

Receptores bis-tiourea para la detección y cuantificación de aniones y sales de importancia biológica y ambiental

Bis-thiourea receptors for detection and quantification of anions and salts of biological and environmental importance

Jancarlo Gomez-Vega¹, Ramón Moreno-Corral¹, Enrique de la Re Vega², Hisila Santacruz-Ortega¹, Karen Ochoa Lara^{1*}

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora. Rosales y Encinas s/n, Col. Centro C. P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

² Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora. Rosales y Encinas s/n, Col. Centro C. P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Debido a la importancia de los aniones y diversas sales en la biología y el medio ambiente, existe un gran interés por el reconocimiento molecular de estas especies. Al respecto, la técnica de fluorescencia es una buena herramienta para su detección y cuantificación. En este trabajo, se reporta la síntesis y caracterización de dos nuevos receptores bis-tiourea, **Rec1** y **Rec2**, y los estudios de reconocimiento molecular en DMSO de estos sistemas y los aniones F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, CH₃COO⁻, HSO₄⁻ y H₂PO₄⁻, como sales de tetraalquilamonio. Adicionalmente, se estudiaron las sales de metales alcalinos NaF, NaCl, KCl, LiCl, KI, Na₂HPO₄ y Na₂SO₄ en DMSO:Agua (95:5 v/v). Todos estos estudios se realizaron mediante la técnica de fluorescencia en microplaca. Ambos receptores mostraron mejores afinidades y respuestas espectrales con las sales de aniones básicos. A partir de la respuesta en fluorescencia de **Rec1** y **Rec2**, se obtuvieron los límites de cuantificación y de detección para las sales NaCH₃COO, Na₂SO₄, Na₂HPO₄ y NaF, siendo esta última cuantificable en concentraciones similares a las establecidas en las normas oficiales mexicanas para el agua potable. Por tal razón, la cuantificación del fluoruro por **Rec1** y **Rec2** podría ser aplicada en muestras acuosas y de alimentos.

Palabras Clave: Tioureas; Aniones y sales; Reconocimiento molecular; Fluorescencia en microplaca.

ABSTRACT

Due to the importance of the anions and diverse salts in biology and the environment, there exists a great interest for the molecular recognition of these species. Within this respect, the fluorescence technique is a good tool for their detection and quantification. In this work, we report on the synthesis and characterization of two new bis-thiourea receptors, **Rec1** and **Rec2**, as well as the molecular recognition studies in DMSO between these systems and the anions F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, CH₃COO⁻, HSO₄⁻ and H₂PO₄⁻, as their tetraalkylammonium salts. Additionally, the alkali metal salts NaF, NaCl, KCl, LiCl, KI, Na₂HPO₄ and Na₂SO₄ were studied in DMSO:water (95:5 v/v). All of these studies were performed by the microplate fluorescence technique. Both receptors showed better affinities and spectral responses towards the salts of basic anions. From the fluorescence response of **Rec1**

and **Rec2**, were obtained the quantification and detection limits for NaCH₃COO, Na₂SO₄, Na₂HPO₄ and NaF salts, being this latter quantifiable in similar concentrations to those established by the official Mexican standards for drinking water. Because of this, quantification of fluoride by **Rec1** and **Rec2** could be applied in aqueous and food samples.

Key words: Thioureas; Anions and salts; Molecular recognition; Microplate fluorescence technique.

INTRODUCCIÓN

Debido al importante rol que desempeñan los aniones en diversas áreas tales como en la biología y el medio ambiente, ha habido un gran interés por el reconocimiento molecular de estas especies durante las últimas décadas. Por tal razón, han sido estudiados una gran cantidad de receptores de naturaleza muy diversa para el reconocimiento de aniones. Sin embargo, el diseño de sistemas que puedan reconocer a dichas especies de forma eficiente y selectiva sigue siendo un gran reto en la actualidad (Gale *et al.* 2016; Gale y Caltagirone, 2018). Esto último es debido a las características intrínsecas de los aniones, tales como su gran variedad geométrica, sus altas entalpías de solvatación y a la dependencia de la carga de algunas especies con respecto al pH del medio, entre otros (Pomecko *et al.*, 2010). En cuanto a los receptores reportados para el reconocimiento de aniones, destacan los sistemas neutros basados en grupos amida, urea y tiourea, ya que estas unidades son buenas donadoras de puentes de hidrógeno y por lo tanto, típicamente presentan una gran afinidad por especies aniónicas. Además, dada la naturaleza y los requerimientos geométricos del puente de hidrógeno, los receptores basados en los grupos mencionados tienen la ventaja de que pueden discriminar entre diversos aniones dependiendo de la basicidad y características geométricas de estos (Padghan *et al.*, 2016). Por otro lado, considerando que los aniones siempre están acompañados de un catión como contraión, el desarrollo de receptores que incorporen en su estructura química a dos sitios de unión diferentes, para reconocer simultáneamente al par iónico catión-anión (también denominados "heteroditópicos"), es actualmente un área de investigación de especial relevancia. Esto debido a las ventajas de los sistemas heteroditópicos, tales como la formación de complejos más

estables de aniones (McConnell y Beer, 2012; Mäkelä *et al.*, 2015), así como su potencial capacidad de discriminar sales dependiendo de su naturaleza química. En este contexto, el uso de la técnica de fluorescencia como herramienta para cuantificar y/o sensor cationes, aniones y especies neutras ha sido ampliamente descrito en la literatura (Gale *et al.*, 2016; Gale y Caltagirone, 2018). Al respecto, una estrategia empleada para la transducción del proceso de reconocimiento de aniones es unir covalentemente una unidad fluorófora al sitio de reconocimiento para incrementar la conjugación π , logrando con ello la posibilidad de señalar el proceso de reconocimiento por medio de una transferencia interna de la carga; este proceso se ve facilitado si la interacción con el anión es por puente de hidrógeno (Zhao y Han, 2012; Sahoo *et al.*, 2016). En este trabajo se reporta la síntesis de dos receptores tipo bis-tiourea para el reconocimiento de aniones, los cuales contienen un espaciador poliéter unido a dos anillos aromáticos para posibilitar la interacción con ciertos cationes por medio de interacciones ión-dipolo y catión- π (ver **Figura 1**). En consecuencia, se espera que estos sistemas sean buenos receptores de aniones y de ciertas sales. El diseño de estos también considera la incorporación de dos unidades naftilo para la señalización del proceso de reconocimiento. Asimismo, se reportan los estudios fisicoquímicos y las curvas de calibración para la cuantificación de los aniones y sales en DMSO y DMSO:Agua 95:5 (v/v), mediante la técnica de fluorescencia en microplaca. Los resultados de estos estudios podrían ser aplicados en el desarrollo de nuevas metodologías para la detección y cuantificación de diversos aniones y sales en muestras acuosas y de alimentos, siendo de especial relevancia la cuantificación del anión fluoruro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos para síntesis y estudios en solución

Todos los reactivos fueron comprados a las compañías comerciales Sigma-Aldrich-Fluka, JT Baker y Fermont, y fueron usados sin otro tratamiento adicional. Los reactivos para la síntesis de los receptores fueron KI, K_2CO_3 anhidro, *N,N*-dimetilformamida anhidra (DMF) (99.8%), cloroformo grado reactivo, diclorometano anhidro (99.8%), *N*-(4-hidroxifenil)acetamida (99%), 1,2-bis(2-cloroetoxi)etano (97%), bis[2-(2-cloroetoxi)etil]éter (99%) y 1-naftilisotiocianato (95%). Para los estudios en solución se utilizaron los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) (99.9%), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) (99.9%) y agua desionizada mili Q. Las sales empleadas como huéspedes fueron el fluoruro de tetrametilamonio (FTMA) (97%), cloruro de tetrametilamonio (CTMA) (97%), bromuro de tetrametilamonio (BTMA) (98%), yoduro de tetrametilamonio (ITMA) (99%), bisulfato de tetrametilamonio (BSTMA) (99%), fosfato monobásico de tetrabutilamonio (FosTBA) (99%), acetato de tetrabutilamonio (ATBA) (97%) y las sales de metales alcalinos LiCl (98%), NaCl (99%), Na_2SO_4 (99%), Na_2HPO_4 (99%), KI (98%), KCl (99%).

Equipos utilizados

Los puntos de fusión fueron obtenidos en un equipo marca Büchi modelo Melting point B-545 de 200 W de poten-

cia y termómetro electrónico con un rango de medición de 0 a 400 °C. Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo marca Bruker modelo Avance III 400, a una frecuencia de 400 MHz para 1H y de 100 MHz para ^{13}C . Los espectros de infrarrojo se obtuvieron mediante las técnicas de pastillas de KBr y ATR (*attenuated total reflection*) en un equipo de infrarrojo con transformada de Fourier marca Perkin Elmer modelo Frontier. Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en un equipo lector de microplaca marca Thermo Scientific™ modelo Varioskan Lux equipado con lámpara de Xenón, cuyas mediciones consisten de 1 a 1000 pulsos de luz por medición, dependiendo de la calidad y velocidad de lectura requerida. Las microplacas de polipropileno utilizadas para las mediciones fueron de la marca NUNC, modelo 267342. Los espectros de masas fueron obtenidos en un equipo de cuadrupolo marca Agilent Technologies modelo 6130 utilizando el modo de ionización ESI⁺.

Síntesis de los precursores P4 y P5

La síntesis del precursor **P4** se realizó según lo reportado por Gangadhara *et al.*, 1996. En el caso del receptor **P5** se obtuvo siguiendo la metodología reportada por Ornelas Romo en 2017.

Síntesis de los receptores Rec1 y Rec2

Para la obtención del receptor Rec1 (ver Figura 1), se agregaron 0.113 mmol (37.83 mg) de P4 y 20 ml de diclorometano anhidro en un matraz bola y posteriormente se añadieron 0.263 mmol (48.71 mg) del 1-naftilisotiocianato; tal y como se esquematiza en la Figura 2. La mezcla se mantuvo en agitación vigorosa durante una semana, a temperatura ambiente y bajo una atmósfera inerte de N_2 . Una vez transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente y se obtuvo un sólido al cual se le realizaron lavados repetidos con diclorometano y acetona. Para la obtención de Rec2 se siguió la misma metodología empleada para Rec1, a excepción de que se utilizaron 0.107 mmol (40.28 mg) de P5 y 0.247 mmol (45.82 mg) del 1-naftilisotiocianato. En ambos casos se obtuvieron sólidos color café.

Rec1: Rendimiento: 72.5 mg (90.7 %). Punto de fusión: 100.3-101.9 °C. IR (ATR): 3336, 3053, 2924, 2870, 1657, 1599, 1550, 1509, 1222, 1124, 952, 796, 769 cm^{-1} . RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.70 (s, H-10, 2H), 9.54 (s, H-8, 2H), 7.52-7.98 (señales del grupo naftilo, 14H), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, H-6, 4H), 6.91 (d, J = 9.0 Hz, H-5, 4H), 4.07 (t, J = 6.5, 4.4 Hz, H-3, 4H), 3.75 (t, J = 6.5, 4.4 Hz, H-2, 4H), 3.62 (s, H-1, 4H). RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 181.97 (C-9), 156.31 (C-4), 135.65 (C-11), 134.39 (C-7), 132.85 (C-15), 130.49 (C-16), 128.56 (C-18), 127.13 (C-17), 126.84 (C-19), 126.59 (C-6), 126.52 (C-20), 126.11 (C-13), 125.86 (C-14), 123.60 (C-12), 114.67 (C-5), 70.40 (C-1), 69.45 (C-2), 67.76 (C-3). Fluorescencia: λ_{ex} = 340, λ_{em} = 425 nm. ESI-MS (+): m/z (modo de ion positivo) 725.5 (receptor + Na^+) (8.51%) 741.4 [M + K]⁺ (7.30%).

Rec2: Rendimiento: 74.4 mg (93 %). Punto de fusión: 107.4-109.8 °C. IR (ATR): 3198, 3046, 3000, 2927, 2867, 1595, 1535, 1504, 1241, 1112, 1059, 948, 808, 769 cm^{-1} . RMN de

^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.70 (s, 2H), 9.54 (s, 2H), 7.51-8.08 (señales del grupo naftilo, 14H), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, H-7, 4H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, H-6, 4H), 4.06 (t, $J = 4.6$ Hz, H-4, 4H), 3.72 (t, $J = 4.6$ Hz, H-3, 4H), 3.56 (dt, $J = 9.1, 4.1, 3.6$ Hz, H-1, H-2, 8H). RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 181.99 (C-10), 156.32 (C-5), 135.66 (C-12), 134.40 (C-8), 132.86 (C-16), 130.49 (C-17), 128.56 (C-19), 127.13 (C-18), 126.83 (C-20), 126.57 (C-7), 126.11 (C-14), 125.86 (C-15), 123.60 (C-13), 122.26 (C-21), 114.66 (C-6), 70.37 (C-2), 70.29 (C-1), 69.40 (C-3), 67.76 (C-4). Fluorescencia: $\lambda_{\text{ex}} = 340$, $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm. ESI-MS (+): m/z (modo de ion positivo) 769.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (38.79%) 785.4 $[\text{M} + \text{K}]^+$ (20.29%).

Estudios de reconocimiento molecular por fluorescencia

Los estudios de reconocimiento molecular por la técnica de fluorescencia en microplaca se realizaron en microplacas de 96 pocillos de polipropileno, a los cuales se añadieron 300 μL de una solución de receptor a una concentración de 1.5×10^{-5} M y de 3×10^{-4} M de la sal de estudio, posteriormente se mantuvieron en agitación por diez minutos. Por cuestiones de solubilidad, en el caso de las lecturas realizadas con las sales de tetraalquilamonio éstas se hicieron en DMSO , mientras que las mediciones con las sales de metales alcalinos se realizaron en una mezcla de DMSO :Agua en una proporción de 95:5 (v/v), todo ello a una temperatura de 298 ± 0.1 K. Este análisis se repitió ocho veces para cada sistema receptor-huésped y se determinó la desviación estándar y el intervalo de confianza al 95 % a partir de la distribución t de student.

Las titulaciones por fluorescencia para la cuantificación de las constantes de asociación de los sistemas receptor-huésped, se realizaron únicamente para los casos de los sistemas en los que se observaron mayores cambios en la intensidad de emisión con respecto a la del receptor libre. Para ello, se agregaron en cada pocillo 300 μL de una solución del receptor a una concentración de 1.5×10^{-5} M y posteriormente se añadieron alícuotas de una solución concentrada de la sal huésped. Cada experimento se repitió ocho veces a una temperatura de 298 ± 0.1 K. La obtención de las constantes de asociación (K) se realizó por medio del ajuste teórico de las isotermas obtenidas de las gráficas de intensidad de fluorescencia vs concentración según la metodología reportada por Thordarson en 2011. El intervalo de confianza al 95 % de las constantes de asociación se obtuvo según lo reportado por Hirose en 2014.

Para los sistemas con las constantes de asociación mayores, se determinaron los límites de cuantificación (LC) y los límites de detección (LD) según las definiciones descritas por Miller y Miller en 2002. Para ello, se tomaron diez mediciones de la solución blanco y se obtuvo su desviación estándar. Posteriormente, se prepararon quince soluciones en las que se mantuvo constante la concentración del receptor (1.5×10^{-5} M) y a las que se añadieron cantidades variables de sal. Después, se tomó la parte lineal de la isoterma y se realizó un análisis por regresión lineal ponderada, utilizando el software OriginPro® 2016 b9.3.226.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los receptores **Rec1** y **Rec2** (Figura 1) se obtuvieron en rendimientos cuantitativos a partir de la reacción de las diaminas y los isotiocianatos correspondientes, de acuerdo con la Figura 2 y empleando el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos. La obtención y la pureza de los compuestos se confirmaron por técnicas convencionales tales como RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensional y espectrometría de masas. Al respecto, los espectros de RMN de ^1H de los receptores presentaron las señales características de los hidrógenos -NH de los grupos tiourea a 9.54 y 9.70 ppm. En el caso de los espectros de RMN de ^{13}C , se observó la señal para el carbono del grupo carbonilo de la tiourea a 181.97 y a 181.99 ppm respectivamente para **Rec1** y **Rec2**. Por otro lado, se observaron por espectrometría de masas a 725.5 y 769.5 m/z, las señales que corresponden respectivamente a las especies $[\text{Rec1} + \text{Na}]^+$ y $[\text{Rec2} + \text{Na}]^+$.

Estudios de reconocimiento molecular por fluorescencia

Se realizaron estudios de reconocimiento molecular de **Rec1** y **Rec2** con diversas sales. Los resultados de dichos estudios se presentan en la Figura 3, en estos se observa que los mayores cambios en las intensidades de fluorescencia de los receptores fueron ocasionados por efecto de las sales ATBA, FosTBA, FTMA, Na_2HPO_4 , NaCH_3COO y NaF, las cuales se caracterizan por estar conformadas por aniones básicos (CH_3COO^- , H_2PO_4^- , F^- y HPO_4^{2-}), así como por el catión Na^+ el cual puede interactuar con el espaciador poliéter. Al comparar las magnitudes de los cambios espectrales de **Rec1** y

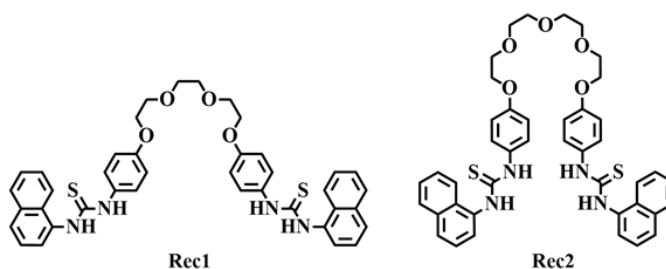


Figura 1. Estructura química de los receptores **Rec1** y **Rec2**.
Figure 1. Chemical structure of the **Rec1** and **Rec2** receptors.

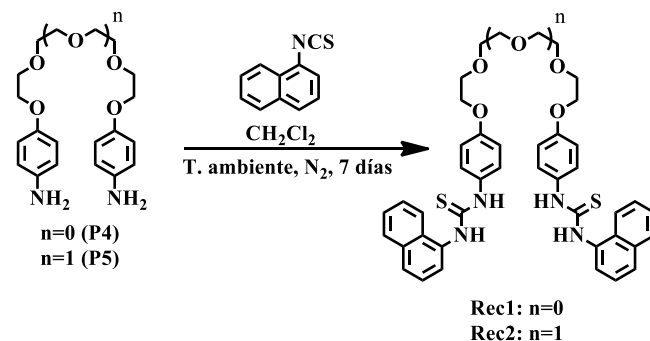


Figura 2. Síntesis de **Rec1** y **Rec2**.
Figure 2. Synthesis of **Rec1** and **Rec2**.

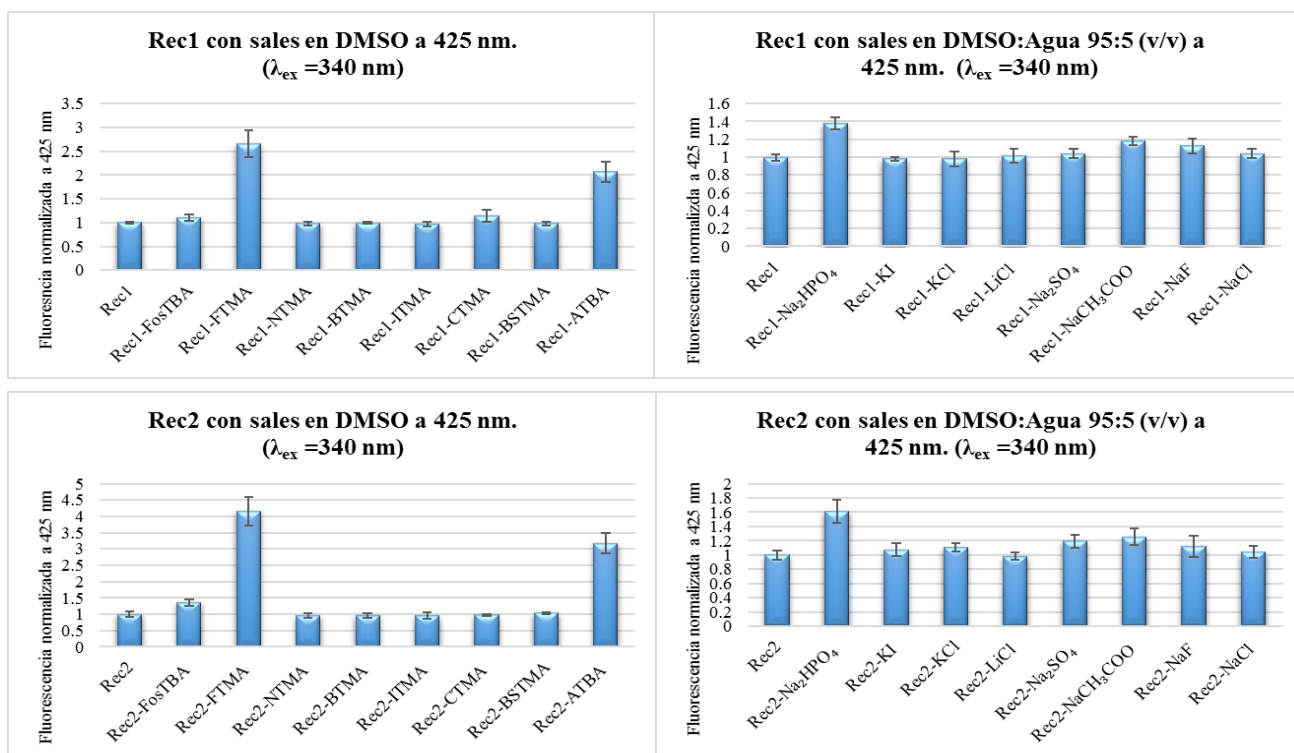


Figura 3. Estudios de reconocimiento molecular por fluorescencia, de los receptores (1.5×10^{-5} M) y diversas sales (3×10^{-4} M). N=8.
Figure 3. Molecular recognition studies by fluorescence, of receptors (1.5×10^{-5} M) and diverse salts (3×10^{-4} M). N=8.

Rec2 debido a la presencia de una determinada sal, se observó que estos son muy similares entre sí, lo cual indica que los receptores reconocen a los huéspedes de forma parecida.

En cuanto a los resultados de los estudios realizados en particular en DMSO, destaca que ambos receptores presentaron un incremento importante en la intensidad de fluorescencia en presencia de los aniones acetato y fluoruro (sales ATBA y FTMA), con respecto a su forma libre; siendo este incremento aproximadamente de 2 a 2.5 veces en el caso de **Rec1** y de 3 a 4.2 veces en **Rec2**.

En cuanto a los estudios realizados en DMSO:Agua 95:5 (v/v), se observaron los mayores cambios en la intensidad de la fluorescencia de los receptores en presencia de la sal Na₂HPO₄, con un incremento de aproximadamente 1.5 veces en ambos casos. Esto indica que aún en un medio más competitivo (dada la incorporación de agua), los receptores son capaces de interactuar con algunas de las sales estudiadas y con cierta predilección por aquellas de aniones básicos. Con respecto a esto último, es importante destacar que estas sales están conformadas además por cationes alcalinos, por lo que el catión también podría interactuar con la cadena poliéter y en consecuencia ayudar a mejorar la estabilidad del complejo. En base a estos estudios se seleccionaron las sales más adecuadas para realizar titulaciones y obtener tanto las constantes de asociación de los complejos, como los límites de detección y cuantificación por medio de curvas de calibración.

Determinación de las constantes de asociación

En las Figuras 4 y 5 se presentan las titulaciones de **Rec1** y **Rec2** con FTMA y ATBA respectivamente. Para ambos experimentos en general los grupos de los espectros presentaron un comportamiento similar: se observó una banda ancha no estructurada centrada en 425 nm, para la cual se incrementó su intensidad conforme se añadían cantidades progresivas del ión fluoruro. Por otro lado, se construyeron las gráficas de la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada vs la concentración de la sal (insertadas en las figuras). Al respecto, las gráficas de ambas moléculas anfitrionas resultaron en curvas cuyo comportamiento se puede dividir en dos segmentos lineales de diferente pendiente, lo que sugiere la existencia de dos equilibrios que pueden atribuirse a la formación del complejo (primer equilibrio) y a la desprotonación de las tioureas de los receptores por los aniones fluoruro y acetato (segundo equilibrio); esto último debido a la gran basicidad de estos. Tal comportamiento ha sido ampliamente reportado en la literatura (Amendola *et al.*, 2013). Por lo mencionado, el incremento de la fluorescencia tras la desprotonación, se debe a un proceso de transferencia de carga y a la deslocalización de ésta en el sistema π del naftaleno conjugado. En este sentido, una de las principales ventajas de incorporar grupos tiourea para el reconocimiento de aniones, es la mayor acidez de estos con respecto a las ureas análogas (Byrne y Mullen, 2018). Sin embargo, la acidez también puede ser una desventaja dependiendo del

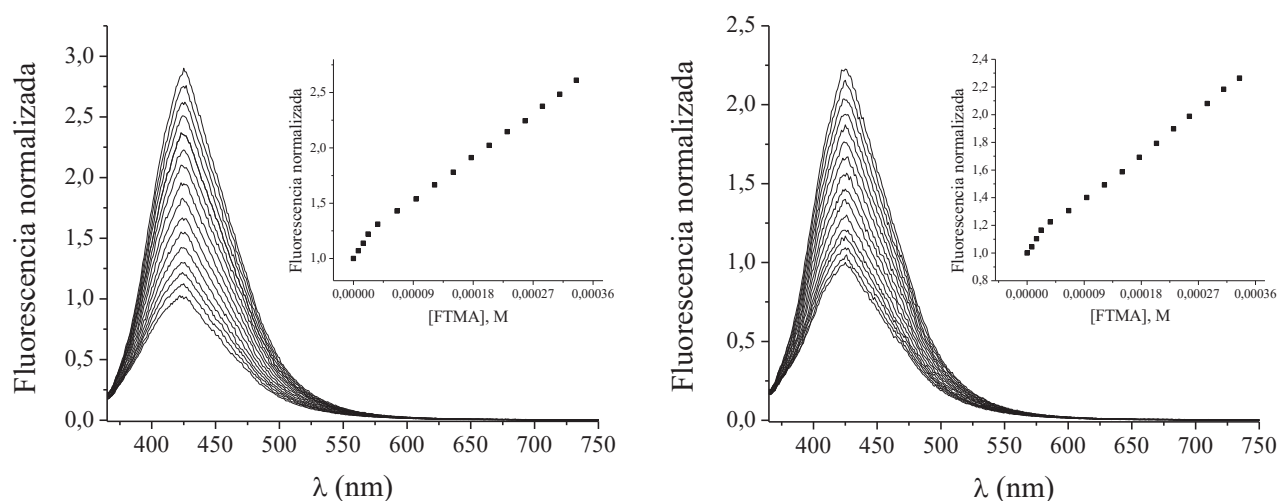


Figura 4. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de FTMA ($0-3.35 \times 10^{-4}$ M) en DMSO. Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs [FTMA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 4. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of FTMA ($0-3.35 \times 10^{-4}$ M) in DMSO. Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs [FTMA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

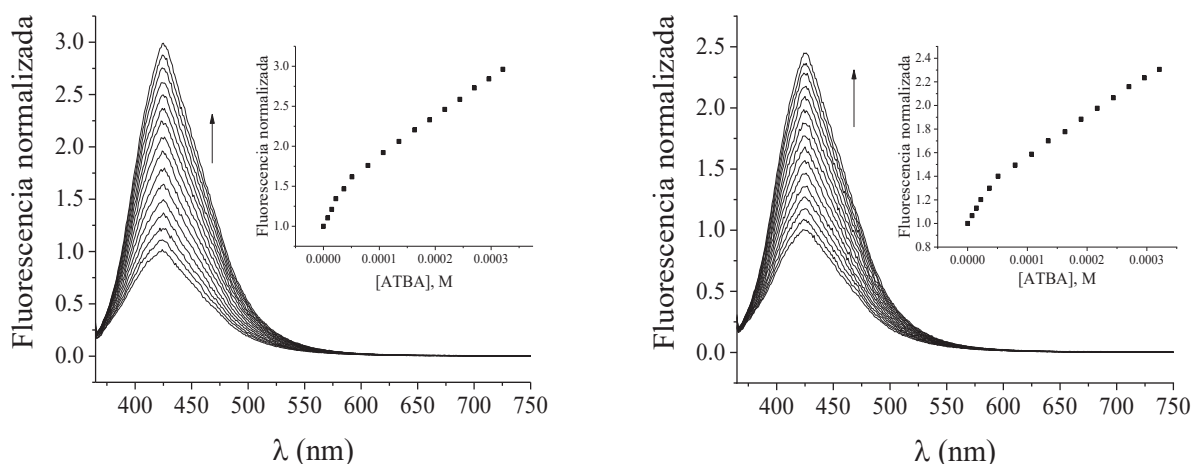


Figura 5. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de ATBA ($0-3.21 \times 10^{-4}$ M) en DMSO. Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs [ATBA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 5. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of ATBA ($0-3.21 \times 10^{-4}$ M) in DMSO. Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs [ATBA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

sistema de interés, ya que también aumenta la probabilidad de que las tioureas puedan sufrir desprotonación en presencia de un anión básico (equilibrio ácido-base), aún a bajas concentraciones del anión, lo cual impide el seguimiento y cuantificación del equilibrio relacionado con la formación del complejación receptor-anión.

Para el resto de los sistemas estudiados con **Rec1** y **Rec2**, en las Figuras 6-10 se presentan los espectros obtenidos en las titulaciones, así como las correspondientes gráficas de la dependencia de la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada de los receptores vs la concentración de las distintas sales. A partir del ajuste de estos datos

se obtuvieron las constantes de asociación para los distintos sistemas, las cuales se resumen en la Tabla 1. En general se observa que las constantes para los complejos de **Rec1** son ligeramente mayores. Un aspecto muy destacable es el hecho de que se obtuvieron constantes de asociación más altas para los complejos estudiados en DMSO:Agua 95:5 (v/v), esto a pesar de ser un medio más competitivo por formación de puente de hidrógeno; por lo que en teoría se esperaba una disminución de las afinidades de los complejos de los aniones de ambos receptores tras la incorporación del agua. En contraste, el incremento observado en la magnitud de las constantes de asociación para las distintas sales de sodio en

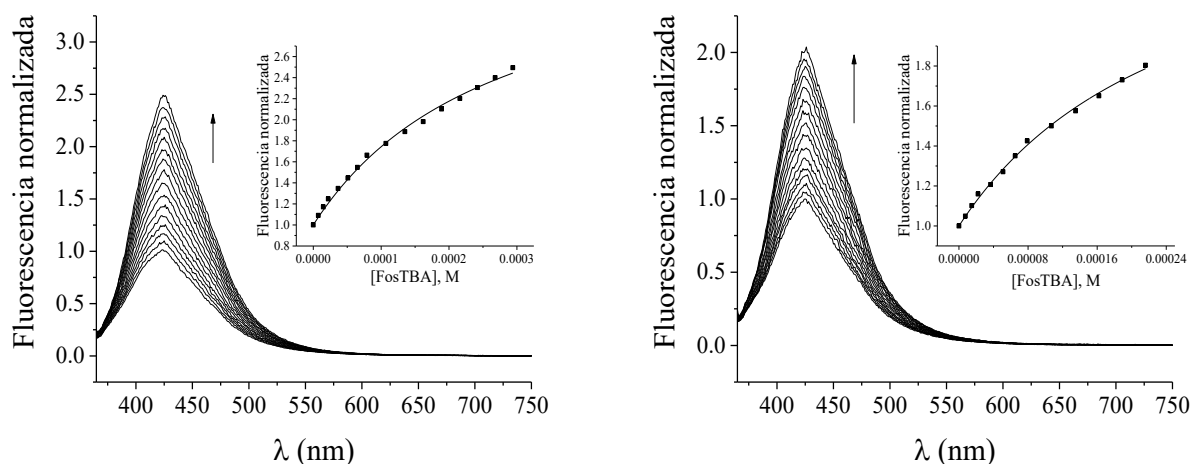


Figura 6. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de FosTBA ($0-2.94 \times 10^{-4}$ M) en DMSO. Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs [FosTBA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 6. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of FosTBA ($0-2.94 \times 10^{-4}$ M) in DMSO. Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs [FosTBA]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

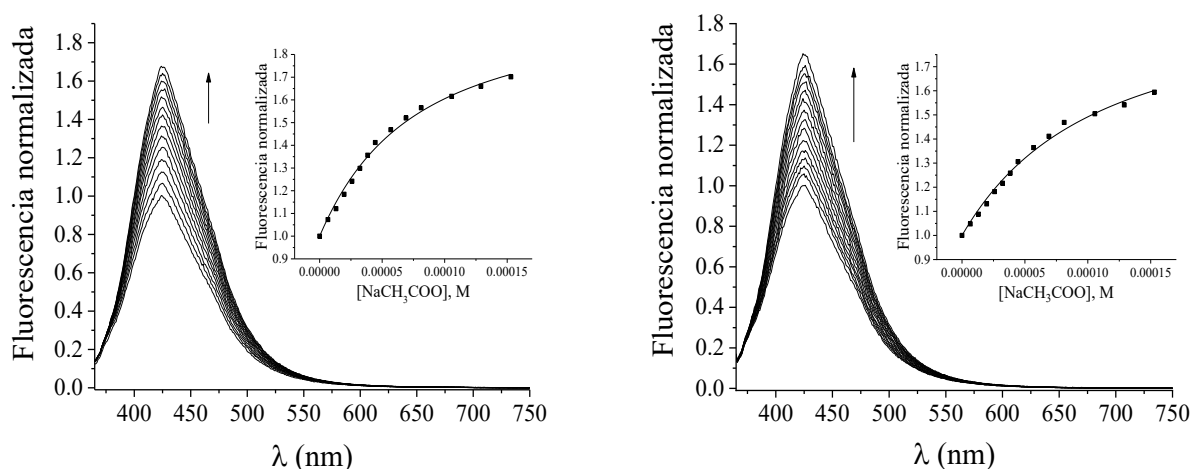


Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de NaCH_3COO ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) en DMSO:Agua 95:5 (v/v). Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs $[\text{NaCH}_3\text{COO}]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 7. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of NaCH_3COO ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) in DMSO:Water 95:5 (v/v). Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs $[\text{NaCH}_3\text{COO}]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

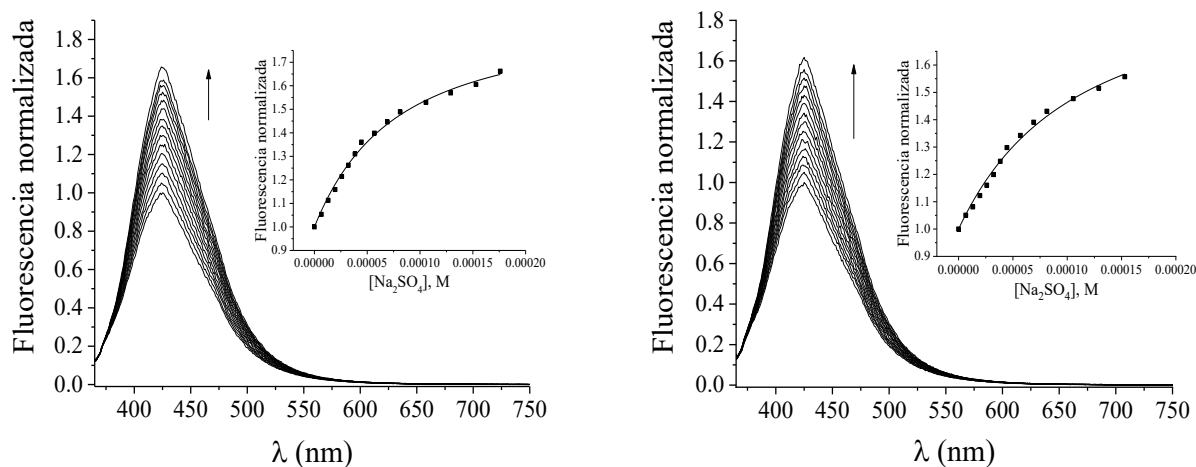


Figura 8. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de Na_2SO_4 ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) en DMSO:Agua 95:5 (v/v). Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 8. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of Na_2SO_4 ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) in DMSO:Water 95:5 (v/v). Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

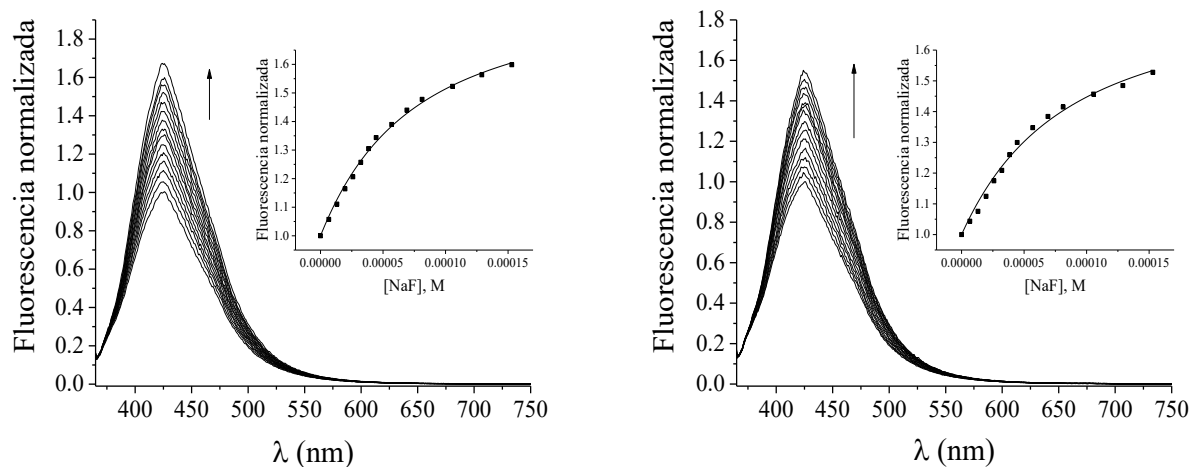


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de NaF ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) en DMSO:Agua 95:5 (v/v). Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs [NaF]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 9. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of NaF ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) in DMSO:Water 95:5 (v/v). Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs [NaF]. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

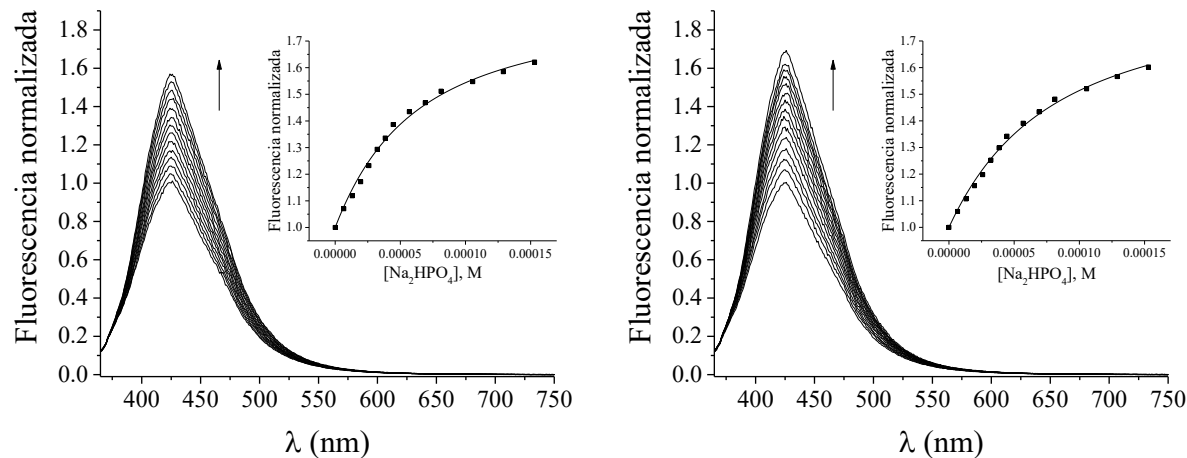


Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia de los receptores (1.5×10^{-5} M) tras la adición de Na_2HPO_4 ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) en DMSO:Agua 95:5 (v/v). Recuadro: gráficas de la emisión a 425 nm vs $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Figure 10. Fluorescence emission spectra of the receptors (1.5×10^{-5} M) after the addition of Na_2HPO_4 ($0-1.76 \times 10^{-4}$ M) in DMSO:Water 95:5 (v/v). Inset: Graphs of the emission at 425 nm vs $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$. a) **Rec1**; b) **Rec2**.

Tabla 1. Constantes de asociación (K) de los sistemas estudiados en DMSO y DMSO:Agua 95:5 (v/v) a 298 K.

Table 1. Binding constants (K) of the systems studied herein in DMSO and DMSO:Water 95:5 (v/v) at 298 K.

Huésped	Rec1 K (M^{-1})	Rec2 K (M^{-1})
FosTBA ^a	6769 ± 719	3978 ± 602
ATBA ^a	.. ^b	.. ^b
FTMA ^a	.. ^b	.. ^b
$\text{NaCH}_3\text{COO}^c$	15393 ± 1848	10265 ± 1050
Na_2SO_4^c	14956 ± 1317	10950 ± 775
$\text{Na}_2\text{HPO}_4^c$	14270 ± 2962	11587 ± 1956
NaF ^c	15219 ± 835	13391 ± 1285

a) DMSO.

b) Urea deprotonation.

c) DMSO: Water 95:5 (v/v).

este medio puede atribuirse al hecho de que los receptores son capaces de funcionar como heteroditópicos: con unión del anión mediante la formación de puentes de hidrógeno con las tioureas, siendo la fuerza directriz en el proceso de complejación, y una simultánea interacción del catión alcalino vía el poliéter y/o los anillos aromáticos directamente conectados a este.

En este contexto, el grupo de Gasa (2011) ha descrito un conjunto de factores que se deben tomar en cuenta en el proceso de reconocimiento molecular para este tipo de sistemas. Entre estos factores se encuentran los efectos estéricos, la competencia entre el contraión y el receptor por el anión y la estabilidad del par iónico, entre otros. Asimismo, de acuerdo con Gunnlaugsson *et al.* (2005) los efectos termodinámicos asociados a la solvatación y desolvatación de los sistemas durante el proceso de complejación también son muy importantes, por lo que la naturaleza del medio

juega un papel crucial en la estabilidad de los complejos. Por todo lo mencionado, se requieren experimentos adicionales para determinar con mayor precisión cuales son los factores principales que conducen el proceso de complejación en **Rec1** y **Rec2**, así como evaluar su capacidad como receptores heteroditópicos.

Curvas de calibración por fluorescencia

A pesar de que la sensibilidad de un equipo de fluorescencia de microplaca es menor a un equipo estándar de fluorescencia (Lakowicz, 2006), las ventajas de poder establecer un protocolo experimental que involucre una respuesta sensible y lineal por un analito de interés, así como el empleo de un volumen pequeño de muestra, resultan aspectos muy atractivos para cualquier aplicación. En este sentido, las mediciones realizadas con **Rec1** y **Rec2** en un medio de DMSO:Agua 95:5 (v/v), fueron orientadas a la obtención de los límites de cuantificación (LC) y los límites de detección (LD) de las sales de NaF, Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 y NaCH_3COO . Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11 y en la Tabla 2. Estos demuestran que **Rec1** y **Rec2** presentan LC y LD en el mismo orden de magnitud (10^{-6} M), en cuyo caso se podría cuantificar por interpolación de algún analito a partir de esas concentraciones. Cabe señalar, que el intervalo lineal de estos receptores está por debajo de los límites establecidos por la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 para los límites permitidos en agua potable de los iones F^- , Na^+ y SO_4^{2-} . No obstante, en lo que respecta a fluoruro en sal yodada, se presentó en el año 2000 una iniciativa por medio de la norma PROY-NOM-040-SSA1-2000 donde se establece que no se debe consumir sal yodada-fluorada en lugares donde la cantidad natural de flúor en el agua potable es de 0.7 mg/L,

cantidad que si puede ser determinada por la metodología propuesta con **Rec1** y **Rec2** que corresponde a un intervalo entre 1×10^{-6} M a 4.45×10^{-5} M. Por lo tanto, la cuantificación de fluoruro en estas concentraciones es importante. Por otro lado, se han presentado varios reportes de fluorosis dental en la región norte de México, en estados tales como Baja California, Chihuahua, Durango, Tamaulipas y Sonora, cuya cantidad de fluoruro en agua es superior a 0.7 mg/L (Galicia Chacón *et al.*, 2011; Molina Frechero *et al.*, 2013). Por consiguiente, el monitoreo frecuente de F^- en esas entidades debe ser constante, por lo que es indispensable desarrollar métodos menos costosos que los empleados convencionalmente. Debido a esto, sistemas como **Rec1** y **Rec2** pueden ser una alternativa viable para la detección de fluoruro, ya que su intervalo de concentración para la medición, aunque pequeño, es comparable con algunos métodos y concentraciones habituales de cuantificación en agua (0.3 mg/L) descritos en la norma NMX-AA-077-SCFI-2001 y por la organización mundial de la salud (WHO, 2004); además de requerir únicamente 15 μL de muestra acuosa para realizar un análisis. Sin embargo, a pesar de estas ventajas es necesario realizar más pruebas con **Rec1** y **Rec2**, con el fin de establecer un protocolo viable para la detección y cuantificación de fluoruro, que descarte posibles interferencias en las mediciones de muestras reales.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron dos nuevos receptores, en altos rendimientos y mediante una ruta sintética sencilla, los cuales son capaces de interactuar con aniones y sales diversas en DMSO. El incremento en la magnitud de las constantes de asociación obtenidas para las distintas sales de sodio en un sistema DMSO:Agua 95:5 (v/v) sugiere que los receptores son

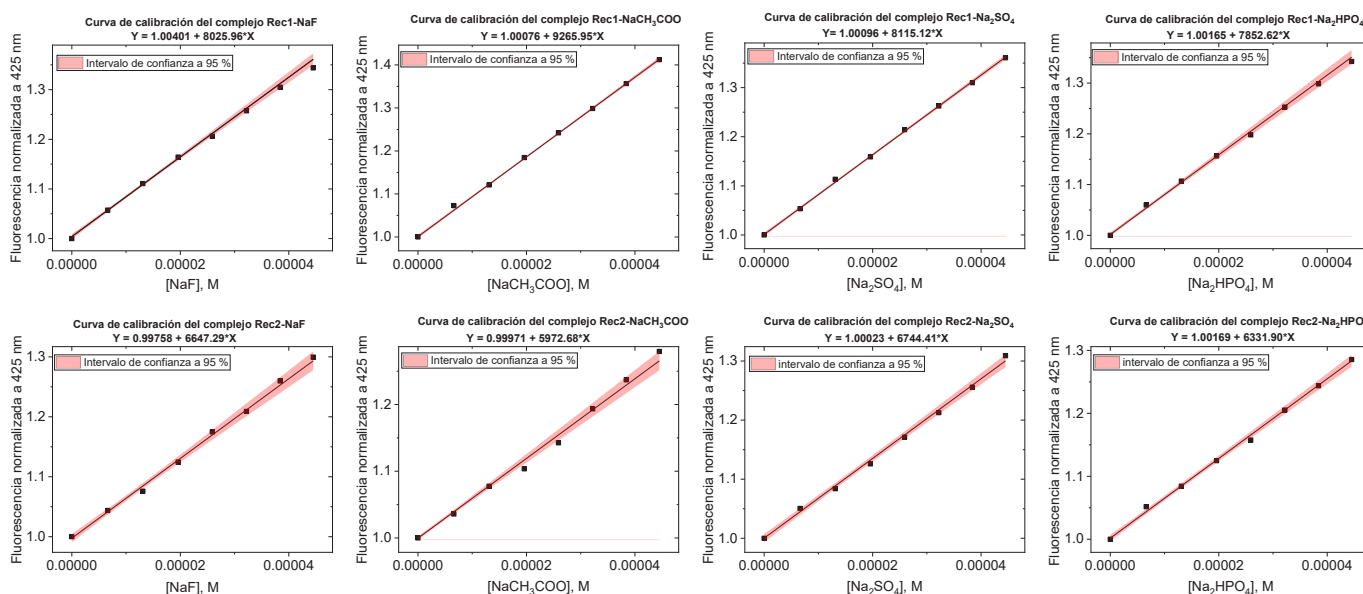


Figura 11. Curvas de calibración ponderadas de los receptores **Rec1** y **Rec2** con NaF, Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 y NaCH_3COO . Las sombras rojas representan el intervalo de confianza al 95%. N=8.

Figure 11. Weighted calibration curves of the receptors **Rec1** and **Rec2** with NaF, Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 and NaCH_3COO . Red shadows represent the Confidence Interval at 95%. N=8.

Tabla 2. Límites de cuantificación y límites de detección obtenidos mediante la curva de calibración ajustada por regresión lineal ponderada.
Table 2. Quantification and detection limits obtained by means of the calibration curve adjusted by weighted linear regression.

Sistema	Límite de cuantificación (M)	Límite de detección (M)	Modelo Lineal: $Y = a + b \cdot X$				
			A	B	R^2	R^2 ajustado	Coefficiente de correlación (Pearson)
Rec1-NaF	6.39×10^{-6}	1.92×10^{-6}	$1.00401 \pm 5.13 \times 10^{-3}$	8025.96 ± 350.84	0.99809	0.99777	0.99904
Rec1-NaCH ₃ COO	1.65×10^{-6}	4.95×10^{-7}	$1.00076 \pm 1.53 \times 10^{-3}$	9265.95 ± 64.43	0.99971	0.99966	0.99985
Rec1-Na ₂ SO ₄	1.84×10^{-6}	5.51×10^{-7}	$1.00096 \pm 1.49 \times 10^{-3}$	8115.12 ± 66.20	0.99960	0.99953	0.99980
Rec1-Na ₂ HPO ₄	1.97×10^{-6}	5.92×10^{-7}	$1.00165 \pm 1.55 \times 10^{-3}$	7852.62 ± 142.72	0.99802	0.99769	0.99901
Rec2-NaF	4.21×10^{-6}	1.26×10^{-6}	$0.99758 \pm 2.80 \times 10^{-3}$	6647.29 ± 183.90	0.99543	0.99467	0.99771
Rec2-NaCH ₃ COO	1.84×10^{-6}	5.53×10^{-7}	$0.99971 \pm 1.10 \times 10^{-3}$	5972.68 ± 135.75	0.99691	0.99639	0.99845
Rec2-Na ₂ SO ₄	4.18×10^{-6}	1.25×10^{-6}	$1.00023 \pm 2.82 \times 10^{-3}$	6744.41 ± 131.31	0.99773	0.99735	0.99886
Rec2-Na ₂ HPO ₄	3.14×10^{-6}	9.43×10^{-7}	$1.00169 \pm 1.99 \times 10^{-3}$	6331.90 ± 105.89	0.99832	0.99805	0.99916

capaces de funcionar como heteroditópicos. Con base en los resultados obtenidos, la cuantificación del anión fluoruro empleando los compuestos **Rec1** y **Rec2** por la técnica de fluorescencia en microplaca es viable. Dicha cuantificación podría implementarse tanto en alimentos como en muestras acuosas. Sin embargo, el protocolo para la cuantificación de fluoruro aún debe ser perfeccionado y debe considerar el tipo de muestra, esto con el fin de evitar posibles interferencias con otras especies aniónicas como acetato, sulfato o fosfato, entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT por la beca otorgada a Jancarlo Gomez-Vega para sus estudios de posgrado y por el financiamiento de los proyectos CB-239581 y Red Temática de Química Supramolecular (No. 294810).

REFERENCIAS

- Amendola, V., Bergamaschi, G., Boiocchi, M., Fabbri, L. y Mosca, L. 2013. The interaction of fluoride with fluorogenic ureas: an ON¹-OFF-ON² response. *Journal of the American Chemical Society*. 135(16): 6345–6355.
- Byrne, S. and Mullen, K. M. 2018. Urea and thiourea based anion receptors in solution and on polymer supports. *Supramolecular Chemistry*. 30(3): 196–205.
- Gale, P. A. y Caltagirone, C. 2018. Fluorescent and colorimetric sensors for anionic species. *Coordination Chemistry Reviews*. 354: 2–27.
- Gale, P. A., Howe, E. N. W. y Wu, X. 2016. Anion receptor chemistry. *Chem. Cell Press*, 1(3): 351–422.
- Galicia Chacón, L., Molina Frechero, N., Oropeza Oropeza, A., Gaona, E. y Juárez López, L. 2011. Análisis de la concentración de fluoruro en agua potable de la delegación tláhuac, ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 27(4): pp. 283–289.
- Gangadhara, Jayanthi, S. y Kishore, K. 1996. Synthesis and mesogenic behavior of metal-containing liquid crystalline networks. *Journal of Applied Polymer Science*. 60(6): 791–798.
- Gunnaugsson, T., Ali, H. D. P., Glynn, M., Kruger, P. E., Hussey, G. M., Pfeffer, F. M., dos Santos, C. M. G. y Tierney, J. 2005. Fluorescent photoinduced electron transfer (PET) sensors for anions; from design to potential application. *Journal of Fluorescence*. 15(3): 287–299.
- Hirose, K. 2014. Fundamental aspects of host:guest complexation from 1:1 to synergistic binding. En: *Synergy in Supramolecular Chemistry*. T. Nabeshima(ed.), pp. 261–300. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Lakowicz, J. R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer Science+Business Media, LLC.
- Mäkelä, T., Kalenius, E. y Rissanen, K. 2015. Cooperatively enhanced ion pair binding with a hybrid receptor. *Inorganic Chemistry*. 54(18): 9154–9165.
- McConnell, A. J. y Beer, P. D. 2012. Heteroditopic receptors for ion-pair recognition. *Angewandte Chemie International Edition*. 51(21): 5052–5061.
- Miller, J. N. y Miller, J. C. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ta ed. Pearson Educación.
- Molina Frechero, N., Sánchez Pérez, L., Castañeda Castaneira, E., Oropeza Oropeza, A., Gaona, E., Salas Pacheco, J. y Bologna Molina, R. 2013. Drinking water fluoride levels for a city in northern Mexico (Durango) determined using a direct electrochemical method and their potential effects on oral health. *The Scientific World Journal*. 2013: 1–6.
- Norma Oficial Mexicana NMX-AA-077-SCFI-2001. Método para la determinación de fluoruros en aguas naturales y residuales. [Consultado 11 de junio de 2018] 2001. Disponible en: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/PPD1/DO86.pdf>.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de

- calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. [Consultado 11 de junio de 2018] 2018. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>.
- Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-040-SSA1-2000. Productos y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorurada. Especificaciones sanitarias. [Consultado 11 de junio de 2018] 2018. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m040ssa193.html>.
- Ornelas Romo, R. 2017. Reconocimiento de sales de importancia biológica y ambiental por dos receptores heteroditópicos con unidades naftaleno. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Padghan, S. D., Bhosale, R. S., Ghule, N. V, Puyad, A. L., Bhosale, S. V y Bhosale, S. V. 2016. Hydrogen sulfate ion sensing in aqueous media based on a fused pyrimido benzothiazole derivative. *RSC Advances*. 6(41): 34376–34380.
- Pomecko, R., Asfari, Z., Hubscher-Bruder, V., Bochenska, M. y Arnaud-Neu, F. 2010. Anion recognition by phosphonium calix[4]arenes: synthesis and physico-chemical studies. *Supramolecular Chemistry*. 22(5): 275–288.
- Sahoo, S. K., Kim, G.-D. y Choi, H.-J. 2016. Optical sensing of anions using C_{3v}-symmetric tripodal receptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 27: 30–53.
- Thordarson, P. 2011. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews*. 40(3): 1305–1323.
- WHO. 2004. Fluoride in Drinking-water Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva. doi:WHO/SDE/WSH/03.04/96.
- Zhao, G.-J. y Han, K.-L. 2012. Hydrogen bonding in the electronic excited state. *Accounts of Chemical Research*. 45(3): 404–413.