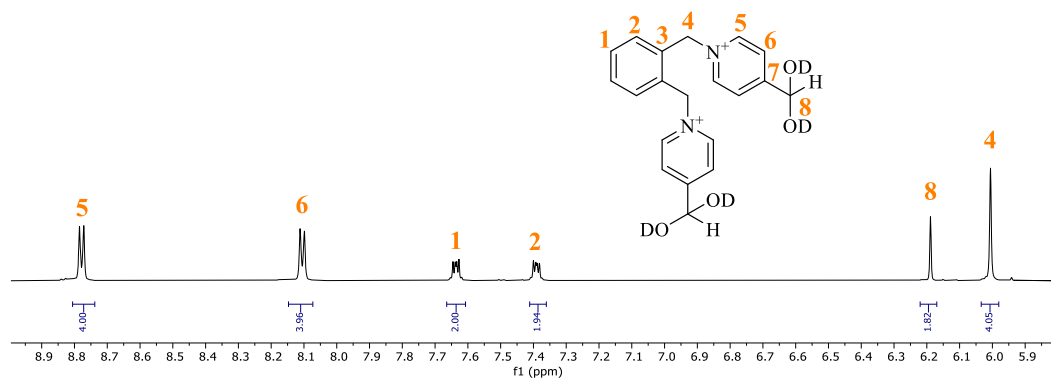
### 3.1.4. Síntesis del *orto*-dialdehído ( $o\text{-HA}\cdot 2\text{Br}$ )



Esquema 5. Reacción de síntesis de  $o\text{-HA}\cdot 2\text{Br}$ .

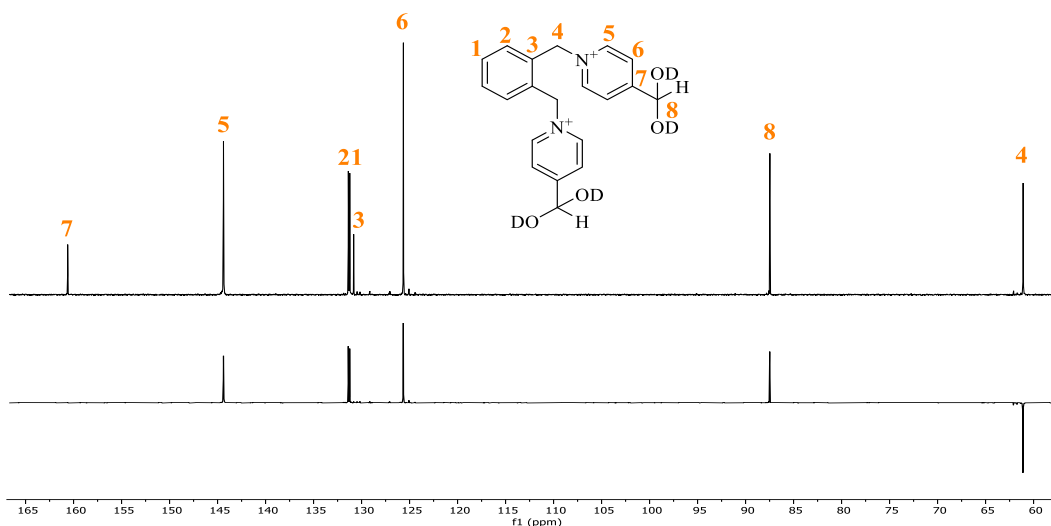
El *orto*-dialdehído  $o\text{-HA}\cdot 2\text{Br}$  se sintetiza del mismo modo que su homólogo  $m\text{-HH}\cdot 2\text{Br}$ , pero partiendo de  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno en vez de  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xileno, mediante una reacción de tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  por el ataque del nitrógeno del 4-piridincarboxialdehído **6** a las posiciones bencílicas del  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*o*-xileno **7** (Esquema 5). Se obtiene así el producto, que precipita con una alta pureza en el medio de reacción, con un rendimiento del 82 %.

En el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de  $o\text{-HA}^{2+}$  se observan 6 señales (**Figura 13**). Las 2 señales más apantalladas se corresponden con los Hs de los grupos metilénicos ( $\text{H}_4$ ) y con el H del hidrato, ya que al igual que en el caso anterior debido a la elevada electrofilia del grupo carbonilo, en medio acuoso ( $\text{D}_2\text{O}$ ) el compuesto se encuentra hidratado. Las 4 señales restantes, en la zona aromática, son dos multipletes a  $\sim 7.4$  ( $\text{H}_2$ ) y  $\sim 7.6$  ppm ( $\text{H}_1$ ), que se corresponde con los Hs del fenilo. Finalmente, las señales más desapantalladas, son los Hs en  $\beta$  y en  $\alpha$  al N piridínico ( $\text{H}_6$  y  $\text{H}_5$ , respectivamente).



**Figura 13.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $o\text{-HA}^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.

Además, se asignan las señales de los carbonos de la molécula haciendo uso del espectro  $^{13}\text{C}$  RMN y DEPT (**Figura 14**), en donde se pueden identificar las mismas señales que en el caso de  $m\text{-HA}^{2+}$ . Cabe señalar las señales los C secundarios en posición  $\alpha$  y  $\beta$  al N piridínico ( $\text{C}_5$  y  $\text{C}_6$ ) y la señal del C del hidrato a  $\sim 87$  ppm.



**Figura 14.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN/DEPT ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz) de  $o\text{-HA}^{2+}$ , con asignación numérica de las señales.

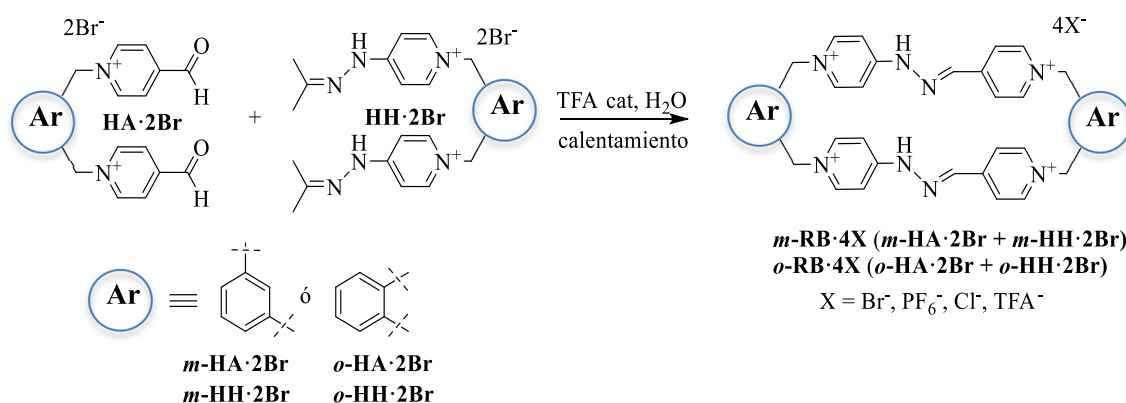
Adicionalmente, se caracteriza a  $o\text{-HA}^{2+}$  mediante la técnica HR-ESI-MS. En el espectro (ver *Anexos*) se observan dos picos de masa exacta del ion  $[\text{M}+2\text{Me}]^{2+}$

( $C_{22}H_{36}N_2O_4^{2+}$ ) a 191.0940 m/z y  $[M+Br]^+$  ( $C_{24}H_{29}N_6^+$ ) a 461.1070 m/z, calcd. para ( $C_{22}H_{36}N_2O_4^{2+}$ ) a 191.0941 m/z y ( $C_{24}H_{29}N_6^+$ ) a 461.1071 m/z.

### 3.2. Síntesis y caracterización de los macrociclos

Una vez obtenidos los *bloques de construcción*, se lleva a cabo la síntesis de los macrociclos *meta-red box* ( $m\text{-RB}\cdot 4X$ ) y *orto-red box* ( $o\text{-RB}\cdot 4X$ ), que se forman a partir del dialdehído ( $HA^{2+}$ ) y la dihidrazona ( $HH^{2+}$ ), ambos sustituidos en *meta* y en *orto* respectivamente.

#### 3.2.1. Ensamblaje de los macrociclos análogos a la *red box*, $m\text{-RB}\cdot 4X$ y $o\text{-RB}\cdot 4X$



Esquema 6. Síntesis de los compuestos macrocíclicos  $m\text{-RB}\cdot 4X$  y  $o\text{-RB}\cdot 4X$ .

La reacción de ensamblaje de los macrociclos es una transiminación (**Esquema 6**). Inicialmente, la síntesis reportada para la *red box* consistía en condiciones típicas para el control termodinámico del enlace hidrazona en agua, de catálisis ácida, calor y alta dilución.<sup>24</sup> Pero, la síntesis de la *red box* en agua desarrollada por el grupo transcurre bajo condiciones de control cinético, debido a la elevada estabilidad hidrolítica de los nuevos enlaces  $C=N$  formados<sup>27</sup>, que se encuentran altamente deslocalizados a lo largo del macrociclo en los anillos de piridinio. Cabe decir que el uso de condiciones de alta dilución favorece la no formación de especies secundarias oligoméricas lineales a favor de especies cíclicas. Además, la especie reportada de menor tamaño que se produce resultado de la condensación es la [1:1], que es aquella que origina el producto mayoritario en medio acuoso a concentraciones menores a 5 mM de los componentes de partida. Es la elevada preorganización de los compuestos iniciales en medio acuoso lo que favorece la formación la *red box*. El efecto hidrofóbico es al favorecer la de forma plegada que preorganiza el sistema hacia la formación del segundo enlace intramolecular. En cambio, en la síntesis en medio orgánico se observa

la formación de especies oligoméricas a mayores de la [1:1], debido a otros procesos intermoleculares como consecuencia de la no preorganización debida al efecto hidrofóbico.

Con respecto a la reacción de ensamblaje de los macrociclos, para la síntesis de *m*-**RB**·4Br se hace reaccionar a *m*-**HH**·2Br con *m*-**HA**·2Br y, para *o*-**RB**·4Br, a *o*-**HH**·2Br con *o*-**HA**·2Br. La reacción se lleva a cabo en medio acuoso bajo condiciones de catálisis ácida, a través del ataque nucleófilo del N de la imina sobre el carbonilo electrófilo del aldehído, formándose así dos nuevos enlaces hidrazona. Con el propósito de aislar y caracterizar los macrociclos, se hace uso de reacciones de intercambio iónico (metátesis). En función de los disolventes usados se puede modular la solubilidad de las sales de piridinio según el contraión que posean: con iones pequeños y poco polarizables (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>) será más soluble en disolventes próticos y en medio acuoso, con aniones grandes (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>) son más solubles en medios orgánicos; mientras que como TFA<sup>-</sup> es soluble tanto en medio orgánico como acuoso. De este modo, mediante la adición de la sal KPF<sub>6</sub> a una disolución acuosas de (*m,o*)-**RB**·4Br, se precipitan los macrociclos como hexafluorofosfatos (*m*-**RB**·4PF<sub>6</sub> y *o*-**RB**·PF<sub>6</sub>). Sin embargo, *m*-**RB**·4PF<sub>6</sub> presenta un exceso de la sal usada en las reacción de metátesis; mientras que *o*-**RB**·PF<sub>6</sub> se recupera virtualmente puro con rendimiento superior al 70 %. Posteriormente, se añade la sal Bu<sub>4</sub>NCl en acetonitrilo para la precipitación como cloruro de *o*-**RB**·4Cl. Así, se obtiene el producto aislado virtualmente puro con un rendimiento del 55 %. Finalmente, para la obtención de ambos macrociclos con una mayor pureza, se purifican mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) semipreparativa en fase reversa, de modo que los macrociclos se recuperan como *m*-**RB**·4TFA y *o*-**RB**·4TFA. En la elución de los compuestos se emplea una columna C18 y como eluyentes H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA y CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA, y se produce el cambio de contraión de Cl<sup>-</sup> a TFA<sup>-</sup>. Los compuestos purificados como *m*-**RB**·4TFA y *o*-**RB**·4TFA fueron proporcionados por el grupo de investigación.

### 3.2.2. Elucidación estructural de *m*-**RB**<sup>4+</sup> y *o*-**RB**<sup>4+</sup>

Para la caracterización de los macrociclos, debe considerarse que el enlace imina formado presenta una mayor estabilidad de la esperada para este tipo de enlace covalente dinámico. A causa de la deslocalización de la carga en ambos lados largos del macrociclo (**Figura 15**), el enlace C=N de la imina es menos susceptible a la hidrólisis,

ya que es muy poco electrófilo, y el enlace HN-C piridínico tiene un cierto carácter de doble enlace. Existe así una cierta rotación impedida en el anillo, que resulta en una situación de no equivalencia entre los núcleos de protón de los grupos piridínicos, por lo que se observa una situación de equilibrio. Además, el equilibrio ácido base entre el cromóforo bipyridínico y su base conjugada resulta en dos formas del macrociclo, una forma ácida de color amarillo (en medios ácidos) y una forma básica, de color rojo que se originaría a pH básicos superiores a aproximadamente 8.<sup>27</sup>

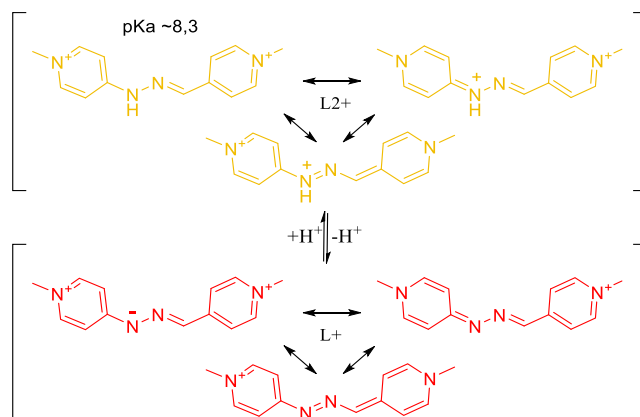


Figura 15. Representación del equilibrio ácido base de  $(m,o)\text{-RB}^{4+}$  y su base conjugada. Se representan las formas resonantes para cada especie.<sup>27</sup>

La caracterización estructural de los macrociclos  $m\text{-RB}\cdot 4\text{TFA}$  y  $o\text{-RB}\cdot 4\text{TFA}$  se lleva a cabo en medio acuoso ( $\text{D}_2\text{O}$ ) empleando las técnicas de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN mono y bidimensionales. Las sales de hexafluorofosfato ( $m\text{-RB}\cdot 4\text{PF}_6$  y  $o\text{-RB}\cdot \text{PF}_6$ ) se caracterizaron en medio orgánico ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ). En ambos casos los resultados fueron similares a los obtenidos para la *red box*, ya reportada por el grupo de investigación.<sup>27</sup> En primer lugar, se discutirá el espectro de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  de  $m\text{-RB}^{4+}$ , teniendo como base los espectros de sus *bloques de construcción*.

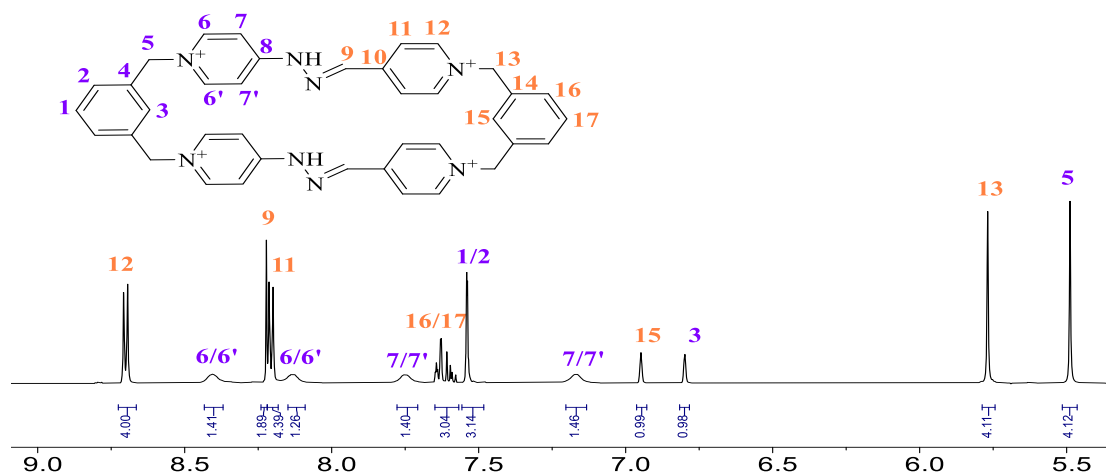
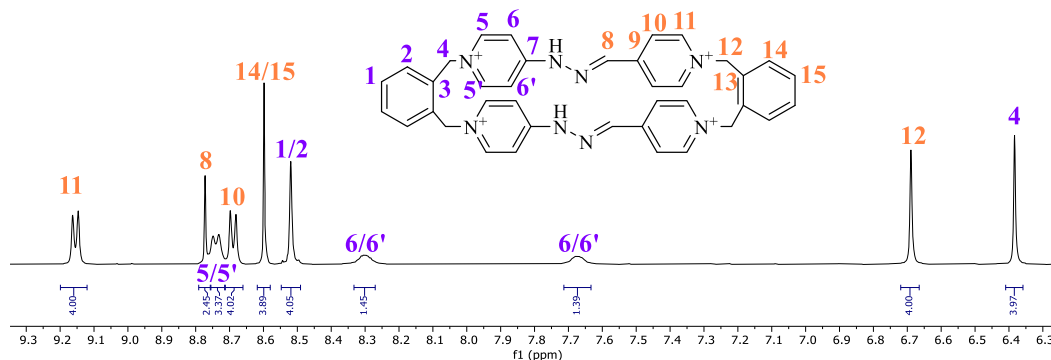


Figura 16. Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$  con las señales asignadas con números (en naranja, se asignan las señales provenientes del dialdehído y, en violeta, las de la dihidrazona).

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de  $m\text{-RB}^{4+}$  muestra un total de 15 señales (**Figura 16**). Se observan dos señales alifáticas ( $\text{H}_5$  y  $\text{H}_{13}$ ), dos singuletes que integran por 4H y que se identifican con los H metilénicos. En la zona aromática, cabe destacar la presencia de la señal del protón de la imina ( $\text{H}_9$ ), un singulete que integra por 2H a  $\sim 8.2$  ppm, característico de las iminas. Además, se observan las señales de los protones  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_6'$ ,  $\text{H}_7$  y  $\text{H}_7'$  como 4 singuletes anchos y de muy baja intensidad, debido al anteriormente explicado fenómeno de rotación impedida en el enlace  $\text{C}_8\text{-N}$  que hace a dichos protones no equivalentes. Por otro lado, se pueden identificar dos singuletes de poca intensidad, que integran por 1H, que se corresponden con los protones de los anillos fenilénicos situados entre las sustituciones en *meta* ( $\text{H}_3$  y  $\text{H}_{15}$ ). A mayor desplazamiento se identifican dos dobletes con los Hs del anillo piridínico del dialdehído, siendo la señal más desapantallada la de  $\text{H}_\alpha$  y, la más apantallada, la del  $\text{H}_\beta$  ( $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$ ).

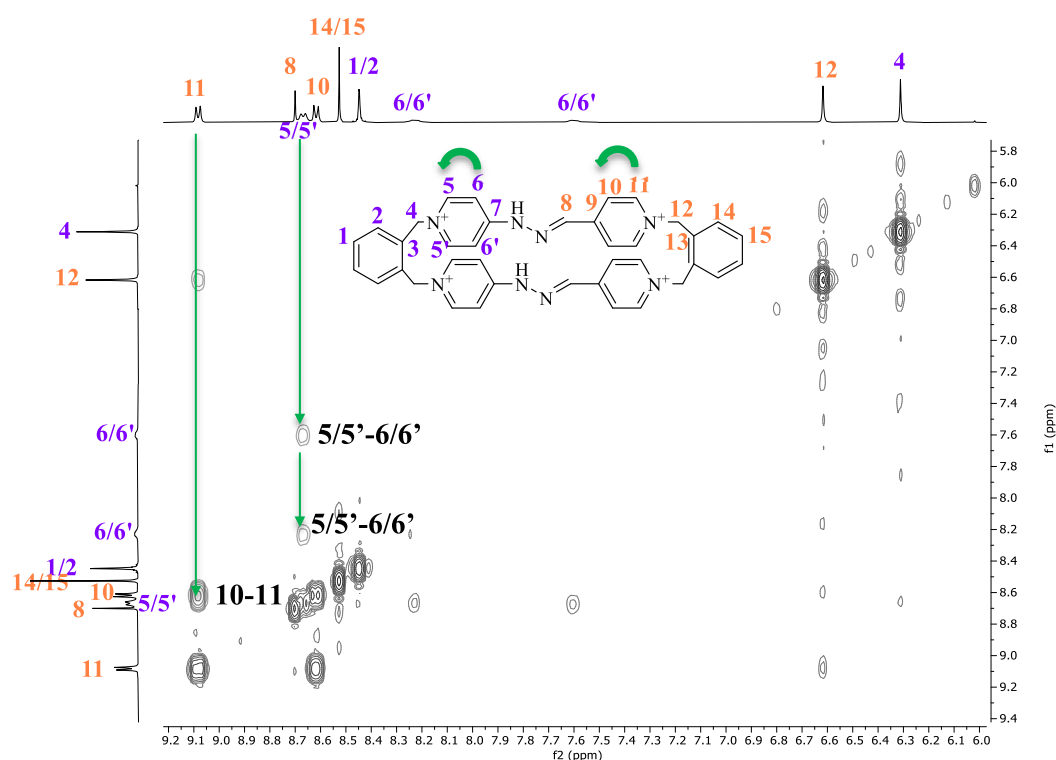
En lo referido al espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de  $m\text{-RB}^{4+}$  (ver *Anexos*), la señal más significativa es la resonancia a 140.9 ppm correspondiente al C imínico, lo que confirma la formación del enlace hidrazona y, por lo tanto, la del macrociclo. La caracterización se completó mediante HR-ESI-MS (ver *Anexos*). Se encontraron picos de masa exacta del ion  $[\text{M}]^{2+}$  ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_8^{2+}$ ) a  $m/z$  301.1447 y  $[\text{M}+\text{PF}_6]^{+}$  ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_8\text{P}^{+}$ ) a 747.2546  $m/z$ , calcd. para ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_8^{2+}$ ) a  $m/z$  301.1448 y ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_8\text{P}^{+}$ ) a 747.2543  $m/z$ .

En el caso de la  $o\text{-RB}^{4+}$ , con una cavidad más pequeña que la  $m\text{-RB}^{4+}$ , en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  a T ambiente se observa que casi la totalidad de las señales se encuentran en coalescencia (ver *Anexos*). Con el fin de diferenciar mejor las señales, se realizan los espectros  $^1\text{H}$ , COSY y NOESY a 95 °C. A alta T los núcleos se intercambian más rápido resultando en que sus entornos químicos sean equivalentes.



**Figura 17.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 95 °C, 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$  con las señales asignadas con números (en naranja, se asignan las señales provenientes del dialdehído y, en violeta, las de la dihidrazona).

De este modo, en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de  $o\text{-RB}^{4+}$  en  $\text{D}_2\text{O}$  a  $95\text{ }^\circ\text{C}$  (**Figura 17**), se pueden identificar las mismas señales que en el espectro de  $m\text{-RB}^{4+}$ . Se observa la coalescencia en los H no equivalentes en  $\alpha$  y en  $\beta$  al N del anillo piridínico derivado de la dihidrazona ( $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_6$  y  $\text{H}_{6'}$ ), la señal del H imínico ( $\text{H}_8$ ), que integra por 2H, y que confirma el ensamblaje del macrociclo y las señales de los protones de los anillos fenilénicos ( $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_{14}$ ,  $\text{H}_{15}$ ), que colapsan en dos singuletes que integran por 4H.



**Figura 18.** Espectro COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$  con las correlaciones indicadas mediante flechas.

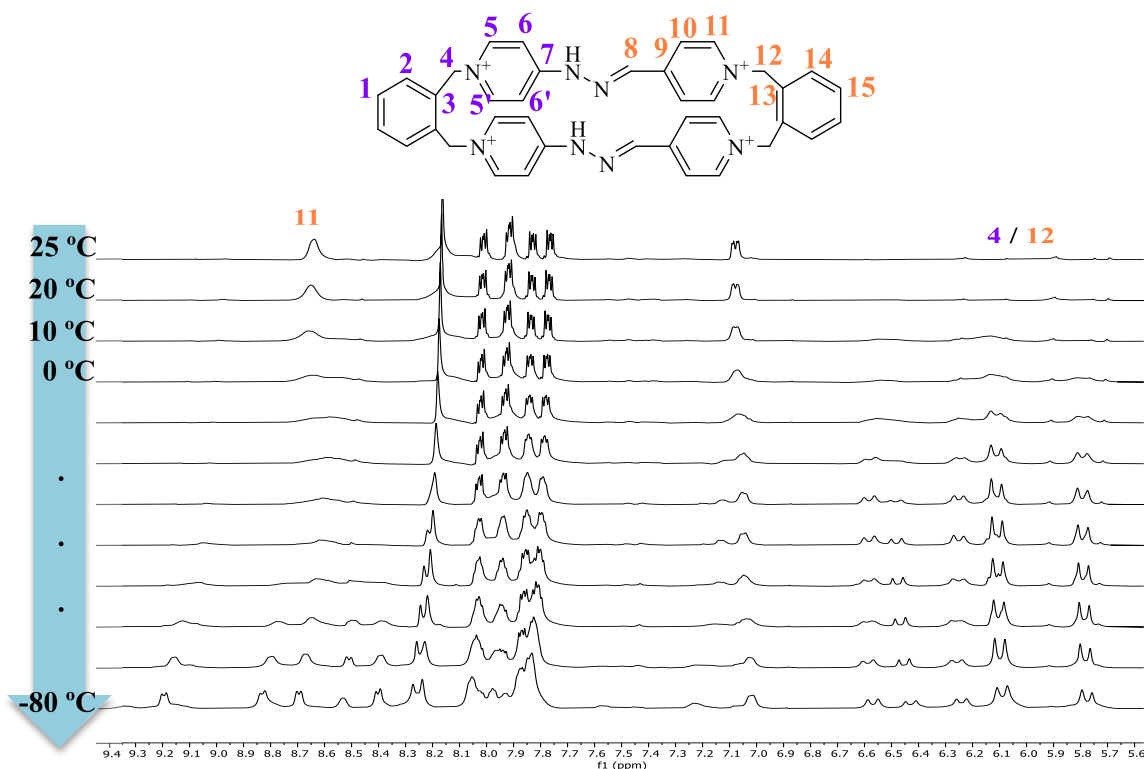
Para confirmar la asignación tentativa de Hs es imprescindible la interpretación del espectro COSY (*CORrelation SpectroscopY*) (**Figura 18**), que muestra los acoplamientos originados por un núcleo de protón que acopla su espín con los Hs a 3 enlaces al representar el espectro de  $^1\text{H}$  RMN frente a sí mismo. Los picos de cruce de interés nos permiten corroborar que existe acoplamiento entre los Hs en  $\alpha$  y  $\beta$  del anillo piridínico, provenientes tanto del dialdehído como de la dihidrazona. Se muestra la correlación entre  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_6$  y  $\text{H}_{6'}$  ( $5/5'$ - $6/6'$ ) y entre  $\text{H}_{10}$  y  $\text{H}_{11}$  (10-11).

También es de interés el análisis del espectro EXSY (*EXchange SpectroscopY*), que muestra la correlación entre núcleos a través del espacio y cuyos spines interactúan mediante el denominado efecto NOE (*Nuclear Overhäuser Effect*) y de los hidrógenos que se encuentran en intercambio químico. Así, en dicho espectro (ver



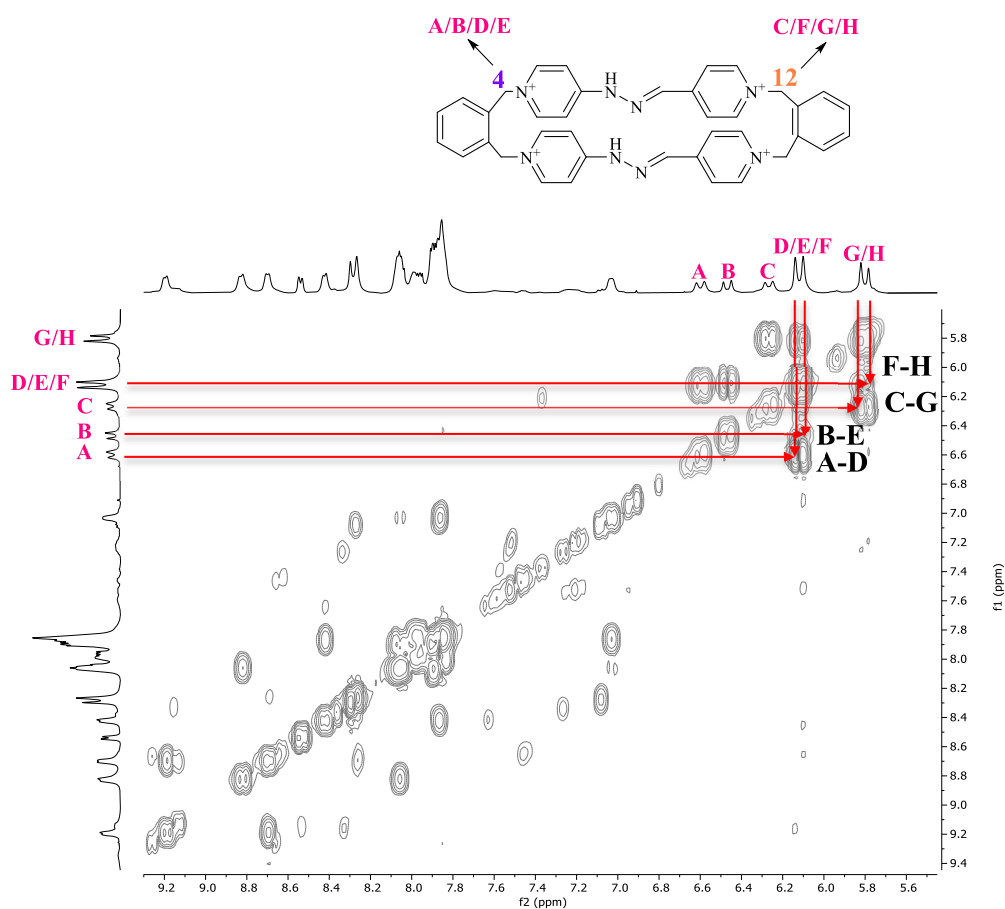
*Anexos*), se observan los picos de cruce correspondientes a los H  $\alpha$  y  $\beta$  del anillo piridínico, no equivalentes (H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6</sub> y H<sub>6'</sub>).

Para profundizar en el estudio de los posibles conformeros existentes de la *o*-RB<sup>4+</sup>, se decide estudiar los espectros de <sup>1</sup>H RMN en acetona deuterada a baja temperatura registrándose espectros entre los 25 °C y los -80 °C ( $\Delta T = 5, 10$  °C) (**Figura 19**). Así, en dicho espectro de T variable (VT) se observa como a T ambiente (arriba), las señales están generalmente colapsadas. Las señales de los Hs metilénicos (H<sub>4</sub> y H<sub>12</sub>) se localizan entre 6.65-5.65 como dos singuletes muy ensanchados. Los Hs geminales de estos grupos de la molécula son químicamente no equivalentes. A alta temperatura, estos Hs se ven como si fueran iguales, como consecuencia la rotación rápida en la escala de tiempos de RMN, de forma que se observan todos los posibles conformeros en una situación de equilibrio rápido y las señales se ven como un promedio. Sin embargo, a medida disminuye la temperatura disminuye la velocidad de rotación observándose a -80 °C (abajo) varios dobletes correspondientes a rotámeros en equilibrio. Ese desdoblamiento de las señales a baja temperatura también se observa a la derecha del espectro, para los Hs en  $\alpha$  al anillo piridínico (H<sub>11</sub>).



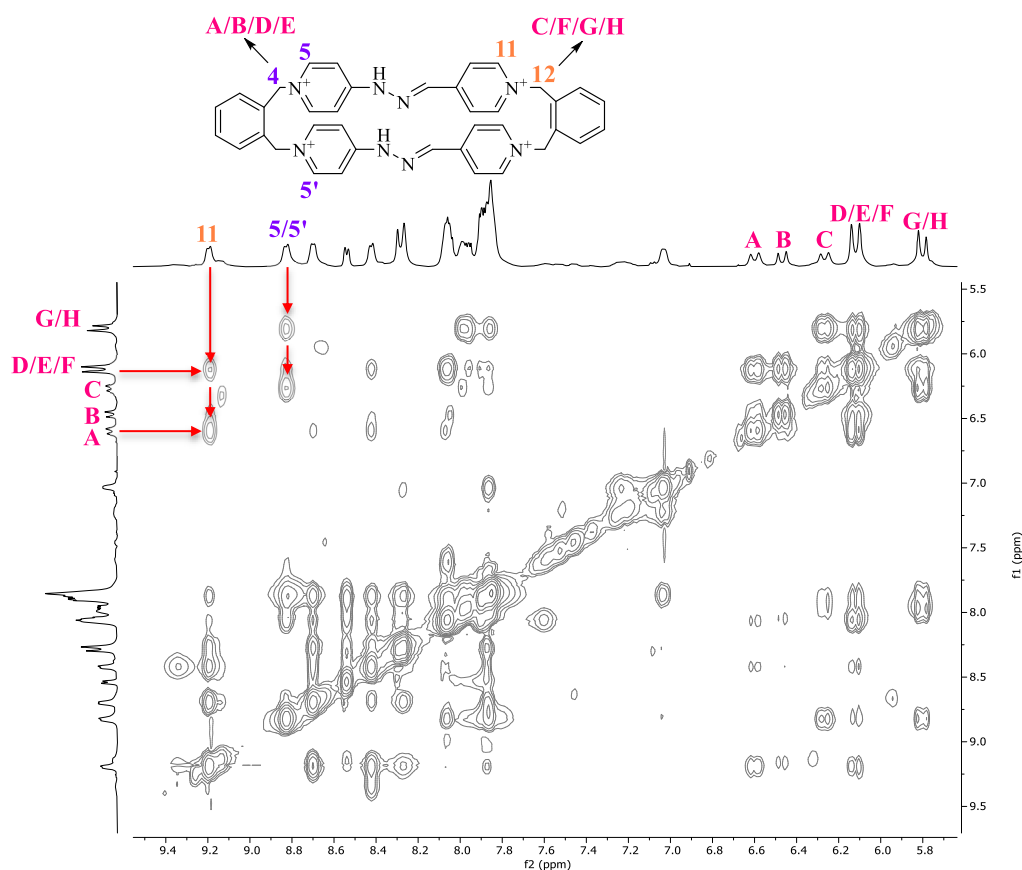
**Figura 19.** Espectro VT <sup>1</sup>H RMN ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO), 500 MHz) de *o*-RB<sup>4+</sup> con las señales de interés asignadas con números (en naranja, se asignan las señales provenientes del dialdehído y, en violeta, las de la dihidrazona), siendo el espectro de arriba a 25 °C y, el de abajo, a -80 °C ( $\Delta T = 5, 10$  °C).

Para poder discernir que Hs metilénicos pertenecen a la parte del macrociclo proveniente de la dihidrazona o del dialdehído, es necesario analizar el espectro COSY a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Figura 20**). En el espectro, se observan las señales de 8 H diferentes para los grupos metileno, lo que se correspondería con la existencia de dos rotámeros estables a esta temperatura. Se puede ver como originan picos de cruce en el espectro los protones A-D, B-E, C-G y F-H, siendo los Hs A, B, D y E los pertenecientes al dialdehído y, los Hs C, F, G y H, a la dihidrazona. Sin embargo, no es posible la identificación de las señales de cada conformero.



**Figura 20.** Espectro COSY ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ),  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$  con las correlaciones indicadas mediante flechas. Se asignan con letras a los 8 Hs metilénicos existentes.

Además, apoyándose en el espectro NOESY a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Figura 21**), se puede corroborar la anterior asignación de los Hs metilénicos, viendo que los Hs A, B y C muestran NOE con los Hs en  $\alpha$  al N del anillo piridínico del dialdehído ( $\text{H}_{11}$ ); mientras que los Hs C, F y G, muestran NOE con los Hs en  $\alpha$  al N del anillo piridínico de la dihidrazona ( $\text{H}_5$  y  $\text{H}_5'$ ).



**Figura 21. Espectro NOESY (( $\text{CD}_3$ ) $_2\text{CO}$ ),  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$  con las correlaciones indicadas mediante flechas. Se asignan con letras a los 8 Hs metilénicos y mediante números, los Hs en  $\alpha$  al nitrógeno piridínico (en violeta, los provenientes de la dihidrazona y, en naranja, los del dialdehído).**

Con el objetivo de obtener más información sobre los resultados obtenidos mediante VT  $^1\text{H}$  RMN para el ciclofano  $o\text{-RB}^{4+}$  en acetona deuterada, se realizó un estudio computacional buscando los potenciales conformeros del macrociclo accesibles a las distintas temperaturas. Los cálculos se hacen a T ambiente y baja T ( $25\text{ }^\circ\text{C}$  y  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ). Para ello se utilizó en primer lugar el programa CREST v. 2.11.2. en su configuración estándar para realizar una búsqueda conformacional extensiva,<sup>28,29</sup> usando el método cuántico semiempírico GFN2-XTB<sup>30</sup> y el modelo de solvatación ALPB<sup>31</sup> (acetona). Todos los cálculos de DFT se realizaron utilizando el software ORCA v.5.0.3.<sup>32</sup> La búsqueda refiere como solución un conjunto de 30 conformeros (CE1) accesibles a temperatura ambiente en una ventana de 6 kcal/mol.

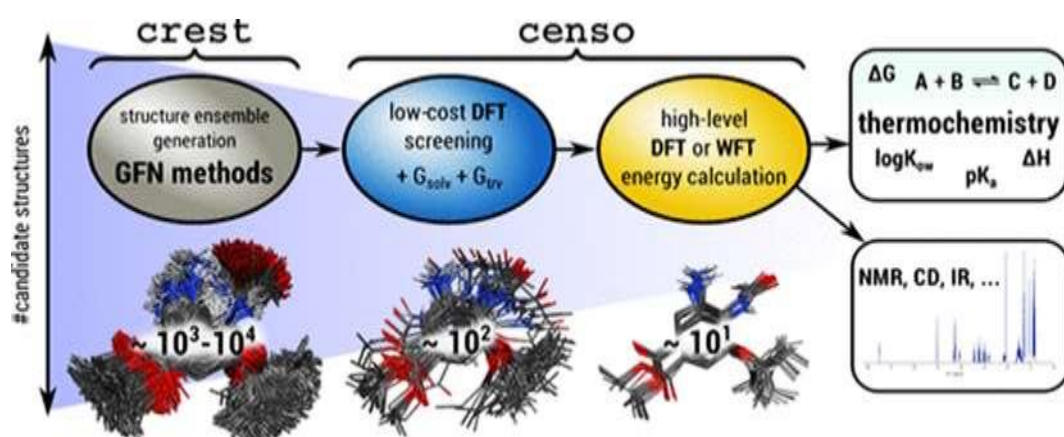
A fin de refinar el cálculo, el protocolo CENSO (*Command-line ENergetic Sorting*),<sup>33,34</sup> fue aplicado en sus partes 0-3 con los 30 conformeros encontrados a T =  $25\text{ }^\circ\text{C}$  y  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , con el objetivo de clasificarlos en base a su energía libre a distintos

niveles de cálculo de coste computacional creciente (**Figura 22**). Para la evaluación de la energía libre de cada especie  $i$ ,  $G_i$ , se considera la siguiente **Ecuación 1**, en donde:

$$G_i = E_{i,gas} + \delta G_{isolv} + G_{i,trv} \quad \text{Ecuación 1}$$

- $E_{i,gas}$ : energía total estimada para la especie en fase gas a un determinado nivel de cálculo.
- $\delta G_{isolv}$ : energía de solvatación para la sustancia dependiente de la T, estimada a un determinado nivel de cálculo y en un determinado modelo implícito de solvatación.
- $G_{i,trv}$ : corrección termoestadística de energía a energía libre, a una T dada y teniendo en cuenta las contribuciones asociadas a la traslación-rotación-vibración, e incluyendo además las correcciones de trabajo por unidad de volumen y vibracional de punto cero.

Estas contribuciones son normalmente calculadas dentro de la aproximación de rotor rígido-oscilador armónico (RRHO). Ha de considerarse que dicha aproximación es notablemente inexacta en la descripción de las vibraciones con frecuencias  $< 100 \text{ cm}^{-1}$ , al acercarse en estos casos la energía entrópica asociada a estos modos vibracionales de forma asintótica al infinito. Así, para un cálculo más exacto de estas contribuciones, se aplica la aproximación de Grimme (mRRHO), que trata las vibraciones de baja frecuencia no como asociadas a un oscilador armónico, si no a un rotor semirrígido.



**Figura 22.** Esquematización del protocolo computacional usado para clasificar conjuntos de rotámeros-confórmeros de acuerdo con su energía libre.

De esta forma, la aplicación del protocolo al conjunto conformacional proveniente de CREST rinde los siguientes resultados para  $o\text{-RB}^{4+}$  (**Tabla 1**):

T = 25 °C					Conjunto final (CE5)		
crest CE1 n° de conf.	censo p0 CE2 n° de conf.	censo p1 CE3 n° de conf.	censo p2 CE4 n° de conf.	censo p5 CE5 n° de conf.	Conf.	$\Delta G_{tot}$	Población Boltzman
30	8	4	4	4	ConfA	1.98	2.0
					ConfB	0.00	56.6
					ConfC	0.25	37.9
					ConfD	1.87	2.5
T = -80 °C					Conjunto final (CE5)		
crest CE1 n° de conf.	censo p0 CE2 n° de conf.	censo p1 CE3 n° de conf.	censo p2 CE4 n° de conf.	censo p5 CE5 n° de conf.	Conf.	$\Delta G_{tot}$	Población Boltzman
30	8	4	4	2	ConfA	1.66	0.7
					ConfB	0.04	46.5
					ConfC	0.00	52.1
					ConfD	1.60	0.8

Tabla 1. Resultados obtenidos tras la aplicación del protocolo CENSO al conjunto conformacional proveniente de CREST para *o*-RB<sup>4+</sup> a 25 °C y -80 °C en acetona.

De los cálculos se deduce que la distribución de confórmeros a 25 °C y -80 °C no varía excesivamente, incluyendo los mismos confórmeros que no varían demasiado en estabildades relativas. Así, mientras en ambas distribuciones aparecen 4 atropoisómeros, que se diferencian por la disposición relativa *sin*- o *anti*- de los grupos fenilo respecto a los dos grupos hidrazona en el mismo plano, solo dos de ellos (confórmeros B y C, **Figura 23**), contribuyen con poblaciones significativas en la distribución de Boltzman a ambas temperaturas.

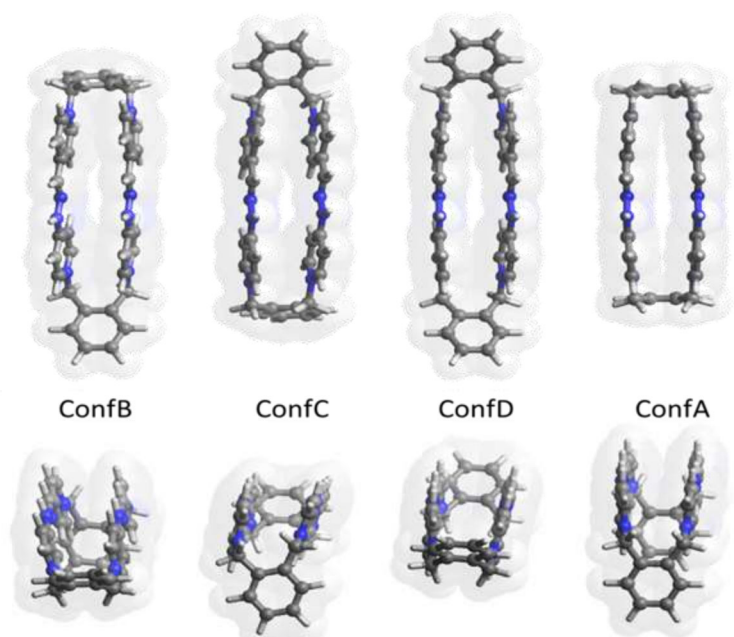


Figura 23. Confórmeros accesibles de *o*-RB<sup>4+</sup> a T = 25 °C y -80 °C (ver Tabla 1 para energías libres relativas de las especies a ambas temperaturas).

De este modo, los cálculos estarían en buen acuerdo con los datos experimentales de VT  $^1\text{H}$  RMN. A T ambiente la situación de coalescencia de las señales impide el análisis de los resultados, pero el enfriamiento a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  permite el acceso a una situación de equilibrio más lenta en la que se pueden observar resultados en buen acuerdo con la presencia mayoritaria de 2 confórmeros.

Por último, se completó la caracterización del macrociclo *o*-**RB**<sup>4+</sup> mediante HR-ESI-MS (ver *Anexos*). Se encontraron dos picos de masa exacta del ion  $[\text{M}]^{2+}$  ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_8^{2+}$ ) a  $m/z$  301.1447 y  $[\text{M}+\text{PF}_6]^+$  ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_8\text{P}^+$ ) a 747.2546  $m/z$ , calcd. para ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_8^{2+}$ ) a  $m/z$  301.1448 y ( $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{F}_6\text{N}_8\text{P}^+$ ) a 747.2543  $m/z$ .

### 3.3. Estudio de complejación entre *m*-**RB**<sup>4+</sup> y *o*-**RB**<sup>4+</sup> y un sustrato modelo

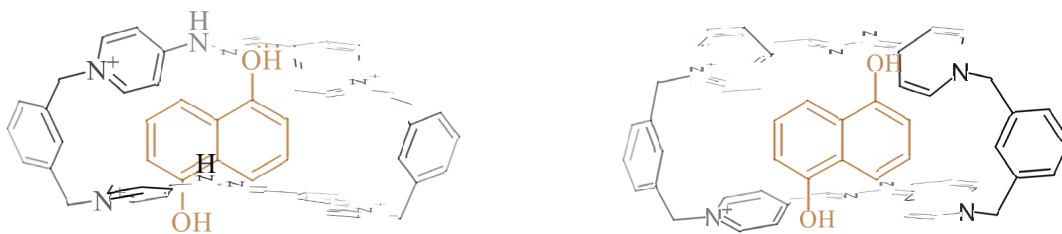
Los dos receptores análogos a la *red box* presentan una forma de “caja” rectangular formada por unidades  $\pi$ -deficientes en sus lados largos, de forma que presenta una cavidad rígida e hidrofóbica. Esta puede alojar sustratos aromáticos de tamaño y complementariedad adecuada, a través de interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  con los lados largos e interacciones  $[\text{C}-\text{H}\cdots\pi]$  con los lados cortos del macrociclo.<sup>27</sup>

Para el estudio de la capacidad como receptor de ambos análogos, se selecciona un sustrato aromático modelo rico en electrones derivado del naftaleno, el 1,5-dihidroxi-naftaleno (1,5-DHN), ya que la *red box* ha mostrado ser un buen receptor para este tipo de sustratos en medio acuoso y algo menos en medio orgánico.<sup>27</sup>

Se preparan los complejos en  $\text{D}_2\text{O}$  al mezclar dos disoluciones de concentración 4 mM de sustrato y de macrociclo. Al comparar los espectros de  $^1\text{H}$  RMN del complejo con los de sus componentes libres se comprueba que existe un desplazamiento en las señales, tanto de *m*-**RB**<sup>4+</sup> como de 1,5-DHN (ver *Anexos*). Las señales de 1,5-DHN se ven apantalladas, mientras que las de *m*-**RB**<sup>4+</sup> unas se ven apantalladas y otras desapantalladas: las señales de los anillos fenilénicos (lados cortos) se desapantallan por causa de las interacciones  $[\text{C}-\text{H}\cdots\pi]$ , pero las señales de los anillos piridínicos (lados largos), se apantallan al interactuar con el sustrato  $\pi$ -excedente. Estos cambios en las señales confirman la formación de un complejo de inclusión, y coinciden con lo esperado para este tipo de complejos.<sup>27,35</sup>

Por otro lado, se comprueba que *o*-**RB**<sup>4+</sup> no es capaz de complejar a 1,5-DHN. Tras la adición del sustrato, no se observan cambios en el espectro de <sup>1</sup>H RMN indicando que su cavidad no es lo suficientemente grande para albergar a dicho sustrato.

Una vez comprobado de forma cualitativa la formación en medio acuoso del complejo **1,5-DHN**⊂*m*-**RB**<sup>4+</sup>, se procede a estudiar la capacidad receptora de *m*-**RB**<sup>4+</sup> y de su base conjugada *m*-**RB**<sup>2+</sup>. Se determina la *K<sub>a</sub>* (constante de asociación) del complejo a pH ácido y básico, utilizando 1,5-DHN como sustrato mediante <sup>1</sup>H RMN (**Esquema 7**). Se preparan disoluciones en D<sub>2</sub>O tamponadas con HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, a pD 6.3 y 10.9, se va registrando el espectro manteniendo la concentración de *m*-**RB**<sup>4+</sup> a 2 mM y se va añadiendo 1,5-DHN hasta alcanzar los 3.0 equivalentes. Los espectros de las valoraciones a pD 6.3 y pD 10.9 se muestran en *Anexos*.

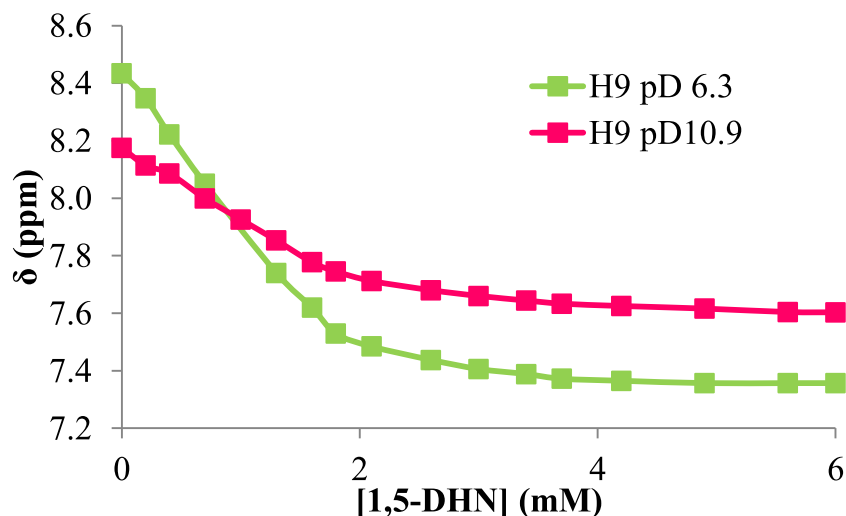


**Esquema 7. Estructuras del complejo de inclusión 1,5-DHN**⊂*m*-**RB**<sup>4+</sup> a pH ácido (izquierda) y **1,5-DHN**⊂*m*-**RB**<sup>2+</sup> básico (derecha).

Para realizar el cálculo, se selecciona una señal del macrociclo fácilmente reconocible: el singulete del protón de la imina (H<sub>9</sub>, en **Figura 16**). Como resultado de la interacción receptor-sustrato, el 1,5-DHN cede carga a los anillos piridínicos del lado largo del receptor, por lo que la señal de la imina se apantalla. Tanto *m*-**RB**<sup>4+</sup> como *m*-**RB**<sup>2+</sup> mostraron una capacidad similar para complejarse.

Así, se estima la constante de asociación *K<sub>a</sub>* empleando el software *DynaFit*, ajustando el proceso al modelo propuesto en el **Esquema 7**. Se obtienen los siguientes valores de la constante de asociación: *K<sub>a</sub>* (pD 6.3) = (1.61±0.28)·10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> y *K<sub>a</sub>* (pD 10.9) = (8.59±1.90)·10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>, siendo el coeficiente de variación de ~15 % en ambos casos. El menor valor de *K<sub>a</sub>* en medio básico se explica por la menor capacidad π-deficiente (aceptora de electrones) de la base conjugada del receptor, y se ha visto previamente en ciclofanos similares.<sup>36</sup> Estos resultados parecen indicar que el efecto hidrofóbico y no la carga neta es el factor determinante de la asociación. Además, estos valores de la constante concuerdan con datos previamente reportados para sistemas similares.<sup>27</sup> Los

desplazamientos medidos para cada concentración de 1,5-DHN se recogen en *Anexos*. El resultado del ajuste de los datos experimentales se muestra en la **Gráfica 1**.



**Gráfica 1.** Ajuste de los desplazamientos químicos experimentales ( $\delta$ , ppm) de la señal del protón imínico ( $H_9$ ) al modelo propuesto, a pD 6.3 (verde) y a pD 10.9 (rosa) de una mezcla del macrociclo  $m\text{-RB}^{4+}$  (2 mM) con cantidades crecientes de sustrato 1,5-DHN (0-3.0 equivalentes).

### 3.4. Estudio de complejación entre $o\text{-RB}^{4+}$ y el anión $\text{Cl}^-$

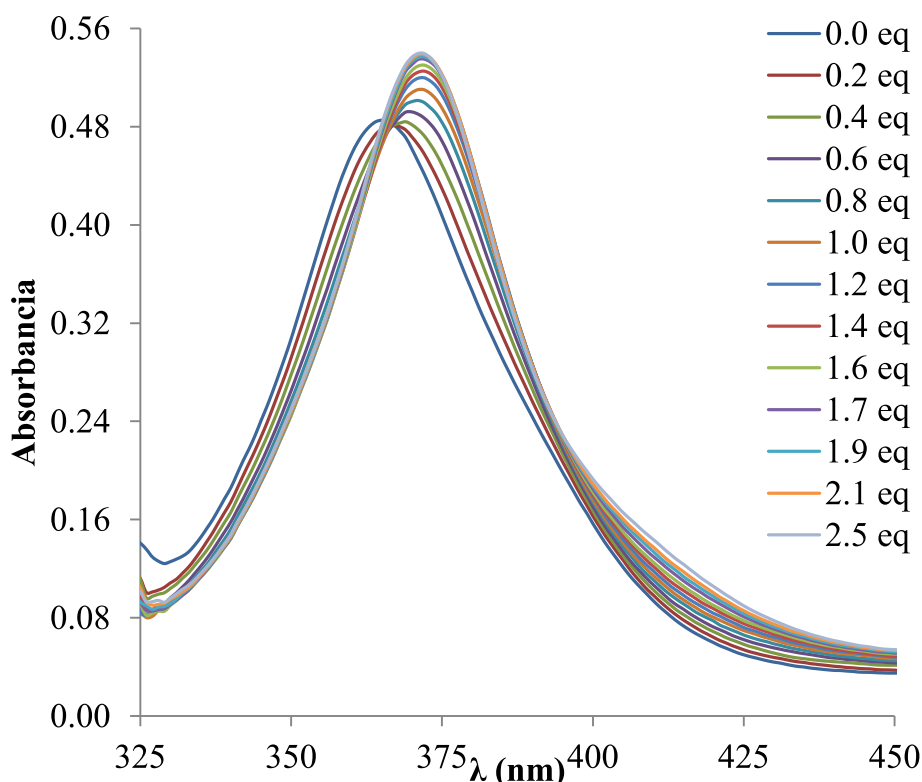
Una vez comprobado que la  $o\text{-RB}^{4+}$  no compleja al sustrato orgánico modelo, se decide explorar la capacidad de este receptor para reconocer aniones en medios orgánicos, en base a los resultados publicados acerca de compuestos derivados imínicos y de urea capaces de complejar aniones,<sup>14,16,37</sup> especialmente, aquellos publicados por Hao *et al.* sobre la capacidad de macrociclos catiónicos de hidrazona para el reconocimiento de aniones.<sup>21</sup> El ciclofano  $o\text{-RB}^{4+}$  es estructuralmente similar a esos sistemas, ya que la presencia del doble enlace hidrazona, que contiene el fragmento N-NH, permite la formación del complejo con el  $\text{Cl}^-$  mediante enlace de H. En concreto, en el caso de la  $o\text{-RB}^{4+}$ , esos dos grupos N-NH se encuentran cercanos en el espacio, lo cual podría resultar en interacciones no covalentes de enlaces de H, estabilizando aún más el complejo con el anión. Además, también se podrían establecer otros enlaces de H [ $\text{C-H}\cdots\text{Cl}^-$ ] e interacciones ion- $\pi$ .

Así, el estudio de complejación se realizó en acetona, para evitar la competencia por el anión por parte de moléculas del disolvente dadoras de enlaces de H, como por ejemplo, el agua. Además, el disolvente juega un papel importante en la estabilidad de los complejos aniónicos. Cuanto mayor sea la polaridad del solvente ( $\text{DMSO} > \text{MeCN} > \text{Acetona} > \text{CHCl}_3$ ), mayor será el término de energía de desolvatación del anión y menor será la estabilidad del complejo de enlaces H.<sup>19</sup> Para proporcionar el  $\text{Cl}^-$  al



medio, se utiliza cloruro de tetrabutilamonio (TBACl) porque el  $TBA^+$  es un catión inerte, de gran tamaño y que no afecta a la acidez-basicidad de la solución ni participa en el complejo y facilita la disolución de la sal en acetona.

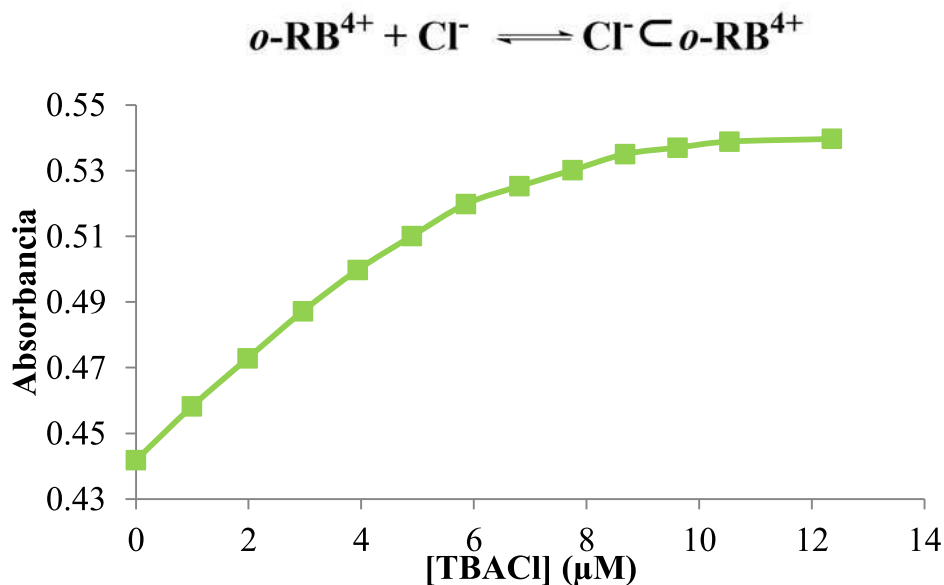
En esta valoración, se registra el espectro en un rango de barrido de 300-700 nm. Para ello, se mantiene constante la concentración de  $o-RB^{4+}$  en  $5 \mu M$  y se va aumentando la concentración de TBACl, desde 0 hasta  $\sim 2.5$  equivalentes (**ver Anexos**). De forma cualitativa, en el espectro UV-vis se observa una banda de absorción centrada entre 328-448 nm, que se puede asociar con transiciones  $\pi-\pi^*$  del macrociclo en su forma ácida ( $o-RB^{4+}$ ) (**Gráfica 2**). Esta banda presenta un desplazamiento batocrómico (hacia longitudes de onda de menor energía) como consecuencia de la interacción a través de enlaces de hidrógeno entre el grupo hidrazona y el  $Cl^-$ . Este fenómeno de “desplazamiento hacia el rojo” de la banda ácida ya ha sido observado en criptandos con enlaces hidrazona<sup>36</sup> y en sensores hidrazona al interactuar con aniones como el  $Cl^-$  o  $AcO^-$ .<sup>38,39</sup> Además, se observa una banda de mucho menos intensidad, centrada entre 458-530 nm, la cual podría corresponderse con una banda de transferencia de carga.



**Gráfica 2.** Espectros de UV-vis de la banda ácida (325-450 nm,  $\lambda_{exc} = 310$  nm) resultado de las adiciones de TBACl (0-2.5 equivalentes) a una disolución de  $o-RB^{4+}$  ( $5 \mu M$ ) en acetona.

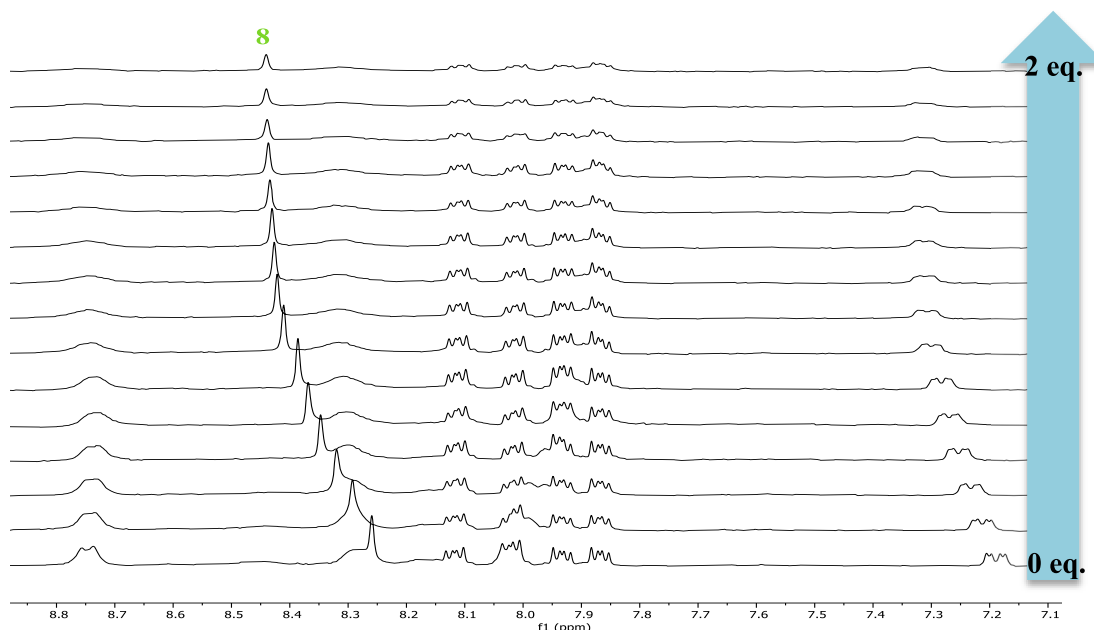
Para calcular el valor de  $K_a$ , se ajustan los datos del máximo de la banda ácida ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 372$  nm) a un mecanismo de asociación 1:1 (**Gráfica 3**), haciendo uso del

software *DynaFit*. Se obtiene un valor de  $K_a$  de  $(1.87 \pm 0.29) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  y del coeficiente de variación de 15 %. Este valor tan alto de la constante podría explicarse por la formación de un complejo quelato intramolecular débil con el receptor, y se corresponde con valores reportados para la formación de quelatos en sistemas similares.<sup>40,41,42</sup>



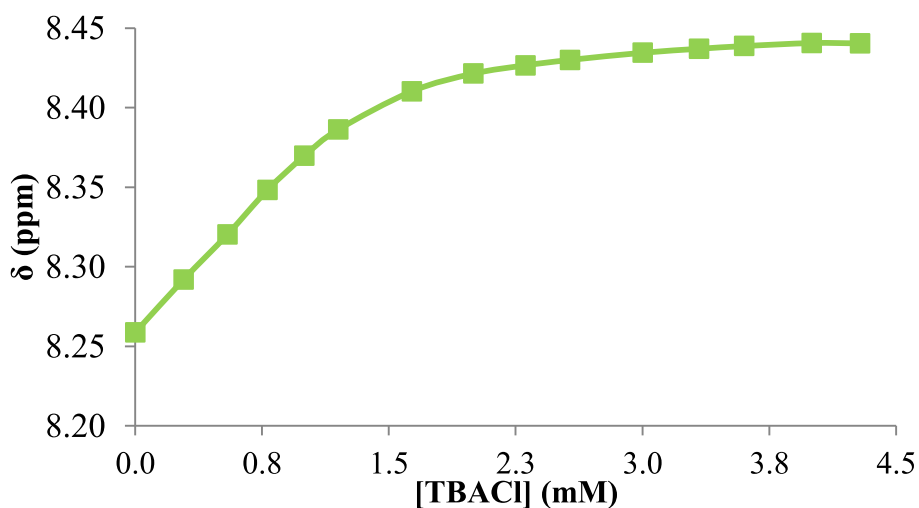
**Gráfica 3.** Ajuste de los valores de absorbancia experimental del máximo de la banda ácida a 372 nm de una mezcla del macrociclo  $o\text{-RB}^{4+}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) con cantidades crecientes de TBACl (0-2.5 equivalentes) en acetona.

Estos resultados se corroboraron mediante la técnica de  $^1\text{H}$  RMN, preparando una disolución del macrociclo de 2.25 mM y añadiendo concentraciones crecientes de TBACl hasta los  $\sim 2.0$  equivalentes (**Figura 24**).



**Figura 24.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ), 300 MHz) de la valoración de una mezcla del macrociclo  $o\text{-RB}^{4+}$  (2.25 mM) con cantidades crecientes de TBACl (0-1.9 equivalentes).

La constante de asociación se calcula a partir del desplazamiento del H imínico ( $H_8$ , en **Figura 17**). El valor de  $K_a$  es  $(5.13 \pm 0.43) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  y el coeficiente de variación del 8 %. La diferencia en el orden de la constante se debe a la precipitación por metátesis durante la valoración, pero se determina que el punto de equivalencia se encuentra en  $\sim 1$  equivalente. Los desplazamientos medidos para cada concentración de 1,5-DHN se recogen en *Anexos*. El resultado del ajuste de los datos experimentales se muestra en la **Gráfica 4**.



**Gráfica 4.** Ajuste de los desplazamientos químicos experimentales ( $\delta$ , ppm) de la señal del protón imínico ( $H_8$ ) al modelo propuesto de una mezcla del macrociclo  $o\text{-RB}^{4+}$  (2.25 mM) con cantidades crecientes de TBACl (0-1.9 equivalentes).

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Materiales y equipos usados

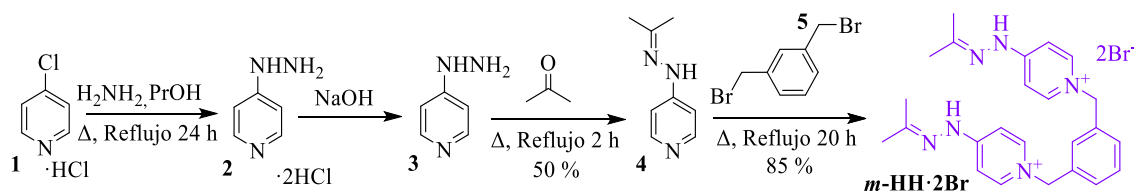
Para la realización del trabajo experimental del presente TFM, se han empleado reactivos y disolventes comerciales, sin purificación adicional. Se proporcionaron los compuestos iniciales *o*-HH·2Br y *o*-HA·2Br, que fueron sintetizados por el grupo QUIMOLMAT-Supra. Además, se hizo uso de agua de calidad miliQ, obtenida mediante un equipo Millipore Gradient A10.

Se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina para realizar el seguimiento de las reacciones químicas, haciendo uso de cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y de radiación ultravioleta a 254 y 360 nm como revelador y como eluyente, una mezcla de disolventes, “Magic”, preparada a partir de 600 ml de CH<sub>3</sub>CN, 150 mL de CH<sub>3</sub>OH, 150 mL de H<sub>2</sub>O y 5 g de NaCl (seleccionada en base a las polaridades de los compuestos a separar). Además, se hizo uso del equipo de ultrasonidos Branson 2510 para favorecer la disolución de los compuestos mediante ultrasonidos. Cuando se liofilizaron los productos, se usó un liofilizador Telstar Cryodos -80.

Se realizó también el seguimiento de todas las reacciones mediante <sup>1</sup>H RMN, para lo que se empleó un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz). Para la caracterización de los compuestos se usaron los espectrómetros Bruker Avance 500 e Bruker Avance III HD 400 (400/500 MHz para <sup>1</sup>H y 101/126 MHz para <sup>13</sup>C) del SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la UDC. Los espectros de RMN se realizaron utilizando D<sub>2</sub>O, CD<sub>3</sub>CN y CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> como disolvente y tomando como referencia la señal del disolvente protonado. Por otro lado, en los ensayos de espectrofotometría UV-vis se registraron en un espectrofotómetro JASCO V-650 y se midió el pH empleando un medidor de pH Fisherbrand accumet AE150.

### 4.2. Procesos experimentales

#### 4.2.1. Síntesis de la *meta*-dihidrazona (*m*-HH·2Br)

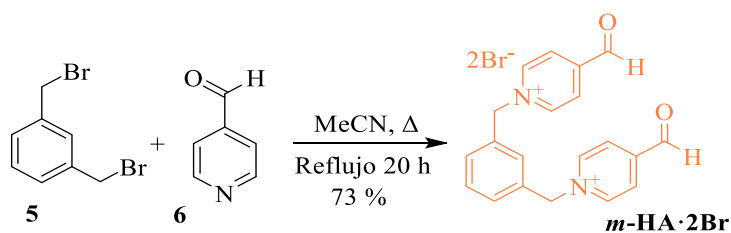


Se disuelve el hidrocloreuro de 4-cloropiridina (**1**, 4.12 g, 27.5 mmol, 1 eq) en 100 mL de 2-propanol. A esta disolución blanquecina, se añaden 15 mL de hidrazina (82.4 mol, 8 eq, 50 % H<sub>2</sub>O) y se calienta a ebullición y con agitación. La disolución se vuelve de color amarillo claro una vez añadida la hidrazina. Se calienta a ebullición durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se observa la formación de un precipitado marrón-anaranjado en el fondo del balón. A continuación, se eliminan los restos de disolvente en el rotavapor y se acaba de secar el producto en una línea de vacío durante 15 horas. El producto final presenta un aspecto líquido viscoso marrón y se obtienen 6.80 g de la piridina **2**.

A continuación, se disuelven 3.40 g del hidrocloreuro de 4-hidrazinopiridina (**3**, 18.7 mmol, 1 eq) en 150 mL de una disolución de NaOH 3M. Tras agitar durante 30 min, se realizan extracciones con AcOEt (8×10 mL). La fase orgánica se seca en el rotavapor. El producto se disuelve en 60 mL de acetona y se calienta a ebullición durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, la disolución presenta un color anaranjado y se observa un precipitado de color cobrizo, la hidrazona protegida, de la cual se obtienen 1.43 g. Una vez obtenida la hidrazona protegida, se disuelven en 100 mL de acetona 1.43 g de hidrazona (**4**, 9.57 mmol, 4 eq) y se añaden 0.63 g de  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xileno (**5**, 2.39 mmol, 1 eq). Se calienta a ebullición durante 20 horas. Al inicio, la disolución presenta un color anaranjado pero a los 40 min, comienza a precipitar un sólido blanquecino. Tras enfriar, se filtra a vacío y se lava tres veces con 15 mL de acetona y tres veces con 10 mL de éter etílico y se deja secar. Así, se obtienen 1.15 g de *m*-**HH**·2Br, sólido pulverulento blanquecino, lo que se corresponde con un rendimiento en esta etapa del 85 % (rendimiento global del 43 %).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 8.15 (s ancho, 4H), 7.55 (dt,  $J = 7.7, 5.8$  Hz, 1H), 7.45 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 2H), 7.36 (s ancho, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.06 (s ancho, 2H), 5.43 (s, 4H), 2.15 (s, 6H), 2.08 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 162.85(C), 154.32 (C), 135.71 (C), 130.21 (CH), 128.68 (CH), 126.94 (CH), 60.67 (CH), 24.36 (CH), 17.36 (CH). **HR-ESI-MS** (m/z): calculado para C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub><sup>2+</sup>: 201.1261 y C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>: 401.2499; encontrado, C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub><sup>2+</sup>: 201.1260 y C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup>: 401.2499.

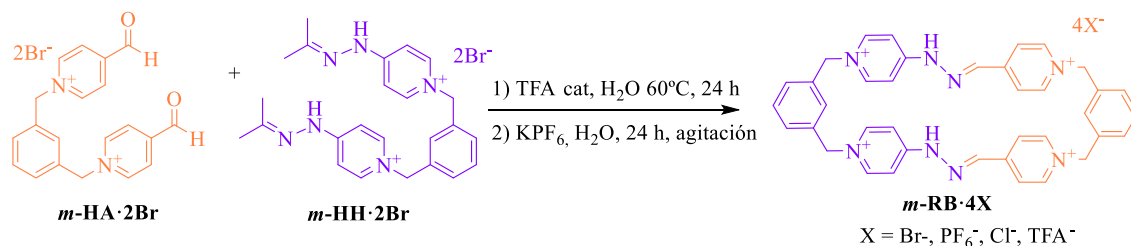
#### 4.2.2. Síntesis del *meta*-dialdehido (*m*-HA·2Br)



En 60 mL de acetonitrilo, se disuelven 0.52 g de  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*m*-xileno (**4**, 1.95 mmol, 1 eq) y se añaden 0.6 mL de 4-piridincarboxialdehido (**5**, 5.85 mmol, 3 eq). Se calienta a reflujo con agitación. Tras 30 min de reacción, la disolución inicialmente de color amarillo se torna de color cobrizo y se empieza a formar un precipitado. Se deja reaccionar 20 horas. A continuación, se filtra el sólido a vacío y se lava 3 veces con 15 mL de acetonitrilo y 3 veces con 10 mL de dietiléter. Se obtienen 0.73 g *m*-HA·2Br, líquido viscoso de color cobrizo, siendo el rendimiento del 73 %.

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 8.84 (d,  $J = 6.7$ , 4H), 8.08 (d,  $J = 6.8$ , 4H), 7.48 (m, 3H), 7.46 (m, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.77 (s, 4H).  $^{13}\text{C RMN}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 160.43 (C), 144.69 (CH), 133.94 (C), 130.74 (CH), 130.38 (CH), 129.40 (CH), 125.59 (CH), 87.47 (CH), 63.64 ( $\text{CH}_2$ ). **HR-ESI-MS** ( $m/z$ ): calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4^{2+}$ : 191.0941 y  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ : 461.1071; encontrado,  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4^{2+}$ : 191.0940 y  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6^+$ : 461.1070.

#### 4.2.3. Ensamblaje y purificación del macrociclo *meta-red box* (*m*-RB·4X)



En primer lugar, se disuelven 0.15 g *meta*-dialdehido (*m*-HA·2Br, 0.27 mmol, 1 eq), y 0.14 g de la *meta*-dihidrazona (*m*-HH·2Br, 0.27 mmol, 1 eq) en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se comprueba, mediante  $^1\text{H RMN}$ , que ambos compuestos de partida se encuentran en proporción 1:1. A continuación, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de TFA, tras lo cual la disolución cambia de color anaranjado a naranja, y se calienta con agitación a  $60^\circ\text{C}$  durante 20 horas.

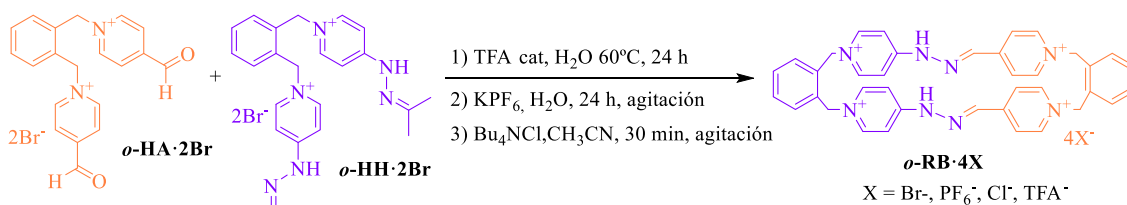
Transcurrido ese tiempo, y una vez enfriado a temperatura ambiente, se coprecipita con  $\text{KPF}_6$ , al añadir un exceso de esta sal. Se deja agitando a temperatura

ambiente 24 h. Se forma un precipitado de color rojizo, el cual se filtra a vacío y se lava con 10 mL de H<sub>2</sub>O y 3 veces con 15 mL de éter etílico. Se deja secar al aire 24 horas para eliminar bien toda la humedad. Finalmente, se obtienen 0.4928 g del macrociclo *m*-**RB**·4PF<sub>6</sub>, siendo el rendimiento del 155 %, ya que hay un exceso de KPF<sub>6</sub> en el producto.

El grupo QUIMOLMAT-Supra proporciona el macrociclo como *m*-**RB**·4TFA, tras su purificación mediante la técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) semipreparativa en fase inversa haciendo uso de una columna C18 y de los eluyentes H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA y CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.70 (m, 4H), 8.41 (s ancho, 1H), 8.22 (s, 2H), 8.20 (d, 2H), 8.13 (s ancho, 1H), 7.75 (s ancho, 1H), 7.61 (m, 3H), 7.54 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 7.17 (s ancho, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.77 (s, 4H), 5.49 (s, 4H). **HR-ESI-MS** (m/z): calculado para C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 301.1448 y C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>P<sup>+</sup>: 747.2543; encontrado, C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 301.1447 y C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>P<sup>+</sup>: 747.2546.

#### 4.2.4. Ensamblaje y purificación del macrociclo *orto-red box* (*o*-**RB**·4X)



Para la síntesis del macrociclo *orto-red box*, se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente para el macrociclo *meta-red box*, pero partiendo de los *bloques de construcción* proporcionados por el grupo, el *orto*-dialdehído (*o*-**HA**·2Br) y la *orto*-dihidrazona (*o*-**HH**·2Br).

Primero, se disuelven 0.14 g del *orto*-dialdehído (*o*-**HA**·2Br, 0.27 mmol, 1 eq), y 0.15 g de la *orto*-dihidrazona (*o*-**HH**·2Br, 0.27 mmol, 1 eq) en 100 mL de H<sub>2</sub>O, obteniéndose una disolución amarillenta. Una vez comprobado por <sup>1</sup>H RMN que la estequiometría de la reacción es 1:1, se añaden 10 μL de TFA, tras lo cual la disolución se torna más oscura, y se calienta con agitación a 60°C durante 20 horas.

Tras enfriar a temperatura ambiente se añade un exceso de la sal KPF<sub>6</sub>, para que se produzca la precipitación. Tras la adición de la sal se agita a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, tanto la disolución como el precipitado presenta

un color verdoso. Se filtra a vacío y se lava dos veces con 10 mL de H<sub>2</sub>O y 3 veces con 15 mL de éter etílico. Una vez seco, se obtienen 0.246 g de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub>, sólido pulverulento verde, lo que se corresponde con un rendimiento del 77 %. No es necesaria purificación adicional del macrociclo, ya que se obtiene con un alto grado de pureza.

Una disolución de 91.5 mg de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> con un exceso de la sal Bu<sub>4</sub>NCl, en 10 mL de acetonitrilo se agita 30 min. Se forma una disolución de color verdoso, en la que precipita un sólido amarillento. Se filtra a vacío y se lava dos veces con 7 mL de acetonitrilo y dos veces con 10 mL de éter etílico. Se obtienen 50.0 mg de *o*-**RB**·4Cl, sólido pulverulento de color amarillento, siendo el rendimiento del 55 %.

El grupo QUIMOLMAT-Supra proporciona el macrociclo purificado como *o*-**RB**·4TFA, haciendo uso de la misma técnica y método que para la purificación de *m*-**RB**·4TFA.

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, 95 °C, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.76 (2, 2H), 8.73 (d, 3H), 8.68 (d, 4H), 8.60 (s, 4H), 8.52 (dt, *J* = 1.7, 0.8 Hz, 4H), 8.30 (s ancho, 2H), 7.67 (s ancho, 2H), 6.69 (s, 4H), 6.38 (s, 4H). **HR-ESI-MS** (m/z): calculado para para C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 301.1448 y C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>P<sup>+</sup>: 747.2543; encontrado, C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>N<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 301.1447 y C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>N<sub>8</sub>P<sup>+</sup>: 747.2546.

#### 4.2.5. Síntesis de los complejos de inclusión de *m*-**RB**·4TFA y *o*-**RB**·4TFA con 1,5-dihidroxinaftaleno (1,5-DHN)

Para comprobar si ambos receptores son capaces de complejar al 1,5-DHN en medio acuoso, se preparan disoluciones en proporción 1:1 de receptor y sustrato. Así, se prepara una disolución 4 mM de 1,5-DHN, para lo que se pesan 2.7 mg y se disuelven en 2 mL de D<sub>2</sub>O, haciendo uso de ultrasonidos y calor para favorecer la solubilidad; y disoluciones 4 mM de *m*-**RB**·4TFA y *o*-**RB**·4TFA, disolviendo en ambos casos 4.22 mg del macrociclo en 1 mL de D<sub>2</sub>O, ambas de color amarillento.

En un tubo de RMN, se añaden 250 μL de la disolución *stock* de *o*-**RB**·4TFA y 250 μL de la disolución *stock* de 1,5-DHN para tener una concentración final de 2 mM. En otro tubo, se repite el mismo procedimiento pero haciendo uso de la disolución *stock* de *m*-**RB**·4TFA. En este caso, se observa un cambio de color a amarillo oscuro, lo cual puede ser resultado de una reacción de transferencia de carga consecuencia de la complejación.



**1,5-DHN** $\subset$ *o*-**RB**·4TFA (no se forma complejo).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 8.48 (s ancho, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.98 (s ancho, 2H), 7.90 (d,  $J = 7.3$  Hz, 4H), 7.81 (s, 3H), 7.61 (s ancho, 1H), 7.49 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 6.93 (s ancho, 1H), 4.38 (s, 4H), 4.05 (m, 4H), 3.77 (s, 9H).

**1,5-DHN** $\subset$ *m*-**RB**·4TFA:  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 8.81 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H), 8.44 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 8.32 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 7.98 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.83 (m, 4H), 7.72 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H), 7.59 (s, 1H), 7.33 (s, 2H), 7.14 (s, 2H), 6.85 (s ancho, 1H), 6.44 (d,  $J = 7.7$  Hz, 3H), 5.82 (s, 4H), 5.54 (s, 4H), 4.19 (s, 5H), 3.92 (s, 5H), 3.81 (d,  $J = 7.2$  Hz, 10H).

#### 4.2.6. Estudio mediante $^1\text{H}$ RMN del complejo de inclusión de **1,5-DHN** $\subset$ *m*-**RB**·4TFA en medio ácido (pD = 6.3) y básico (pD = 10.9)

Se preparan una disolución *stock* 2 mM de *m*-**RB**·4TFA en medio ácido y básico. En medio ácido, se disuelven 7.4 mg de *m*-**RB**·4TFA en 3.5 mL de tampón a pD = 6.3 ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  20 mM acidificado con DCl). A 3 mL de la disolución *stock* de *m*-**RB**·4TFA se le añaden 7.4 mg de 1,5-DHN (8 mM). En medio básico, se disuelven 7.4 mg de *m*-**RB**·4TFA en 3.5 mL de tampón a pD = 10.9 ( $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  20 mM acidificado con DCl). A 3.0 mL de dicha disolución, se añaden 7.4 mg de 1,5-DHN (8 mM).

En un tubo de RMN, se parte de 400  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* 2 mM de *m*-**RB**·4TFA en  $\text{D}_2\text{O}$ . Tras registrar el espectro de dicha disolución, se continua con la adición, de 20 en 20  $\mu\text{L}$ , de la disolución mezcla de *m*-**RB**·4TFA y 1,5-DHN, de forma que la concentración del macrociclo permanece constante y se va aumentando la concentración de sustrato. Una vez pasado un equivalente de sustrato, se añaden 50  $\mu\text{L}$  (4 adiciones), 100  $\mu\text{L}$  y 300  $\mu\text{L}$  (3 adiciones).

#### 4.2.7. Valoración de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> con TBACl mediante espectroscopia UV-vis en medio orgánico (acetona)

Se prepara una disolución *stock* 2 mM de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> (2.3 mg del macrociclo en 1 mL de acetona) y una disolución *stock* de TBACl 5 mM (13.9 mg de TBACl en 10 mL de acetona). A continuación, se diluyen las disoluciones *stock* iniciales para obtener 12 mL de disolución 5  $\mu\text{M}$  de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> y 10 mL de disolución TBACl 250  $\mu\text{M}$  (al añadir 0.5 mL de la disolución *stock* de TBACl a 9.5 mL de disolución 5  $\mu\text{M}$  de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub>). Así, en una cubeta de UV-vis, se añaden 2.5 mL de disolución 5  $\mu\text{M}$  de

*o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> y, tras registrar el espectro UV-vis, se va adicionando, de 10 en 10 μL, a partir de 2 equivalentes de TBACl de 20 en 20 μL y de 30 en 30 μL (tras 2.5 equivalentes de TBACl).

#### 4.2.8. Valoración de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> con TBACl mediante <sup>1</sup>H RMN en CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>

En primer lugar, se prepara una disolución 2.25 mM de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub>, al disolver 5.9 mg del macrociclo en 2.2 mL de acetona deuterada, y una disolución de TBACl 13.6 mM, al disolver 6.8 mg de TBACl en 1.8 mL de disolución 2.25 mM de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub>. En un tubo de RMN, se añaden 400 μL de la disolución 2.25 mM de *o*-**RB**·4PF<sub>6</sub> y, una vez registrado el espectro, se va adicionando la disolución de TBACl de 20 en 20 μL hasta los 1.25 equivalentes, de 50 en 50 μL hasta los 2.5 equivalentes, de 100 en 100 μL hasta los 3.5 equivalentes y de 200 en 200 μL hasta 4 equivalentes.

#### 4.3. Cálculos computacionales de los conformeros de *o*-**RB**<sup>4+</sup>

El muestreo conformacional se realizó utilizando el código de libre acceso **CREST** v. 2.11.2.,<sup>28,29</sup> empleando en todos los casos el método cuántico semiempírico **xtb-GFN2**<sup>30</sup> en combinación con el modelo de solvatación implícita **ALPB**<sup>31</sup>. Todos los cálculos de DFT se realizaron utilizando el software **ORCA** v.5.0.3.<sup>32</sup> A fin de refinar el cálculo, el protocolo **CENSO** (*Command-line ENergetic Sorting*)<sup>33,34</sup> para calcular la energía libre de cada especie *i*,  $G_i$ , se considera la **Ecuación 1**:

$$G_i = E_{i,gas} + \delta G_{isolv} + G_{i,trv} \quad \text{Ecuación 1}$$

Se calculan las contribuciones  $E_{i,gas}$ ,  $\delta G_{isolv}$  y  $G_{i,trv}$  con la aproximación de Grimme (mRRHO):

- **Parte 0 (Preselección económica):** Se calculan  $E_{i,gas}$  mejoradas mediante cálculos de punto simple **DFT** para todas las estructuras del **CC** (nivel B97-D3(0)/def2-SV(P)+gCP). Las demás contribuciones se consideran al nivel de cálculo semiempírico **xtb-GFN2/alpb** (acetona). Se descartan aquellas estructuras por encima de  $\Delta G = 4.0$  kcal/mol.
- **Preselección (parte 1)→ :** Se calculan  $E_{i,gas}$  mejoradas mediante cálculos de punto simple **DFT** para todas las estructuras del **CCp0** (en nuestro caso el método compuesto r2scan-3c). Energías de solvatación mejoradas y calculadas mediante cálculos al nivel r2scan-3c/SMD (acetonitrilo).  $G_{i,trv}$  estimadas xtb-

GFN2/alpb(acetona). Se descartan aquellas estructuras por encima de  $\Delta G = 3.5$  kcal/mol.

- **Optimización (parte 2):** Se optimizan las geometrías de CCp1 al nivel de cálculo r2scan-3c.  $\delta G_{isolv}$  es estimada a nivel DFT mediante puntos simples al nivel r2scan-3c/SMD (acetona).  $G_{i,rv}$  estimadas xtb-GFN2/ALPB(acetonitrilo). Se conservan aquellas estructuras cuya  $\Delta G$  complete la distribución de Boltzman a la temperatura dada en un 99 % ( $\Delta G = 2.5$  kcal/mol)
- **Refinamiento (parte 3):** Para una evaluación más precisa de las energías electrónicas estas son calculadas con un funcional híbrido o doble híbrido y un conjunto base suficientemente complejo (en nuestro caso la combinación PW6B96D4/DEF2-TZVP(P))

Los datos obtenidos se pueden consultar en la **Tabla 1**.

## 5. CONCLUSIONES

Considerando los objetivos iniciales y los resultados obtenidos, se pueden llegar a las siguientes conclusiones del presente trabajo:

- Los *bloques de construcción*  $m\text{-HH}^{2+}$  y  $m\text{-HA}^{2+}$  se sintetizaron mediante reacciones  $S_N2$  de forma eficaz, siendo los rendimientos obtenidos superiores al 70 %.
- El ensamblaje de los ciclofanos  $m\text{-RB}^{4+}$  y  $o\text{-RB}^{4+}$  se llevó a cabo al formarse dos nuevos enlaces hidrazona bajo control cinético, de forma eficaz.
- Todos los compuestos no reportados previamente han sido caracterizados por  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  RMN mono y bidimensional y HR-ESI-MS, lo que posibilitó la asignación estructural de los mismos.
- El estudio de la capacidad de complejación mediante  $^1\text{H}$  RMN de  $m\text{-RB}^{4+}$  y  $o\text{-RB}^{4+}$  con 1,5-DHN confirma que  $m\text{-RB}^{4+}$  forma un complejo, tanto a pD básico como ácido, siendo la  $K_a$  del orden de  $10^3\text{-}10^4\text{ M}^{-1}$ . En cambio,  $o\text{-RB}^{4+}$  no compleja con dicho sustrato, por lo que se requieren más estudios con otros sustratos en el futuro.
- Se realizó el estudio de la respuesta de  $o\text{-RB}^{4+}$  ante el ion  $\text{Cl}^-$ , tanto por  $^1\text{H}$  RMN como por ensayos UV-vis, confirmándose la formación de un complejo tipo quelato. Dicho estudio puede extenderse a otros iones y al macrociclo  $m\text{-RB}^{4+}$  en un futuro.

### Conclusions

Considering the initial objectives and the results obtained, the following conclusions can be stated from this project:

- The  $m\text{-HH}^{2+}$  and  $m\text{-HA}^{2+}$  *building blocks* were efficiently synthesized by  $S_N2$  reactions, being the yields obtained greater than 70 %.
- The assembly of the  $m\text{-RB}^{4+}$  and  $o\text{-RB}^{4+}$  cyclophanes was carried out by forming two new hydrazone bonds under kinetic control, efficiently.
- All the compounds not previously reported have been characterized by one and two-dimensional  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR and HR-ESI-MS, which enable their structural assignment.
- The study of the complexation capacity through  $^1\text{H}$  NMR of  $m\text{-RB}^{4+}$  and  $o\text{-RB}^{4+}$  with 1,5-DHN confirms that  $m\text{-RB}^{4+}$  forms a complex, both at basic and acidic pD, with  $K_a$  in the order of  $10^3\text{-}10^4\text{ M}^{-1}$ . In contrast,  $o\text{-RB}^{4+}$  is not able to complex with this substrate, so further studies with different substrates are required in the future.
- The study of the  $o\text{-RB}^{4+}$  response to the  $\text{Cl}^-$  ion corroborates both by  $^1\text{H}$  NMR and UV-vis assays, the formation of a chelate-type complex. This study may be extended to other ions and to the  $m\text{-RB}^{4+}$  macrocycle in the future.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; Wiley: Chichester (Inglaterra), 2000.
- (2) Cragg, P. J. *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*; Wiley: Chichester (Inglaterra), 2005.
- (3) Cram, D. J.; Cram, J. M. Host-Guest Chemistry. *Science*. **1974**, *183*, 803-809.
- (4) Vantomme, G.; Meijer, E. W. The construction of supramolecular systems. *Science*. **2019**, *363* (6434), 1396–1397.
- (5) Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. Self-Assembly at All Scales. *Science*. **2002**, *295* (5564), 2418–2421.
- (6) Zhang, Y.; Qi, Y.; Ulrich, S.; Barboiu, M.; Ramström, O. Dynamic Covalent Polymers for Biomedical Applications. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 489–506.
- (7) Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7794–7839.
- (8) Liu, Z.; Nalluri, S. K. M.; Fraser Stoddart, J. Surveying Macrocyclic Chemistry: From Flexible Crown Ethers to Rigid Cyclophanes. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (9), 2459–2478.
- (9) Blanco-Gómez, A.; Cortón, P.; Barravecchia, L.; Neira, I.; Pazos, E.; Peinador, C.; García, M. D. Controlled binding of organic guests by stimuli-responsive macrocycles. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (12), 3834–3862.
- (10) The Nobel Prize. Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2016. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2016/press-release> (accedido el 15 mayo de 2022).
- (11) Rowan, S. J.; Cantrill, S. J.; Cousins, G. R. L.; Sanders, J. K. M.; Stoddart, J. F. Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **2002**, *41*, 898–952.
- (12) Meyer, C. D.; Joiner, C. S.; Stoddart, J. F. Template-Directed Synthesis Employing Reversible Imine Bond Formation. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1705–1723.
- (13) Belowich, M. E.; Stoddart, J. F. Dynamic Imine Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2003–2024.
- (14) Shang, X. F.; Xu, X. F. The anion recognition properties of hydrazone derivatives containing anthracene. *BioSystems*. **2009**, *96* (2), 165–171.

- (15) Arabahmadi, R.; Orojloo, M.; Amani, S. Azo Schiff bases as colorimetric and fluorescent sensors for recognition of F<sup>-</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> ions. *Anal. Methods*. **2014**, *6* (18), 7384–7393.
- (16) Chowdhury, A. R.; Ghosh, P.; Roy, B. G.; Mukhopadhyay, S. K.; Mitra, P.; Banerjee, P. A simple and dual responsive efficient new Schiff base chemoreceptor for selective sensing of F<sup>-</sup> and Hg<sup>2+</sup>: application to bioimaging in living cells and mimicking of molecular logic gates. *RSC Adv*. **2015**, *5* (76), 62017–62023.
- (17) Molina, P.; Zapata, F.; Caballero, A. Anion Recognition Strategies Based on Combined Noncovalent Interactions. *Chem. Rev*. **2017**, *117* (15), 9907–9972.
- (18) Xiong, S.; Kishore, M. V. N.; Zhou, W.; He, Q. Recent advances in selective recognition of fluoride with macrocyclic receptors. *Coord. Chem. Rev*. **2022**, *461*, 214480–214497.
- (19) Busschaert, N.; Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A. Applications of Supramolecular Anion Recognition. *Chem. Rev*. **2015**, *115* (15), 8038–8155.
- (20) Amendola, V.; Esteban-Gómez, D.; Fabbriizzi, L.; Licchelli, M. What Anions Do to N–H-Containing Receptors. *Acc. Chem. Res*. **2006**, *39* (5), 343–353.
- (21) Wang, H.; Fang, S.; Wu, G.; Lei, Y.; Chen, Q.; Wang, H.; Wu, Y.; Lin, C.; Hong, X.; Kim, S. K.; Sessler, J. L.; Li, H. Constraining Homo- and Heteroanion Dimers in Ultraclose Proximity within a Self-Assembled Hexacationic Cage. *J. Am. Chem. Soc*. **2020**, *142* (47), 20182–20190.
- (22) Asakawa, M.; Dehaen, W.; L'abbé, G.; Menzer, S.; Nouwen, J.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. Improved Template-Directed Synthesis of Cyclobis(Paraquat-p-Phenylene). *J. Org. Chem*. **1996**, *61* (26), 9591–9595.
- (23) Barnes, J. C.; Juríček, M.; Vermeulen, N. A.; Dale, E. J.; Stoddart, J. F. Synthesis of ExnBox Cyclophanes. *J. Org. Chem*. **2013**, *78* (23), 11962–11969.
- (24) Bernardo, A. R.; Stoddart, J. F.; Kaifer, A. E. Cyclobis(Paraquat-p-Phenylene) as a Synthetic Receptor for Electron-Rich Aromatic Compounds: Electrochemical and Spectroscopic Studies of Neurotransmitter Binding. *J. Am. Chem. Soc*. **1992**, *114* (26), 10624–10631.
- (25) García, M. D.; Alvariño, C.; López-Vidal, E. M.; Rama, T.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Complexation of Aromatic Compounds with Self-Assembled PdII and PtII Metallacycles. *Inorg. Chimica Acta*. **2014**, *417*, 27–37.

- (26) Blanco-Gómez, A.; Fernández-Blanco, Á.; Blanco, V.; Rodríguez, J.; Peinador, C.; García, M. D. Thinking Outside the “Blue Box”: Induced Fit within a Unique Self-Assembled Polycationic Cyclophane. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (9), 3959–3964.
- (27) Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Barriada, J. L.; Melle-Franco, M.; Peinador, C.; García, M. D. Thinking Outside the “Blue Box”: From Molecular to Supramolecular pH-Responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (46), 10680–10686.
- (28) Grimme lab – GitHub. Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool. <https://github.com/grimme-lab/crest> (accedido el 10 mayo de 2022).
- (29) Pracht, P.; Bohle, F.; Grimme, S. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 7169-7192.
- (30) Bannwarth, C.; Ehlert, S.; Grimme, S. GFN2-xTB-An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *J. Chem. Theory. Comp.* **2019**, *15*, 1652-1671.
- (31) Ehlert, S.; Stahn, M.; Spicher, S.; Grimme, S. Robust and Efficient Implicit Solvation Model for Fast Semiempirical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 4250-4261.
- (32) Neese, F. Software update: The ORCA program system—Version 5.0. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2022**, e1606.
- (33) Grimme lab – GitHub. CENSO - Commandline ENergetic SOrting of Conformer Rotamer Ensembles. <https://github.com/grimme-lab/CENSO> (accedido el 10 de mayo de 2022).
- (34) Grimme, S.; Bohle, F.; Hansen, A.; Pracht, P.; Spicher, S.; Stahn, M. Efficient Quantum Chemical Calculation of Structure Ensembles and Free Energies for Nonrigid Molecules. *J. Phys. Chem. A.* **2021**, *125* (19), 4039-4054
- (35) Rama, T.; López-Vidal, E. M.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Complexation and Catenation in Aqueous Media Using a Self-Assembled PdII Metallacyclic Receptor. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 9482–9487.
- (36) Cortón, P.; Wang, H.; Neira, I.; Blanco-Gómez, A.; Pazos, E.; Peinador, C.; Li, H.; García, M. D. “The red cage”: implementation of pH-responsiveness within a macrobicyclic pyridinium-based molecular host. *Org. Chem. Front.* **2022**, *9* (1), 81-87.

- (37) Sasaki, S.; Mizuno, M.; Naemura, K.; Tobe, Y. Synthesis and Anion-Selective Complexation of Cyclophane-Based Cyclic Thioureas. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (2), 275–283.
- (38) Cigáň, M.; Jakusová, K.; Gáplovský, M.; Filo, J.; Donovalová, J.; Gáplovský, A. Isatin phenylhydrazones: anion enhanced photochromic behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14* (11), 2064–2073.
- (39) Horváth, M.; Cigáň, M.; Filo, J.; Jakusová, K.; Gáplovský, M.; Šándrik, R.; Gáplovský, A. Isatin pentafluorophenylhydrazones: interesting conformational change during anion sensing. *RSC Adv.* **2016**, *6* (111), 109742–109750.
- (40) Gavette, J. V.; Evoniuk, C. J.; Zakharov, L. N.; Carnes, M. E.; Haley, M. M.; Johnson, D. W. Exploring anion-induced conformational flexibility and molecular switching in a series of heteroaryl-urea receptors. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (7), 2899–2905.
- (41) Emami Khansari, M.; Hasan, M. H.; Johnson, C. R.; Williams, N. A.; Wong, B. M.; Powell, D. R.; Tandon, R.; Hossain, M. A. Anion Complexation Studies of 3-Nitrophenyl-Substituted Tripodal Thiourea Receptor: A Naked-Eye Detection of Sulfate via Fluoride Displacement Assay. *ACS Omega.* **2017**, *2* (12), 9057–9066.
- (42) Wang, Y.; Lin, H.; Shao, J.; Cai, Z.-S.; Lin, H. K. A phenylhydrazone-based indole receptor for sensing acetate. *Talanta.* **2008**, *74* (5), 1122–1125.



ANEXOS

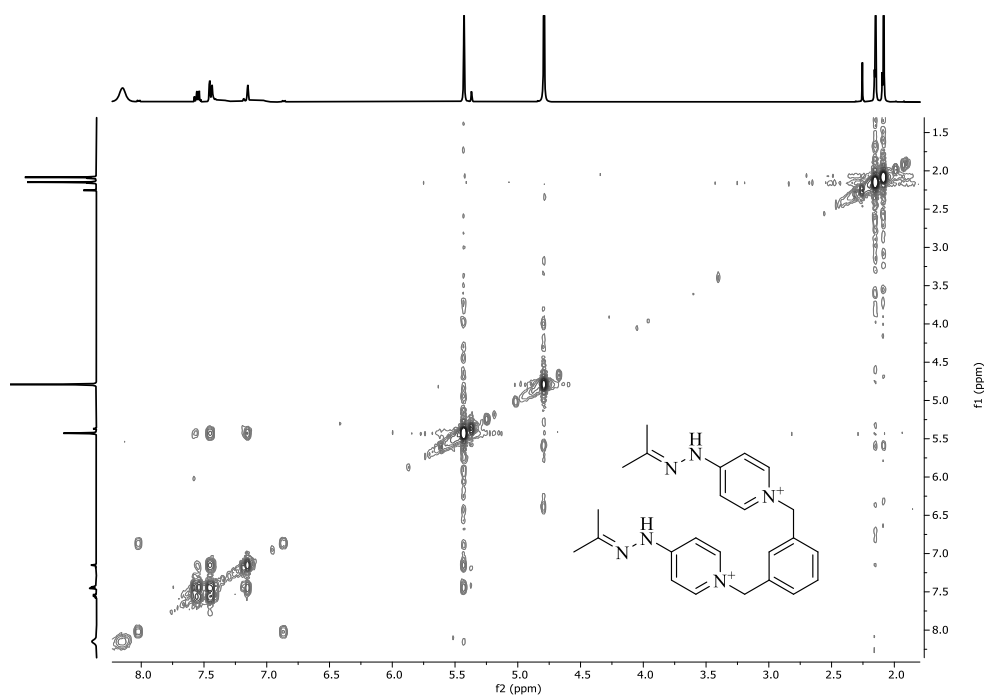


Figura 25. Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) de *m*-HH<sup>2+</sup>.

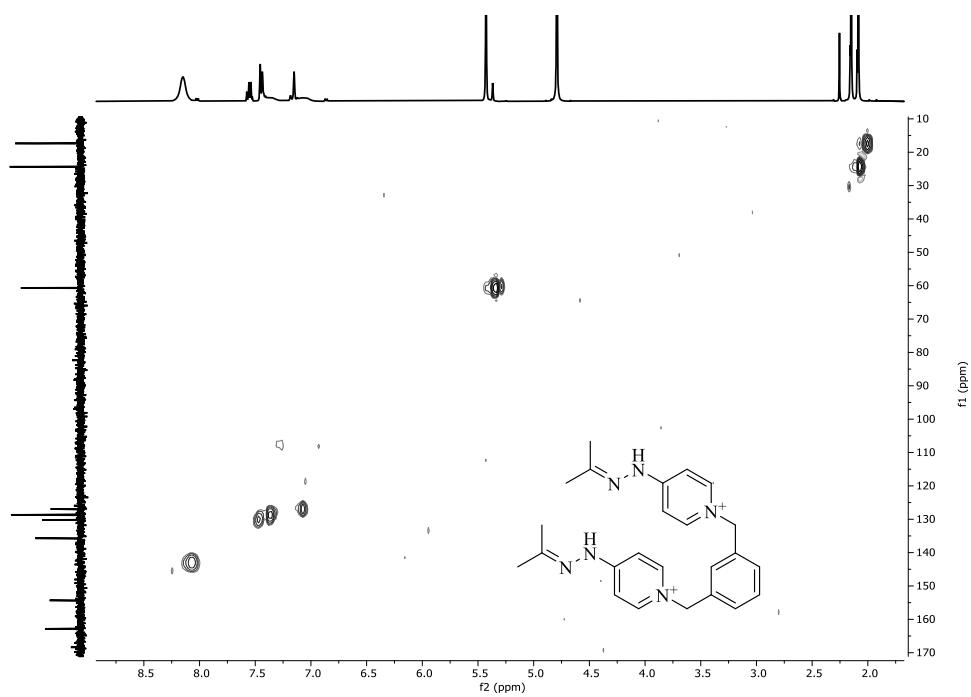
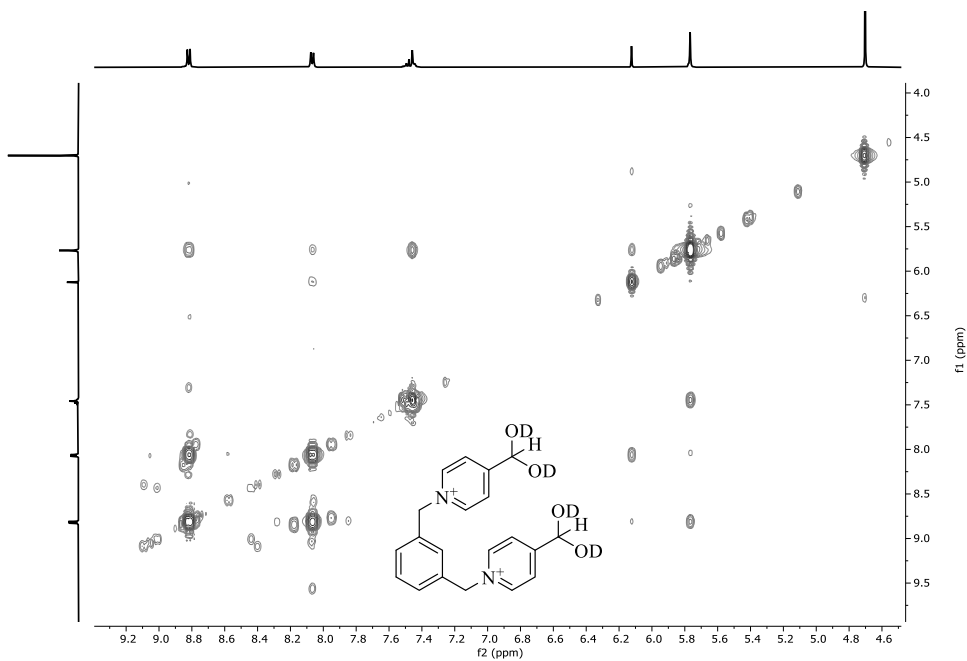
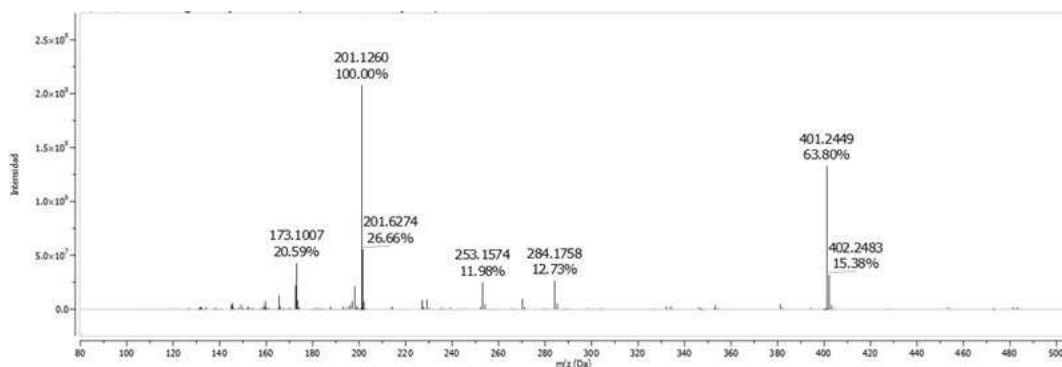
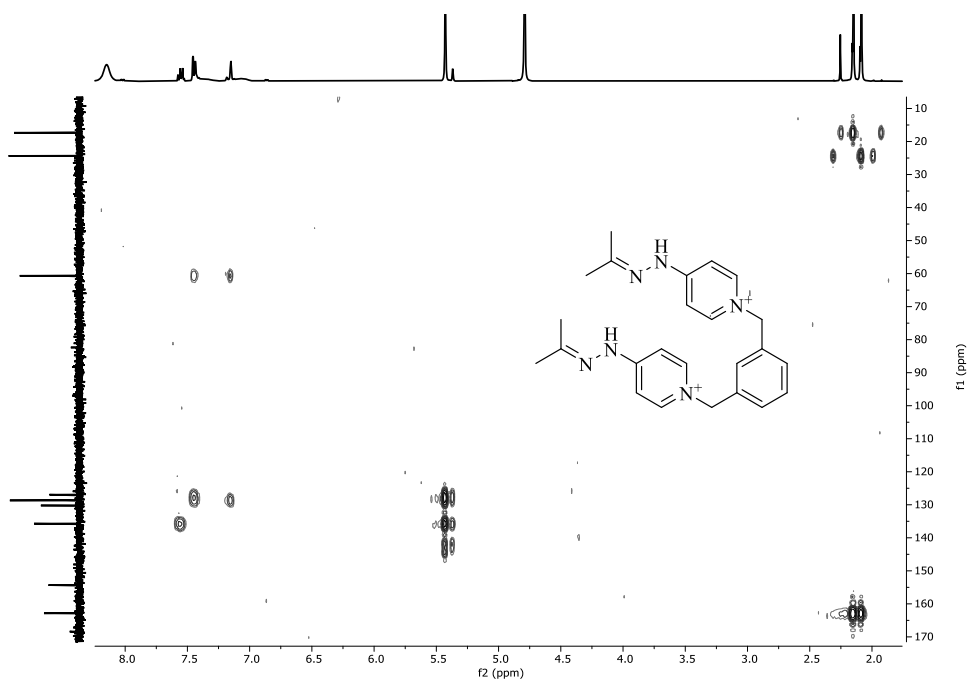


Figura 26. Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 400/101 MHz) de *m*-HH<sup>2+</sup>.



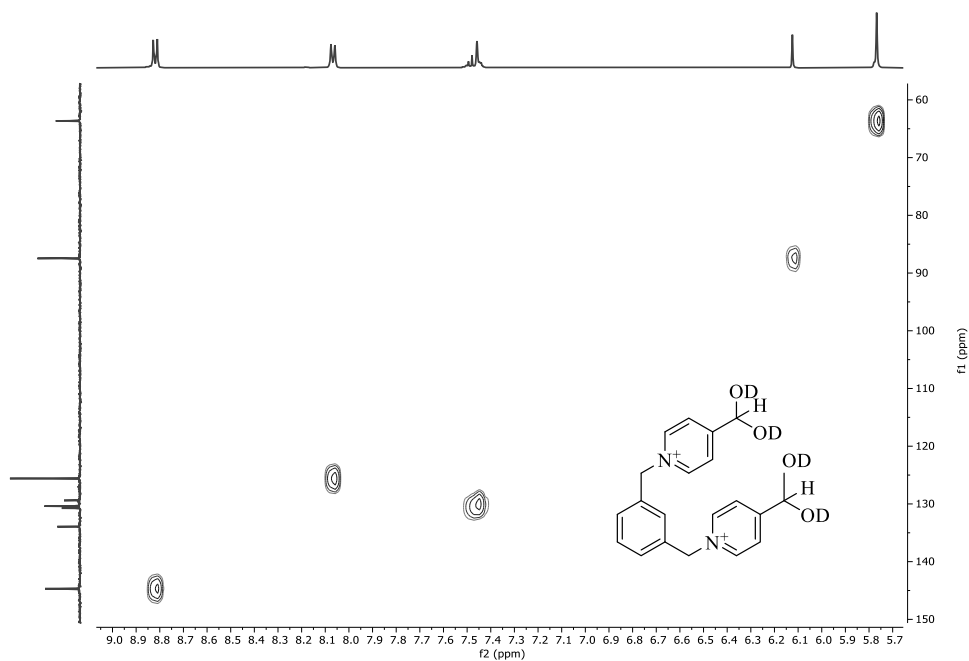


Figura 30. Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 400/101 MHz) de *m*-HA<sup>2+</sup>.

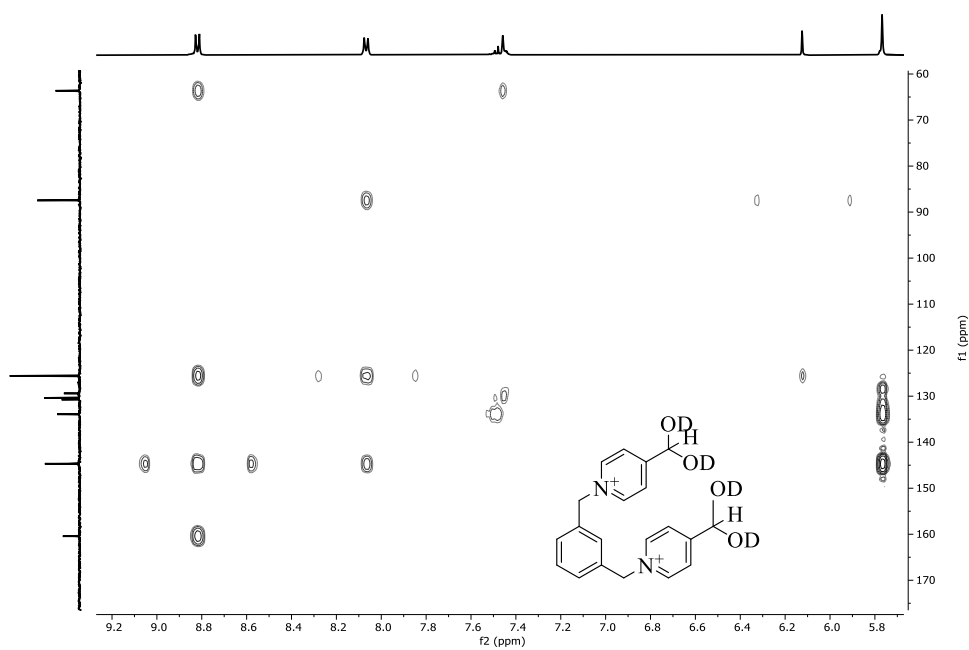


Figura 31. Espectro HMBC (D<sub>2</sub>O, 400/101 MHz) de *m*-HA<sup>2+</sup>.

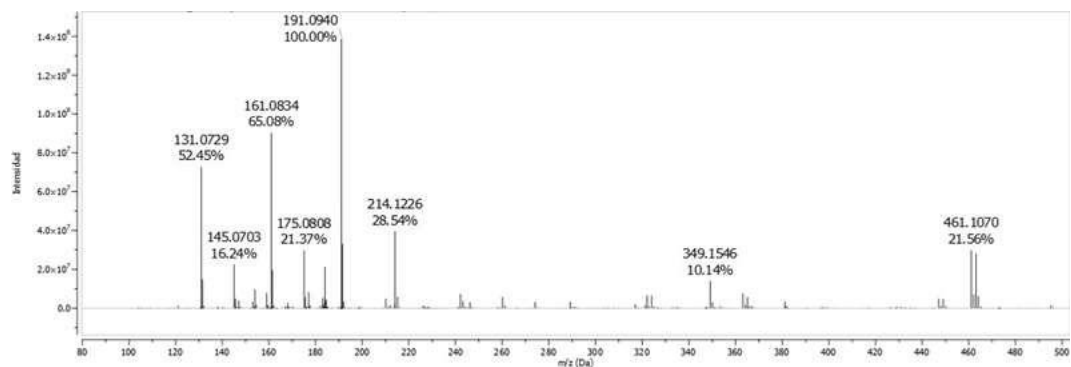


Figura 32. Espectro HR-ESI-MS de *m*-HA<sup>2+</sup>.

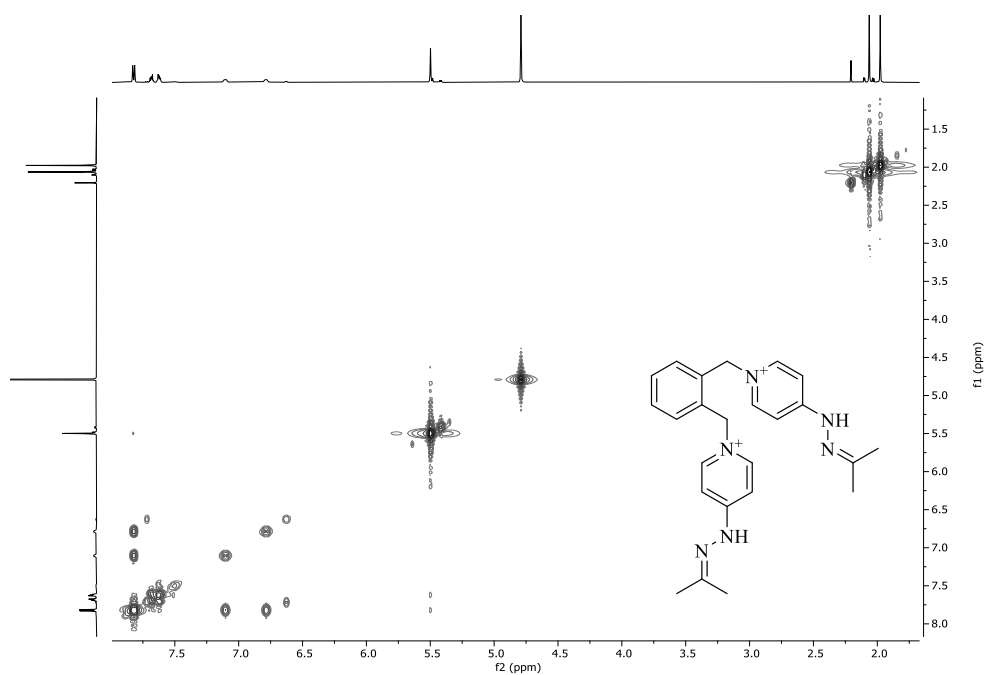


Figura 33. Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de *o*-HH<sup>2+</sup>.

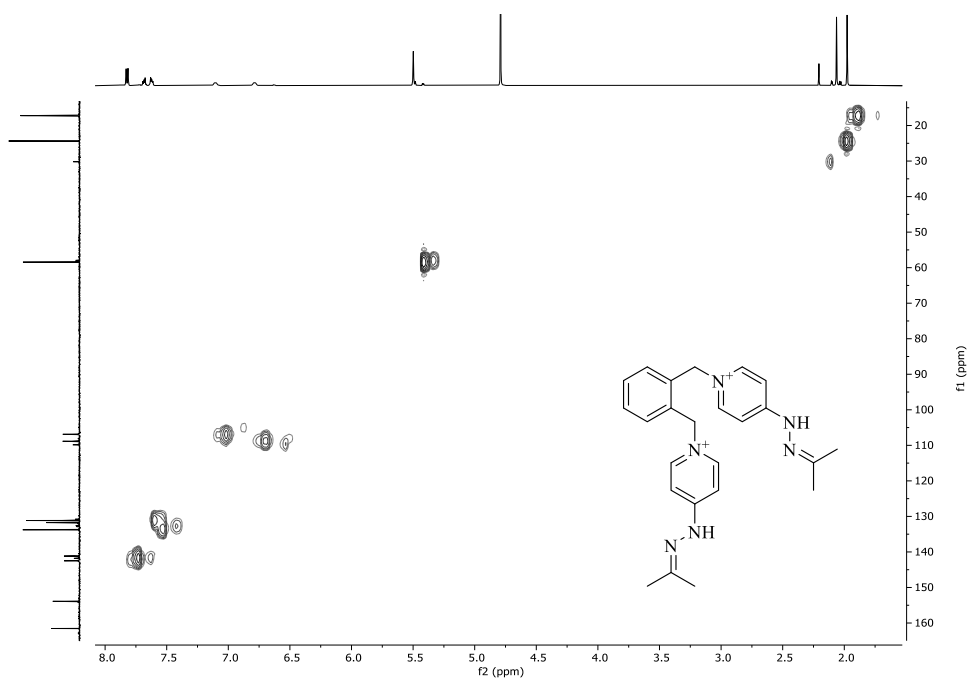


Figura 34. Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500/126 MHz) de *o*-HH<sup>2+</sup>.

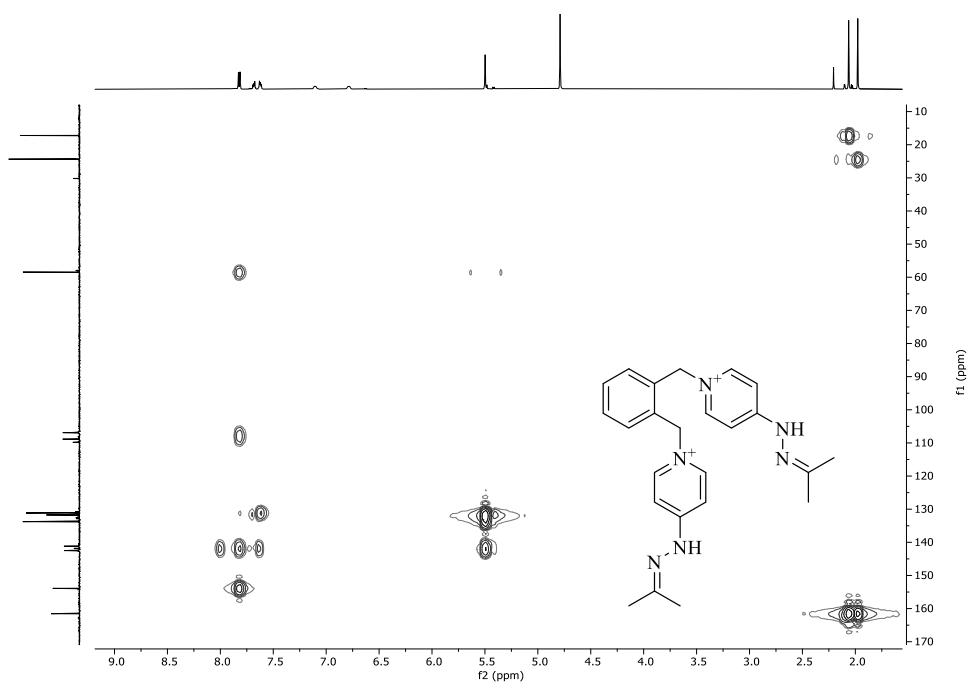


Figura 35. Espectro HMBC ( $D_2O$ , 500/126 MHz) de  $o\text{-HH}^{2+}$ .

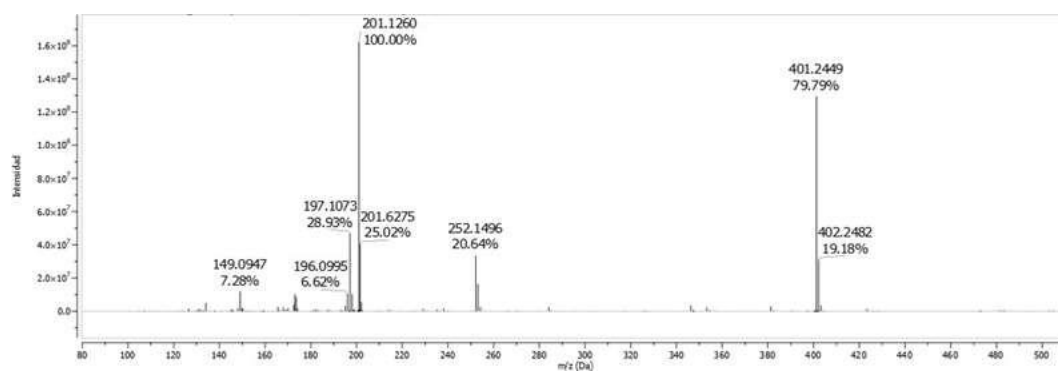


Figura 36. Espectro HR-ESI-MS de  $o\text{-HH}^{2+}$ .

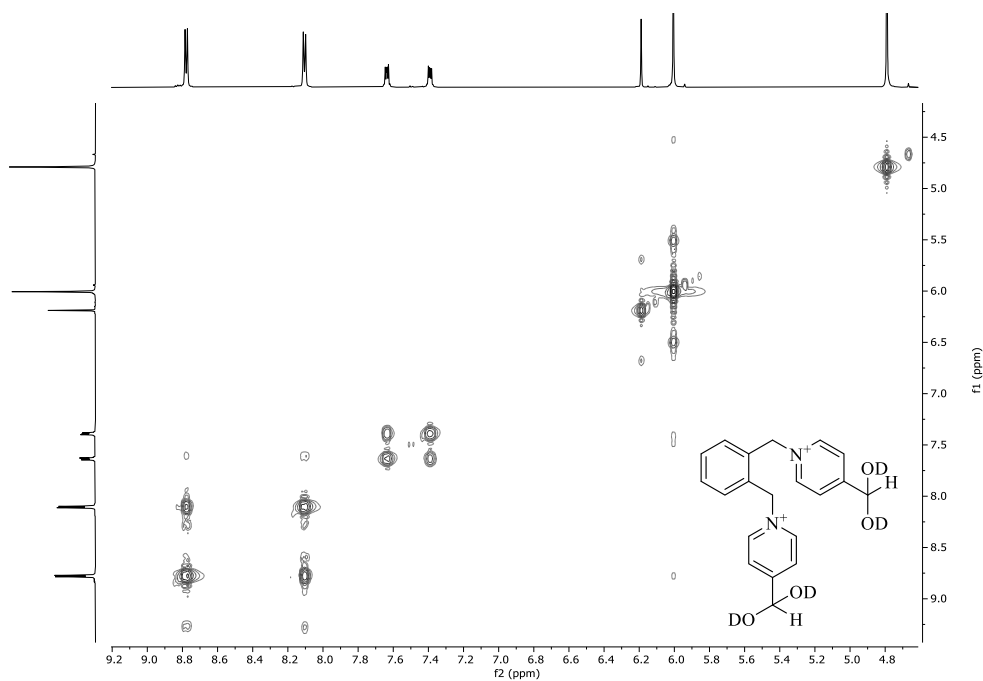


Figura 37. Espectro COSY ( $D_2O$ , 500 MHz) de  $o\text{-HA}^{2+}$ .

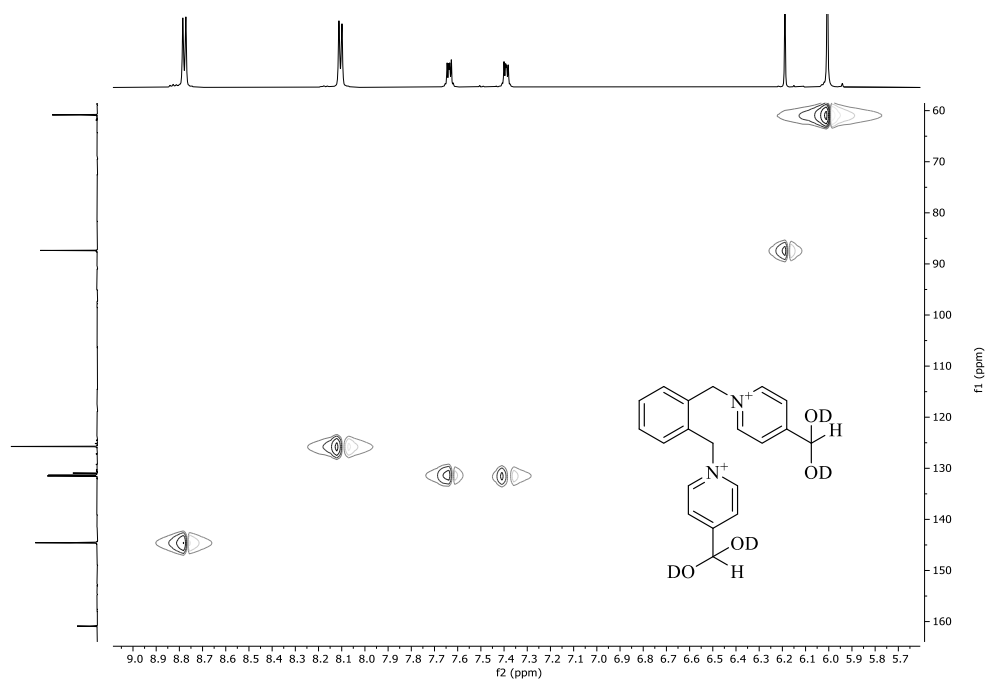


Figura 38. Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500/126 MHz) de *o*-HA<sup>2+</sup>.



Figura 39. Espectro HMBC (D<sub>2</sub>O, 500/126 MHz) de *o*-HA<sup>2+</sup>.

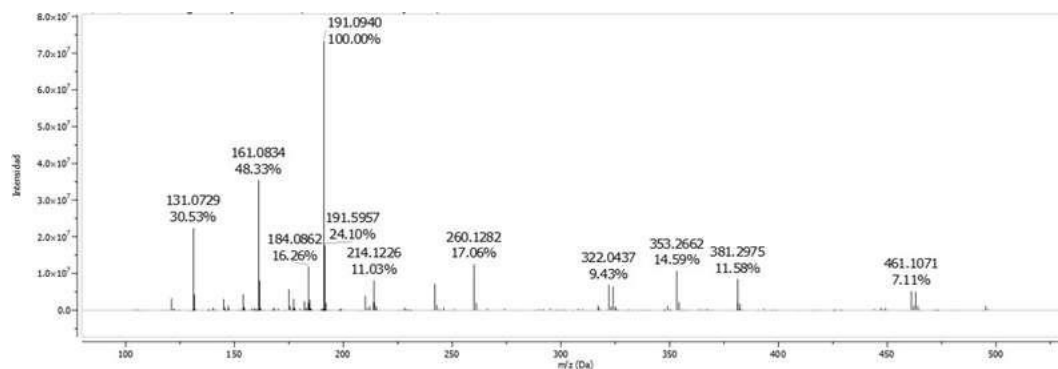


Figura 40. Espectro HR-ESI-MS de *o*-HA<sup>2+</sup>.

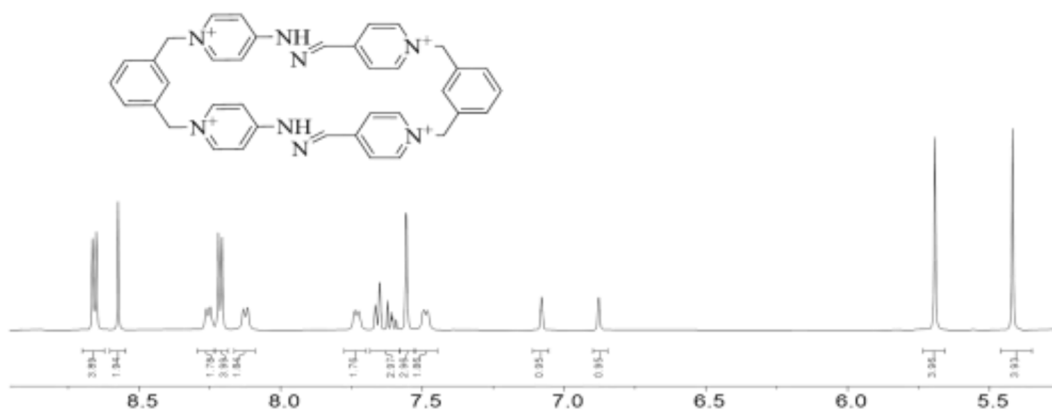


Figura 41. Espectro <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup>.

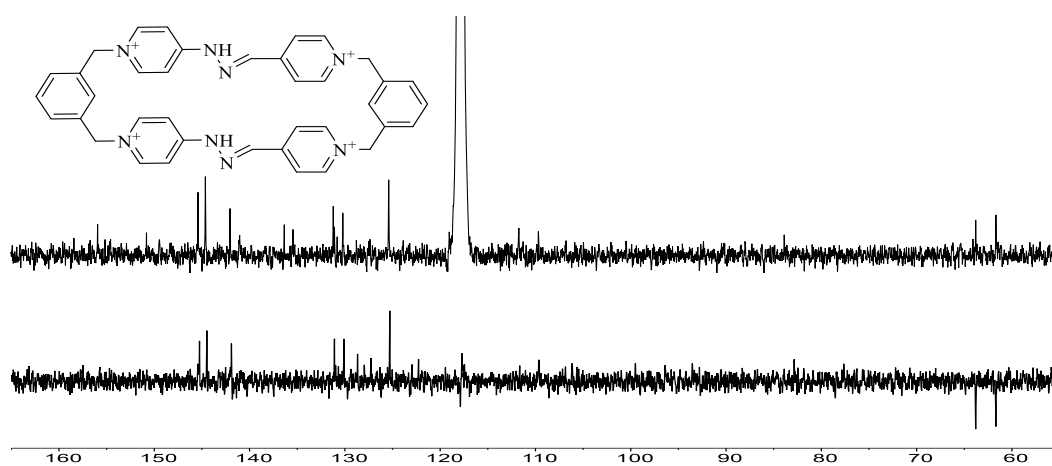


Figura 42. Espectro <sup>13</sup>C RMN/DEPT (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup>.

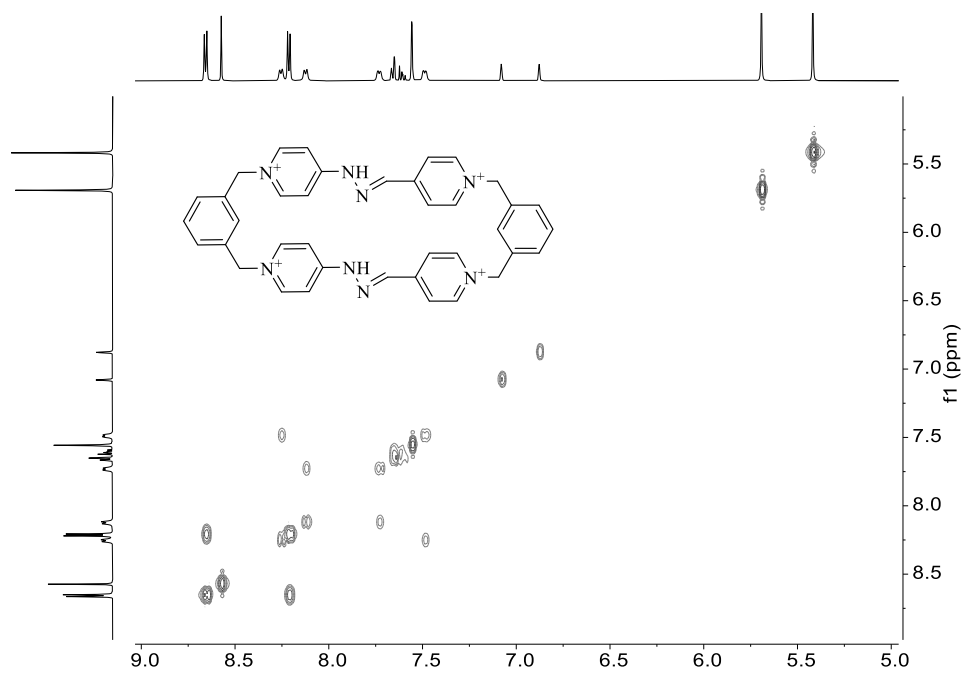


Figura 43. Espectro COSY (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup>.

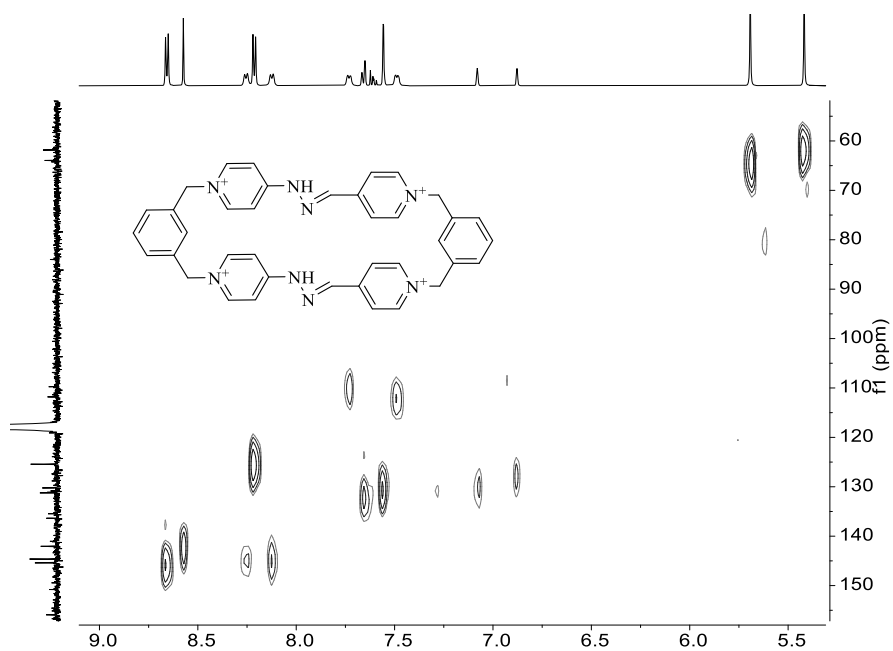


Figura 44. Espectro HSQC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500/126 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$ .

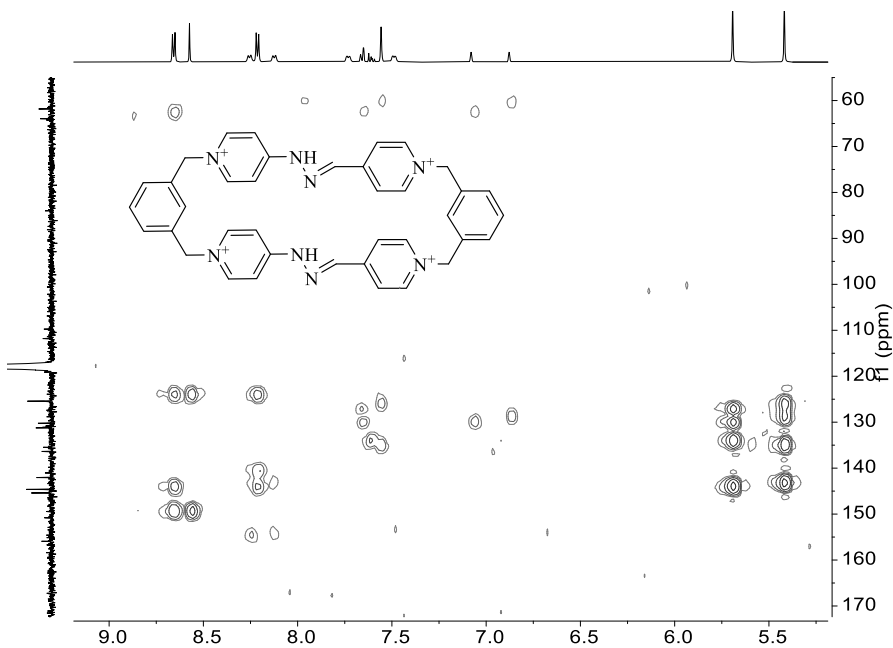


Figura 45. Espectro HMBC ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500/126 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$ .

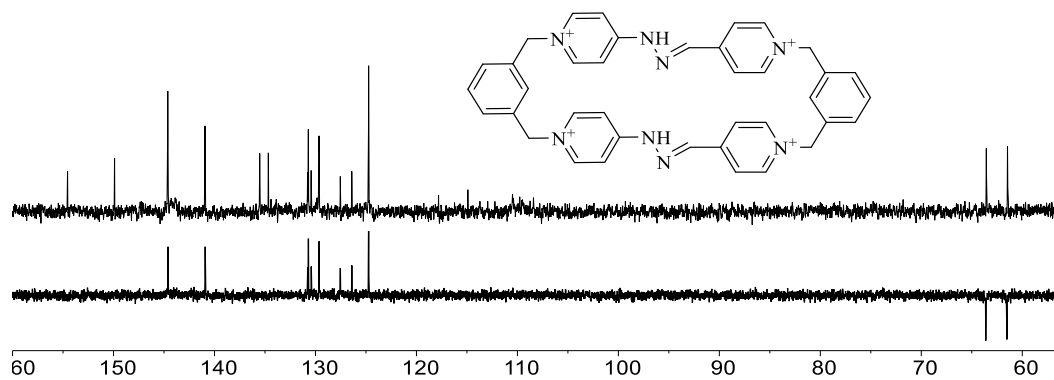


Figura 46. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN/DEPT ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$ .



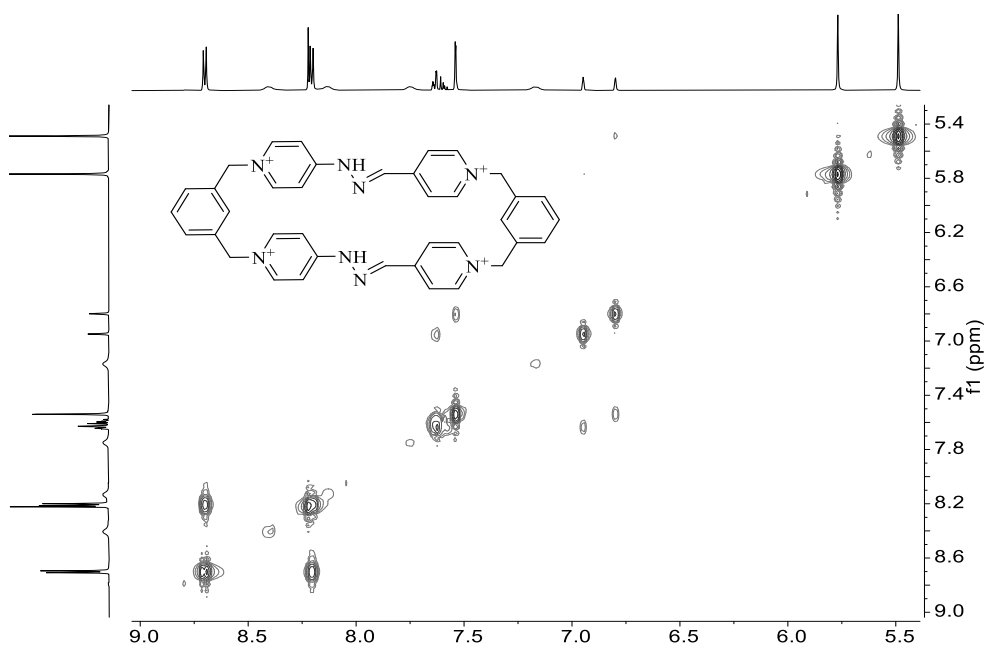


Figura 47. Espectro COSY (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup>.

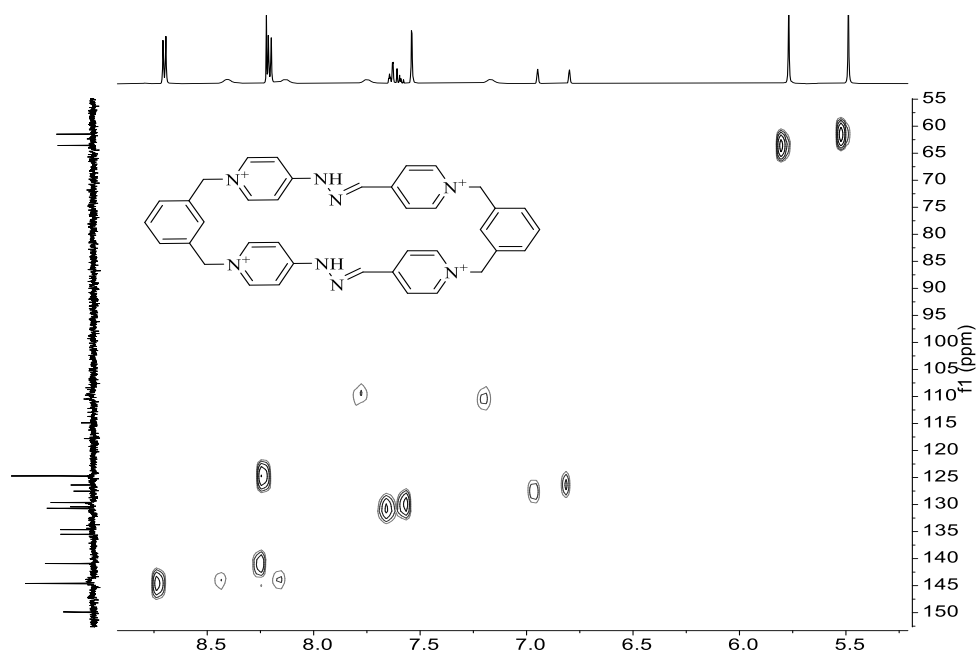


Figura 48. Espectro HSQC (D<sub>2</sub>O, 500/126 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup>.

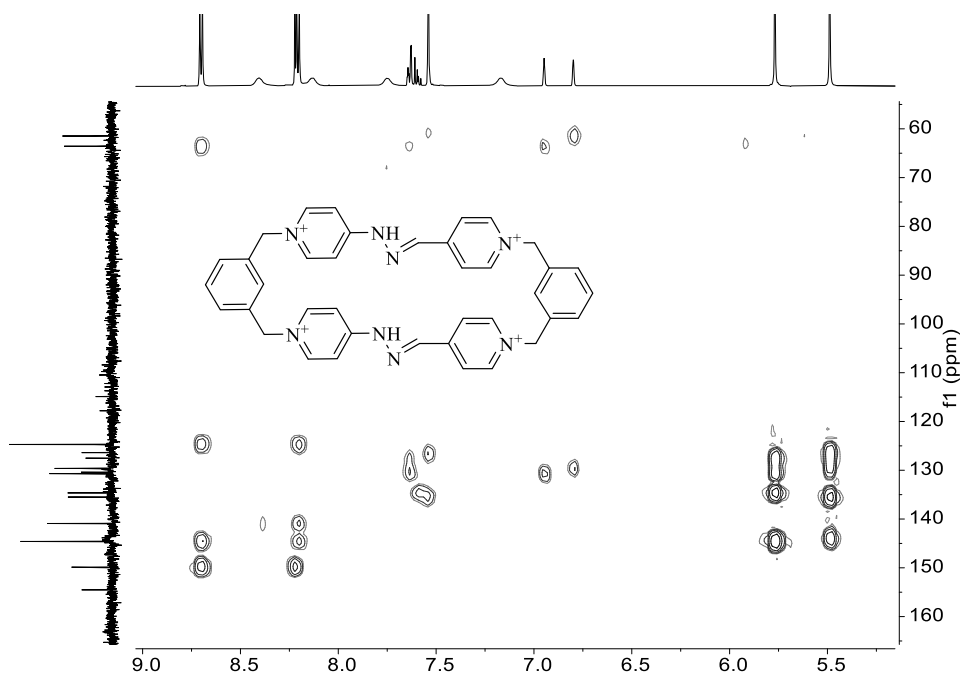


Figura 49. Espectro HMBC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500/126 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$ .

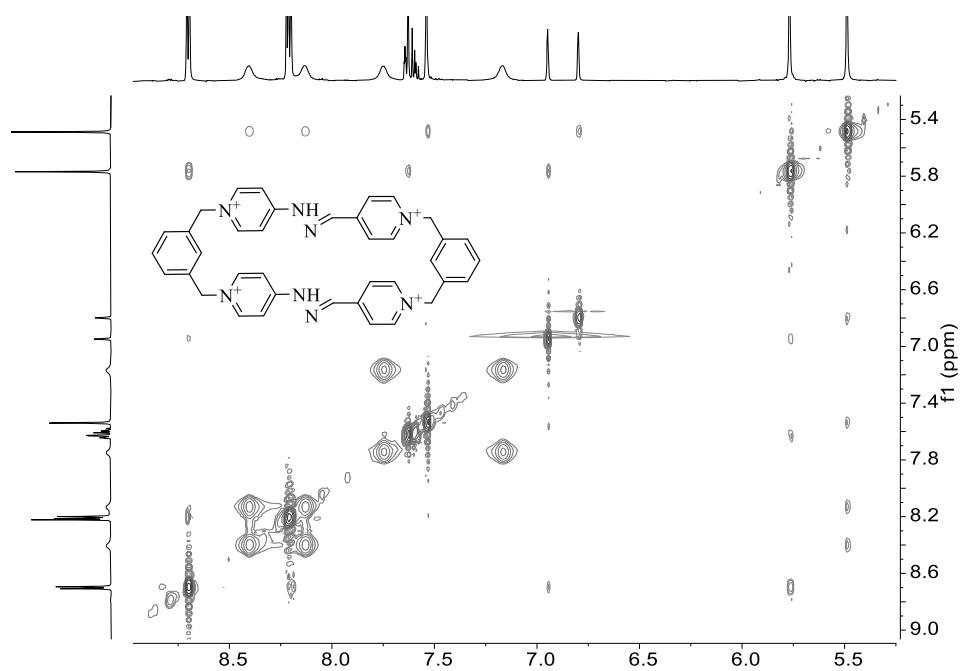


Figura 50. Espectro EXSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500/126 MHz) de  $m\text{-RB}^{4+}$ .

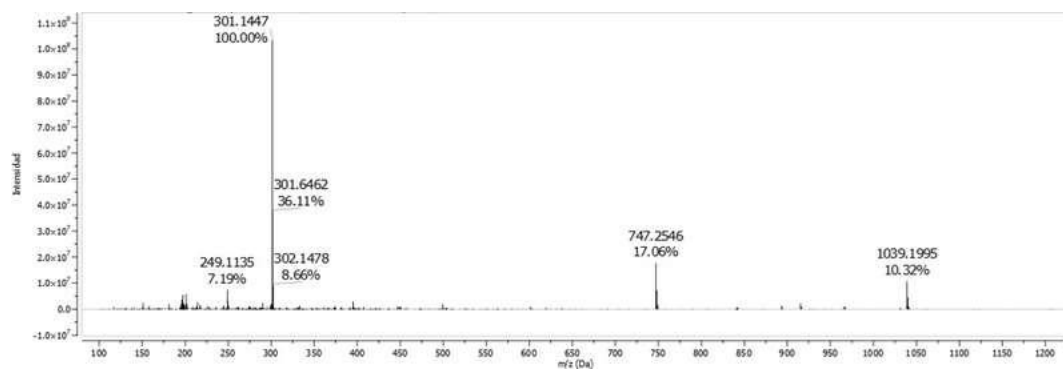


Figura 51. Espectro HR-ESI-MS  $m\text{-RB}^{4+}$ .

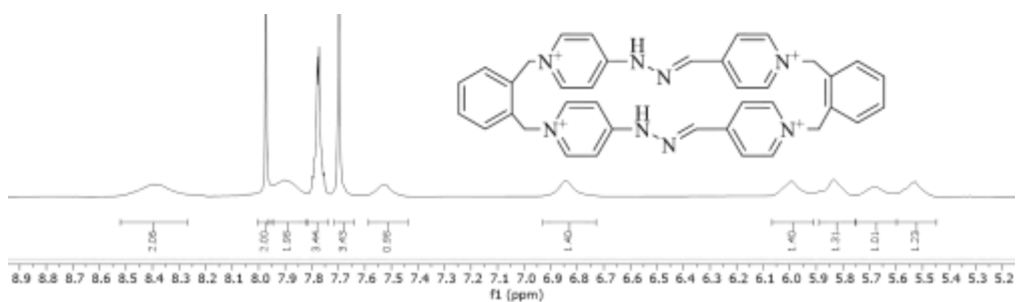


Figura 52. Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$ .

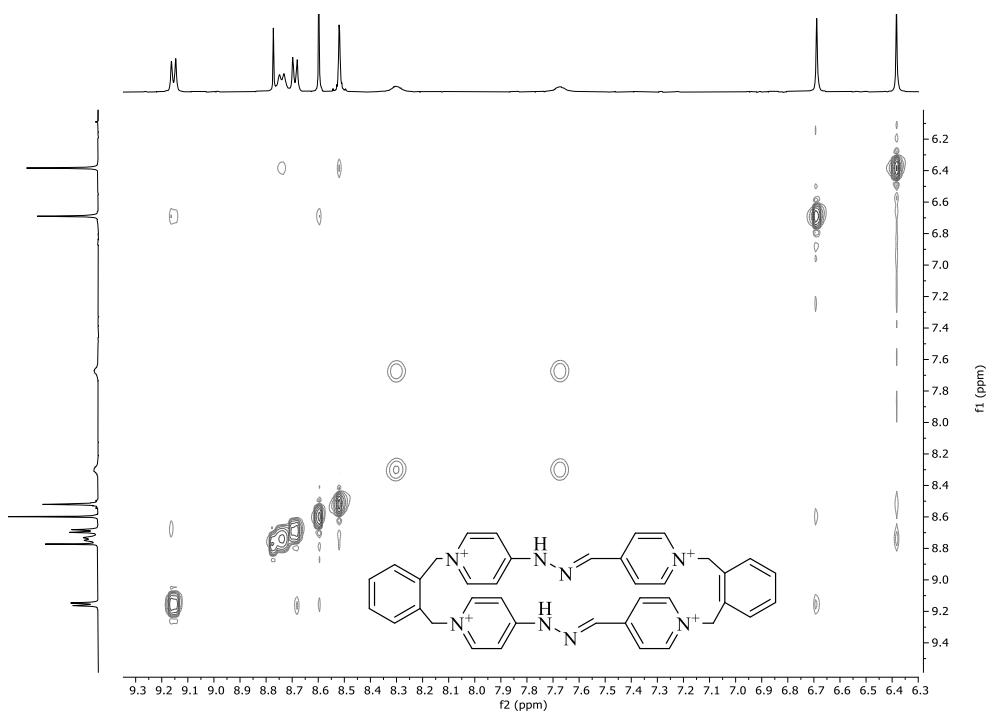


Figura 53. Espectro EXSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 95 °C, 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$ .

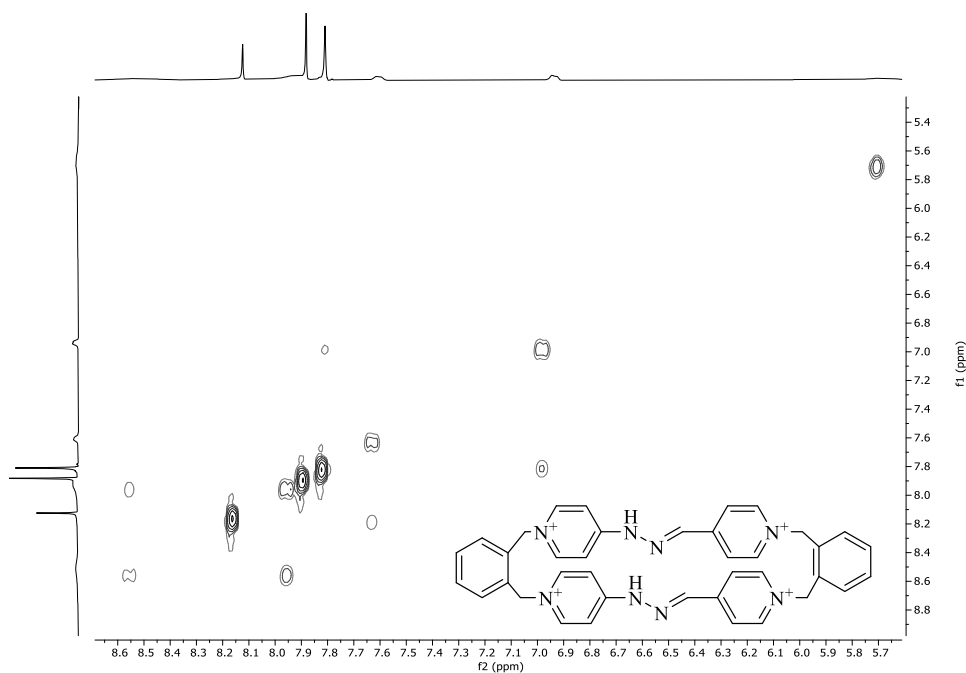


Figura 54. Espectro COSY ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 70 °C, 500 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$ .

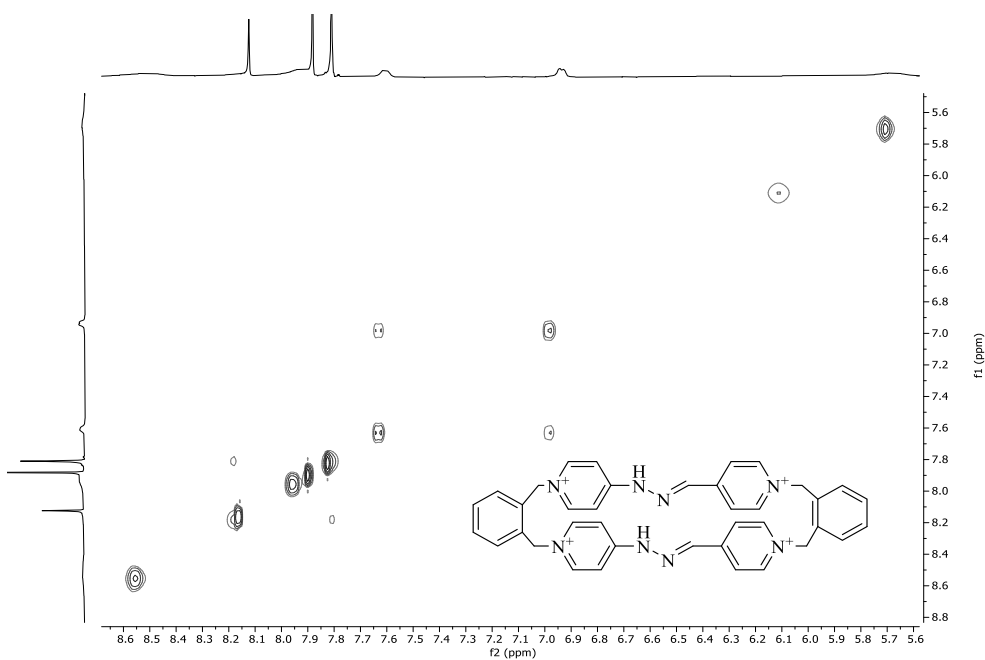


Figura 55. Espectro EXSY (CD<sub>3</sub>CN, 70 °C, 500 MHz) de *o*-RB<sup>4+</sup>.

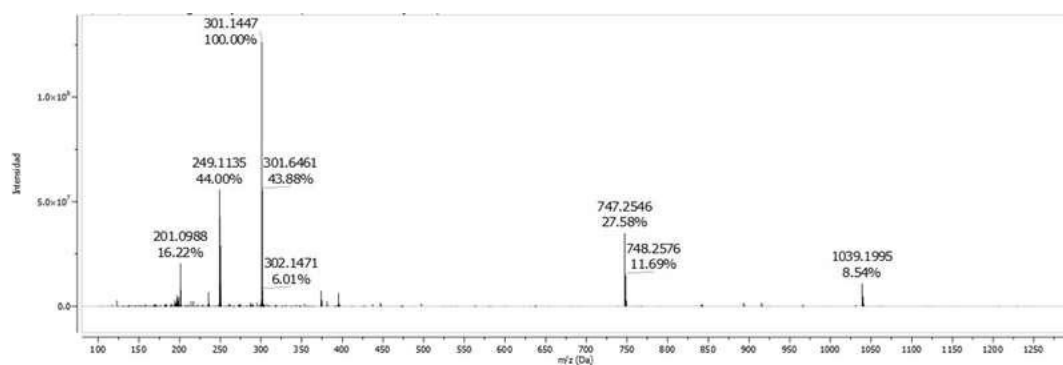


Figura 56. Espectro HR-ESI-MS de *o*-RB<sup>4+</sup>.

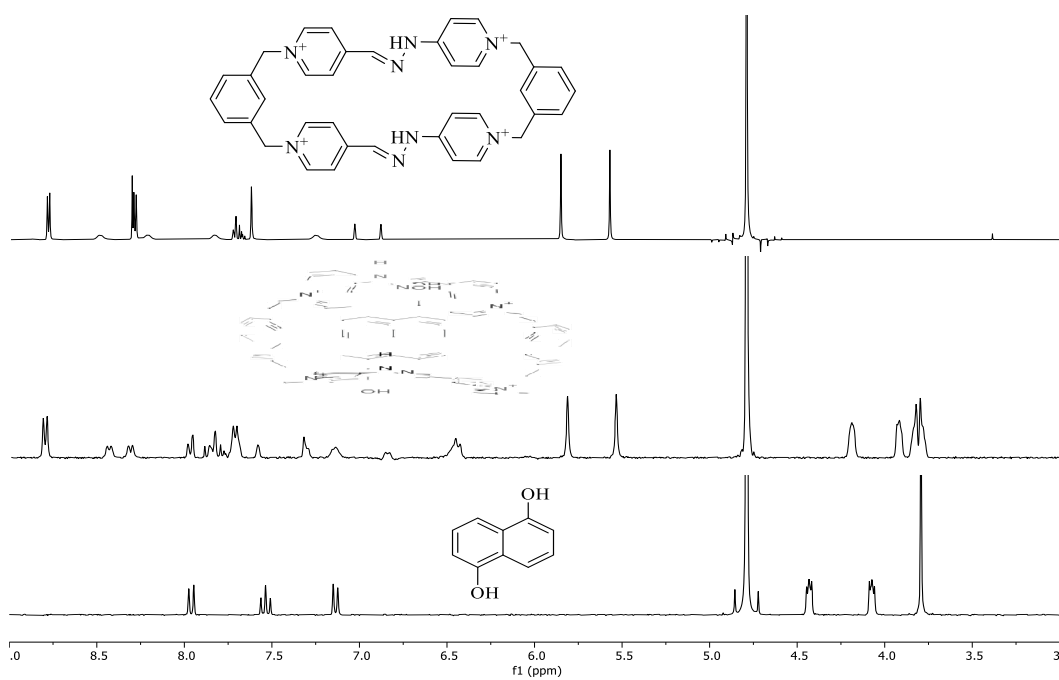


Figura 57. Espectros de <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) de *m*-RB<sup>4+</sup> (arriba), 1,5-DHNC*m*-RB<sup>4+</sup> (medio) y 1,5-DHN (abajo)

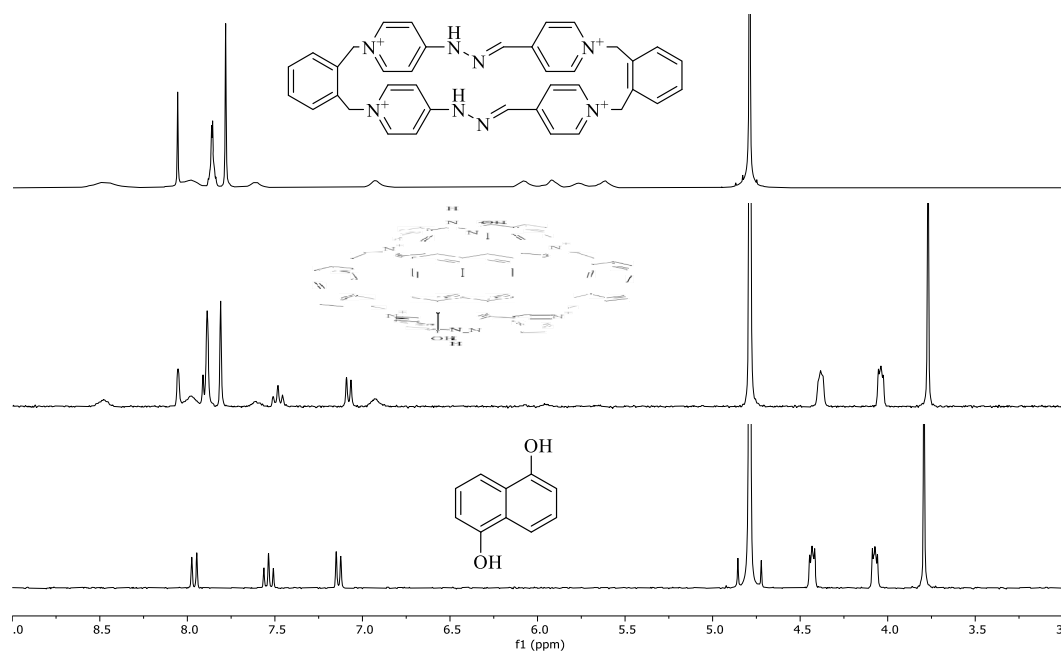
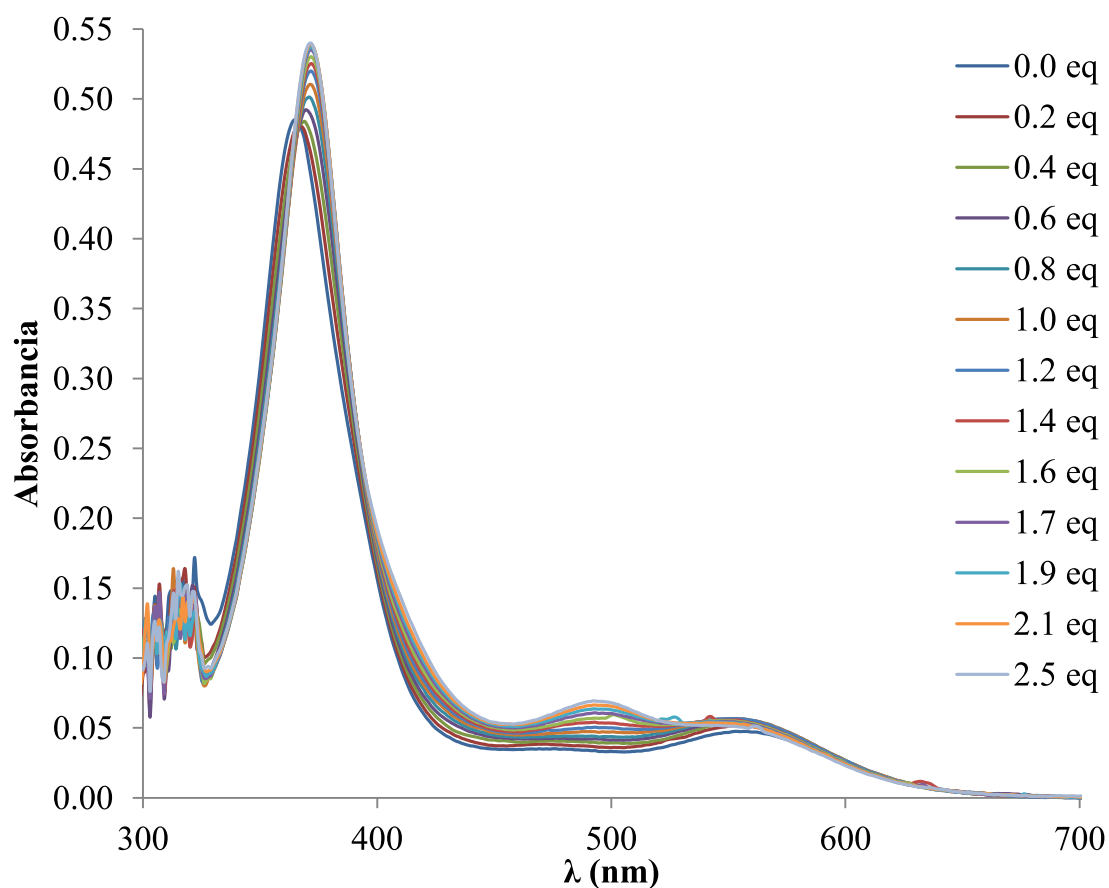


Figura 58. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) de  $o\text{-RB}^{4+}$  (arriba), 1,5-DHN y  $o\text{-RB}^{4+}$  (medio) y 1,5-DHN (abajo)

[1,5-DHN] (mM)	eq. (1,5-DHNc)	pD 6.3		pD 10.9	
		$\delta\text{H}_9$ (ppm)	Residual $\text{H}_9$	$\delta\text{H}_9$ (ppm)	Residual $\text{H}_9$
0.00	0.00	8.4339	0.0000	8.1750	-0.0029
0.20	0.10	8.3470	0.0229	8.1140	-0.0107
0.38	0.19	8.2220	-0.0040	8.0860	0.0086
0.73	0.36	8.0500	0.0114	7.9990	0.0109
1.04	0.52	-	-	7.9260	0.0049
1.33	0.67	7.7396	0.0006	7.8530	-0.0054
1.60	0.80	7.6189	-0.0057	7.7770	-0.0071
1.85	0.92	7.5289	-0.0114	7.7450	-0.0098
2.07	1.04	7.4843	-0.0024	7.7120	0.0060
2.58	1.29	7.4374	0.0171	7.6800	0.0084
3.00	1.50	7.4060	0.0098	7.6600	0.0047
3.36	1.68	7.3883	0.0039	7.6440	0.0014
3.68	1.84	7.3720	-0.0054	7.6330	0.0020
4.19	2.10	7.3650	-0.0049	7.6250	0.0008
4.92	2.46	7.3568	-0.0064	7.6160	-0.0065
5.61	2.81	7.3568	-0.0025	7.6040	-0.0053
6.05	3.02	7.3568	-0.0007	7.6030	-0.0029

Tabla 2. Valores experimentales del desplazamiento ( $\delta$ , ppm) de las señales de  $^1\text{H}$  RMN de  $\text{H}_9$  en la valoración del macrociclo  $m\text{-RB}^{4+}$  (2 mM) con cantidades crecientes del sustrato 1,5-DHN (0-3.0 equivalentes) a pD 6.3 (ácido) y pD 10.9 (básico) en  $\text{D}_2\text{O}$ .



Gráfica 5. Espectros de UV-vis (300-700 nm,  $\lambda_{exc} = 310$  nm) resultado de las adiciones de TBACl (0-2.5 equivalentes) a una disolución de *o*-RB<sup>4+</sup> (5 μM) en acetona.

eq. (TBACl)	[TBACl] (μM)	Abs (372 nm)	Residuales
0.00	0.00	0.4519	-3.19E-04
0.20	1.00	0.4655	3.34E-04
0.40	1.98	0.4778	-1.34E-05
0.59	2.96	0.4903	2.51E-04
0.79	3.94	0.5013	8.59E-05
0.98	4.90	0.5101	-5.14E-04
1.17	5.86	0.5194	4.50E-04
1.36	6.81	0.5243	-7.23E-04
1.55	7.75	0.5293	-5.72E-04
1.74	8.69	0.5346	9.69E-04
1.92	9.62	0.5364	5.05E-04
2.11	10.54	0.5386	5.72E-04
2.47	12.36	0.5396	-1.02E-03

Tabla 3. Valores experimentales de absorbancia ( $\lambda = 372$  nm) de la valoración del macrociclo *o*-RB<sup>4+</sup> (5 μM) con cantidades crecientes de TBACl (0-2.5 equivalentes) en ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO).

eq. (TBACl)	[TBACl] mM	$\delta H_8$ (ppm)	Residual $H_8$
0.00	0.00	8.2587	-0.0003
0.13	0.29	8.2919	-0.0040
0.24	0.55	8.3203	0.0023
0.35	0.78	8.3483	0.0021
0.44	1.00	8.3697	-0.0008
0.53	1.20	8.3862	-0.0005
0.72	1.64	8.4103	-0.0007
0.88	2.00	8.4214	-0.0022
1.02	2.31	8.4266	0.0007
1.14	2.57	8.4300	0.0012
1.33	3.00	8.4345	0.0018
1.47	3.33	8.4370	0.0002
1.59	3.60	8.4387	0.0024
1.77	4.00	8.4406	0.0024
1.89	4.29	8.4404	0.0020

**Tabla 4.** Valores experimentales del desplazamiento ( $\delta$ , ppm) de las señales de  $^1\text{H}$  RMN de  $H_8$  en la valoración del macrociclo  $o\text{-RB}^{4+}$  (2.25 mM) con cantidades crecientes de TBACl (0-1.9 equivalentes) en acetona deuterada.