



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA**

**ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES  
GENERADAS POR DERIVADOS DE  
ÁCIDOS BILIARES Y CICLODEXTRINAS**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> de las Mercedes Álvarez Alcalde**

**Lugo, Abril de 2007**





**Facultade de Ciencias**

**Departamento de Química-Física**

**ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES GENERADAS  
POR DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES Y CICLODEXTRINAS**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> de las Mercedes Álvarez Alcalde**

**Lugo, Abril de 2007**



*A mis padres Mercedes y Demetrio*

*A mi hermano Juan José*

*A Álvaro*

---



*Llegado el momento final de la redacción de mi tesis doctoral me gustaría señalar que es el fruto del sacrificio y del compromiso no sólo mío sino de todas las personas que han contribuido a su realización. Por ello, mi más sincero agradecimiento hacia los directores de esta tesis doctoral: D. José Vázquez Tato y Dña. Aida Jover Ramos, quienes me han dirigido gentilmente durante estos años de investigación. Una mención especial a Luciano Galantini y Nicolae V. Pavel por su agradable acogida en las estancias realizadas en su laboratorio en Roma, y a los demás profesores del departamento de Química Física de Lugo, Francisco Meijide, Jorge Carrazana, Wajih Al-Soufi y Mercedes Novo, así como a Julio Seijas y Pilar Vázquez por su buena disposición para trabajar conmigo. Mi más sincero agradecimiento al personal de los servicios RIAIDT de Lugo y Santiago por realizar su trabajo en el menor tiempo posible en análisis de urgencia y a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio y a los que todavía se encuentran trabajando en él. Ya por último un agradecimiento muy especial a mis padres y a mi hermano por su cariño siempre incondicional, y a Álvaro por su apoyo y ayuda constante día a día.*

*También agradezco al Ministerio de Ciencia y Tecnología por los proyectos MAT2001-2911 y MAT2004-04606 y a la Xunta de Galicia por los proyectos PGIDIT02PXIC26202PN y PGIDIT05PXIC26201PN, en cuyo marco se ha desarrollado la presente investigación. Y gracias al MEC por la beca FPI concedida durante esta etapa así como las ayudas para la realización de estancias en el extranjero.*

*... y gracias a Dios por permitir que siga este camino.*





**Facultade de Ciencias**

**Departamento de Química-Física**

D. José Vázquez Tato, Catedrático del Departamento de Química Física y Dña. Aida Jover Ramos, Contratada Doctor del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela

**CERTIFICAN**

Que el trabajo descrito en la presente memoria “*Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*”, que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta la Licenciada en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, Dña. M<sup>a</sup> de las Mercedes Álvarez Alcalde, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Lugo, a 30 de abril de 2007.

Fdo.: José Vázquez Tato

Aida Jover Ramos





**Facultade de Ciencias**

**Departamento de Química-Física**

D. Jesús Rodríguez Otero, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela

**CERTIFICA**

Que la Licenciada en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, Dña. M<sup>a</sup> de las Mercedes Álvarez Alcalde, ha realizado en este Departamento, bajo la dirección de D. José Vázquez Tato y Dña. Aida Jover Ramos, el trabajo descrito en la presente memoria "*Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*", que presenta para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 30 de abril de 2007.

Jesús Rodríguez Otero



## Glosario

---

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AEDT</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b><math>\alpha</math>-CD</b>	$\alpha$ -Ciclodextrina
<b><math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -Ciclodextrina
<b>b/c</b>	Disolución reguladora de bicarbonato/carbonato de sodio
<b>COSY</b>	Espectroscopia de Correlación
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetilpiridinio
<b>DEPC</b>	Dietilcianofosfonato
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement of Polarization Transfer</i>
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>DCC</b>	Diciclohexilcarbodiimida
<b>DIAD</b>	Di-isopropil azo dicarboxilato
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DPPA</b>	Difenilfosforil azida
<b>DTPA</b>	Ácido dietilentriaminapentaacético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FAB</b>	Bombardeo con Átomos Rápidos
<b><math>\gamma</math>-CD</b>	$\gamma$ -ciclodextrina
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HMQC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<b>HOBt</b>	4-hidroxibenzotriazol
<b>IR</b>	Espectroscopia de Infrarrojo
<b>KOH</b>	Hidróxido potásico
<b>LiAlH<sub>4</sub></b>	Hidruro de litio aluminio
<b>LS</b>	Dispersión de luz
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato sódico
<b>NBS</b>	N-Bromosuccinimida
<b>Net<sub>3</sub></b>	Trietilamina

<b>NH<sub>3</sub></b>	Amoníaco
<b>NOESY</b>	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser
<b>PAMAM</b>	Poliamidoamino
<b>PMA</b>	Ácido piromielítico
<b><i>m</i>-PMDCI</b>	Dicloruro <i>meta</i> -diésterpiromielítico
<b><i>m</i>-PMDCI</b>	Dicloruro <i>para</i> -diésterpiromielítico
<b><i>m</i>-PMDE</b>	<i>meta</i> -diésterpiromielítico
<b><i>p</i>-PMDE</b>	<i>para</i> -diésterpiromielítico
<b>PPI</b>	Polipropilenoimino
<b>QELS</b>	Dispersión de luz cuasi-elástica
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>ROESY</b>	<i>Rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy</i>
<b>SAXS</b>	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>SLS</b>	Dispersión de luz estática
<b>SOCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de tionilo
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TEM</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano

<b><i>I.- INTRODUCCIÓN</i></b>	1
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	10
<b><i>II.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS EPÍMEROS DE ÁCIDOS BILIARES 3, 7-DIHI-DROXÍLICOS</i></b>	13
<b><i>II.1.-</i></b> Perspectivas históricas	15
<b><i>II.2.-</i></b> Ácidos biliares naturales. Aspectos importantes. Consideraciones estructurales	18
<b><i>II.3.-</i></b> Biosíntesis de los ácidos biliares	21
<b><i>II.4.-</i></b> Características estructurales de los ácidos biliares	24
<b><i>II.5.-</i></b> Análisis de los cristales de los epímeros del ácido desoxicólico	31
<b><i>II.6.-</i></b> Resolución de los cristales de los epímeros del ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico	35
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	52
<b><i>III.- NUEVOS SURFACTANTES MONOMÉRICOS DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO</i></b>	57
<b><i>III.1.-</i></b> Algunas propiedades críticas de las sales biliares	59
<b><i>III.2.-</i></b> Funciones fisiológicas	63
<b><i>III.3.-</i></b> Ácidos biliares modificados. Nuevos derivados	65
<b><i>III.4.-</i></b> Nuevas aplicaciones en la investigación farmacéutica	66
<b><i>III.5.-</i></b> Síntesis del derivado alifático, colato-3-amino succinato de sodio, y del derivado aromático, colato-3-amino benzoato de sodio	73
<b><i>III.6.-</i></b> Resolución de los cristales de los monómeros sintetizados	73

<b>III.7.-</b> Determinación de la <i>cmc</i>	85
<b>III.8.-</b> Caracterización en disolución de los agregados mediante <i>Light Scattering</i>	87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	90
<b>IV.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS SONDAS FLUORESCENTES DE ÁCIDOS BILIARES</b>	93
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	125
<b>V.- NUEVOS SURFACTANTES GEMINI DE SALES BILIARES</b>	127
<b>V.1.-</b> Introducción	129
<b>V.2.-</b> <i>Gemini g-2DC<sub>24</sub>-AEDT</i>	141
<b>V.3.-</b> <i>Gemini g-2C<sub>24</sub>-AEDT</i>	174
<b>V.4.-</b> Breve introducción a los <i>crisales líquidos</i>	186
<b>V.5.-</b> <i>Gemini g-2DC<sub>24</sub>-PIR</i>	197
<b>V.6.-</b> <i>Gemini g-2C<sub>24</sub>-PIR</i>	225
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	234
<b>VI.- NUEVOS SURFACTANTES DIMÉRICOS DE SALES BILIARES</b>	241
<b>VI.1-</b> Breve revisión bibliográfica	243
<b>VI.2.-</b> Nuevos surfactantes diméricos: <i>d-2C<sub>3</sub>-AEDT</i> y <i>d-2DC<sub>3</sub>-AEDT</i>	258
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	272

<b>VII.- ESTUDIO DEL ISOMERISMO “IN-OUT” DE UN DERIVADO DE <math>\beta</math>-CICLODEXTRINA</b>	277
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	305
<b>COCLUSIONES</b>	311
<b>APÉNDICE A.- SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE SALES BILIARES</b>	321
<b>A.1.- Síntesis y caracterización del puente de unión derivado del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT)</b>	323
<b>A.2.- Síntesis del puente de unión derivado del ácido piromielítico (PMA)</b>	324
<b>A.3.- Síntesis y caracterización de los 24-aminoderivados del ácido cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico y ursodesoxicólico</b>	327
<b>A.4.- Síntesis y caracterización de los 3-aminoderivados del ácido cólico, desoxicólico y litocólico</b>	333
<b>A.5.- Síntesis, purificación y caracterización de compuestos <i>R-BS</i></b>	337
<b>A.5.a.- Síntesis del derivado aromático, colato-3-amino-benzoato de sodio</b>	338
<b>A.5.b.- Síntesis del derivado alifático, colato-3-amino-succinato de sodio</b>	339
<b>A.5.c.- Síntesis del derivado ácido 3-pirenocólico</b>	340
<b>A.5.d.- Síntesis del derivado ácido 3-pirenohitocólico</b>	341
<b>A.5.e.- Caracterización espectral. Espectros <math>^1\text{H}</math> y <math>^{13}\text{C}</math> resueltos</b>	341
<b>A.6.- Síntesis, purificación y caracterización de dímeros de ácidos biliares unidos mediante un puente de AEDT</b>	346

<b>A.6.a.-</b> Síntesis y purificación del <i>d</i> -2C <sub>3</sub> -AEDT	346
<b>A.6.b.-</b> Síntesis y purificación del <i>d</i> -2DC <sub>3</sub> -AEDT	346
<b>A.6.c.-</b> Caracterización espectral. Espectros <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C resueltos	347
<b>A.7.-</b> Síntesis, purificación y caracterización de <i>gemini</i> derivados de ácidos biliares	349
<b>A.7.a.-</b> Síntesis y purificación del <i>g</i> -2C <sub>24</sub> -AEDT	349
<b>A.7.b.-</b> Síntesis y purificación del <i>g</i> -2DC <sub>24</sub> -AEDT	350
<b>A.7.c.-</b> Síntesis y purificación del <i>g</i> -2DC <sub>24</sub> -PIR	351
<b>A.7.d.-</b> Síntesis y purificación del <i>g</i> -2C <sub>24</sub> -PIR	354
<b>A.7.e.-</b> Caracterización espectral. Espectros <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C resueltos	356
<b>A.7.f.-</b> Caracterización por Espectroscopia de Masas	359
<b>A.8.-</b> Síntesis de los epímeros del ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico	360
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	360
<b>APÉNDICE B.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES</b>	363
<b>B.1.-</b> Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	365
<b>B.1.a.-</b> Fundamentos físicos	365
<b>B.1.b.-</b> Acoplamiento espín-espín; Acoplamiento directo o bipolar; Acoplamiento indirecto o Espín-Espín y Acoplamiento múltiple	377
<b>B.1.c.-</b> Tipos de intercambio según los tiempos de los experimentos de RMN	385
<b>B.2.-</b> Balanza de tensión superficial	388

## *Índices*

---

<b>B.2.a.-</b> Fundamentos físicos	388
<b>B.2.b.-</b> Medida de la tensión superficial	395
<b>B.3.-</b> Espectroscopia de Fluorescencia	397
<b>B.3.a.-</b> Rendimiento cuántico de fluorescencia	398
<b>B.3.b.-</b> Tiempo de vida de fluorescencia	399
<b>B.3.c.-</b> Espectroscopia de Fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal	400
<b>B.3.d.-</b> Análisis de datos	402
<b>B.4.-</b> Dispersión de luz	403
<b>B.4.a.-</b> Difusión Estática de la luz (Static Light Scattering, SLS)	404
<b>B.4.b.-</b> Difusión Dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS)	409
<b>B.4.c.-</b> Equipos utilizados	413
<b>B.5.-</b> Otras técnicas utilizadas	414
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	415



## *CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN*

---





## Capítulo I

---

Toda tesis doctoral se desarrolla en un contexto que viene limitado por sus objetivos, que comúnmente son parte de un proyecto de investigación más ambicioso o amplio, el cual, a su vez, se enmarca en una disciplina científica cuyas fronteras están generalmente definidas de un modo difuso. La disponibilidad de técnicas instrumentales, en caso de que sean necesarias, o la capacidad económica del grupo de investigación en el que se realiza, son también variables que la encorsetan. Asimismo, la ejecución de la tesis doctoral está limitada en el tiempo por los plazos de ejecución definidos por las ayudas económicas al doctorando (usualmente en forma de beca de investigación) y al grupo de investigación en el que aquel se encuadra. Difícilmente, los límites definidos por estas variables externas pueden ser sobrepasados.

Por otra parte, existen otras variables asociadas al propio proceso investigador y que son, si cabe, tan importantes como las definidas en el párrafo anterior. Entre ellas podemos mencionar el avance de la propia investigación, determinado por los logros parciales de la misma, la aparición de novedades científicas relevantes alcanzadas por otros autores y que directamente inciden en el estudio ya iniciado, la adquisición o disponibilidad de nuevas técnicas instrumentales o, incluso, la aparición de una idea más prometedora que la que se encuentra en vías de evolución. Todas estas variables van introduciendo variaciones en la orientación inicial de la tesis doctoral, obligando a redefinir, al menos en parte, los objetivos iniciales de la misma.

Comentemos algunas de las variables mencionadas en los párrafos anteriores para el caso concreto de la presente tesis doctoral. En primer lugar, esta tesis doctoral se ubica en el ámbito de la *Química Supramolecular* a la que Jean Marie Lehn<sup>1</sup> le otorgó buena parte de su significado actual hace una treintena de años. Desde el descubrimiento de los éteres corona de Pedersen<sup>2</sup> en 1967, esta disciplina ha experimentado una evolución conceptual vertiginosa, marcándose, paralelamente, objetivos inimaginables en sus comienzos. Ambos aspectos, conceptual y finalidad, están resumidos en las preguntas definidas por el propio Lehn<sup>3</sup> que recopilamos en el *cuadro I.1*.

Las tres preguntas anteriores encierran una palabra clave y que, explícitamente, aparece en la segunda de ellas, esto es, evolución. Quizá desconozcamos cómo ha ido evolucionando la naturaleza hacia su momento actual, pero sí que estamos francamente familiarizados con el desarrollo de toda índole alcanzado por la humanidad. Este no puede entenderse sin el proceso evolutivo de una idea, modelo, teoría o dispositivo iniciales que fue transformándose sucesivamente hasta su diseño actual, implicando, algunas veces, saltos



vertiginosos y, en otras ocasiones, pasos menores. En este proceso, han estado (y están) involucradas, mentes privilegiadas y otras, que sin serlo tanto, son igualmente imprescindibles. Todo ello es cierto aún cuando muchos hallazgos fuesen alcanzados de un modo serendípico, aspecto al que no es ajeno el descubrimiento de los éteres corona por Pedersen.

- ¿Cómo se vuelve compleja la materia?
- ¿Cómo ha sido la evolución hacia sistemas más complejos (incluyendo los organismos inteligentes)?
- ¿Qué otras formas de materia compleja pueden ser desarrolladas y creadas?

**Cuadro I.1.-** Preguntas formuladas por Jean -Marie Lehn<sup>3</sup> y que definen el presente *status* de la Química Supramolecular.

Así pues, podemos concluir que a la hora de desarrollar una idea o un proceso, partimos, casi inevitablemente, de un estadio anterior de desarrollo. Por lo tanto, parece lógico que si vamos a trabajar con productos de origen natural conozcamos su papel en la propia naturaleza y las razones por las que funcionan tal y como lo hacen. Tal comprensión encierra que, en nuestro estudio, obviamos, por desconocimiento, cualquier desarrollo intermedio que la naturaleza en su evolución haya descartado. Menger<sup>4</sup> lo ha interpretado de otra manera: “al imitar a la naturaleza, incluso para mejorar los resultados de la evolución natural, uno puede diseñar en el papel un dispositivo con funcionalidades orientadas óptimamente, dedicar tiempo, recursos y gente en obtenerlo, mientras nos preguntamos si, al final, será un fracaso”. Esta frase resume el riesgo de diseñar, por ejemplo, una estructura supramolecular para una determinada finalidad y comprobar, cuando ya se han aplicado todos los esfuerzos necesarios, que el dispositivo no alcanza el objetivo para el que había sido diseñado.

En esta memoria presentamos la síntesis y caracterización fisicoquímica de nuevos derivados de ácidos biliares. En el contexto esbozado en los párrafos anteriores, la cuestión es entonces ¿por qué el grupo de investigación en el cual se ha desarrollado la presente tesis, ha elegido los ácidos biliares como materiales de partida? Tenemos una primera respuesta en el catálogo de grupos de investigación



## Capítulo I

---

de la Universidad de Santiago, el cual reconoce al grupo GI-1589 con la denominación “Fisicoquímica de Coloides y Química Supramolecular”, y en el hecho de que los ácidos biliares naturales son tensioactivos<sup>5</sup> bien caracterizados y que originan diversos tipos de estructuras supramoleculares, incluyendo complejos de inclusión en estado sólido,<sup>6</sup> estado en el que los ácidos biliares siguen ciertas pautas de auto-reconocimiento a través de los grupos hidroxilo y el grupo ácido carboxílico de la cadena lateral.<sup>7</sup> Obviamente, los ácidos biliares están implicados en múltiples procesos biológicos que requieren reconocimiento molecular, como, por ejemplo, por parte de las proteínas transportadoras específicas localizadas en las membranas apical y basal de los ileocitos y basolateral y canalicular de los hepatocitos.

Los ácidos biliares aparecen ampliamente distribuidos en el mundo animal (mamíferos, peces...) y se ha postulado que su estructura química ha de estar correlacionada con la evolución de los vertebrados,<sup>8</sup> aunque la etiología de la evolución molecular de los ácidos biliares todavía esté pobremente entendida.<sup>9</sup> Existen evidencias de la evolución de los ácidos biliares desde sulfatos C<sub>27</sub> a ácidos C<sub>24</sub>.<sup>8</sup> Así, podemos afirmar que los ácidos biliares parecen ser la solución óptima que la naturaleza ha conseguido para multitud de procesos biológicos y probablemente están asociados a una etapa crucial de la evolución biológica.

Los comentarios anteriores no deben inducir al error de que los esteroides pertenecen exclusivamente al reino animal. Antes bien, el núcleo esteroide tiene un cierto carácter universal. Por ejemplo, los brassinosteroides comprenden una clase de derivados de esteroides de aparición prácticamente ubicua en el mundo vegetal. Entre las hormonas del reino animal, los brassinosteroides son los compuestos que estructuralmente más se asemejan a las hormonas esteroides de los animales. Igual que aquéllas, regulan la expresión de numerosos genes, contribuyen a la división y diferenciación celular, están implicadas en procesos que regulan el crecimiento de las plantas, son esenciales para la diferenciación vascular, la fertilidad femenina, la senescencia, el desarrollo de las hojas, la respuesta a la luz, etc.<sup>10</sup>

Sería pretencioso dar una respuesta global a la pregunta ¿cuáles son las características del núcleo esteroide que lo hacen tan universal? y, por ello, reduciremos nuestra respuesta al ámbito de los ácidos biliares, aunque algunos comentarios son posiblemente extrapolables a la familia de compuestos esteroides. Nos referiremos al ácido desoxicólico de la *figura 1.1* como referencia. En primer lugar, todos los ácidos biliares presentan el núcleo esteroide compuesto de tres anillos de seis átomos de carbono (A, B y C) y un anillo D de cinco átomos de carbono. Una primera diferencia entre los diversos ácidos biliares radica en la



estereoquímica de los anillos A y B. En vertebrados superiores esta unión es *cis* (configuración 5 $\beta$ ), mientras que en vertebrados inferiores, la unión es *trans* (configuración 5 $\alpha$ ), denominándoseles ácidos *allo*-biliare. La consecuencia es que los *cis* presentan el anillo A fuera del plano formado por los otros anillos, mientras que los *allo*-derivados son prácticamente planos.

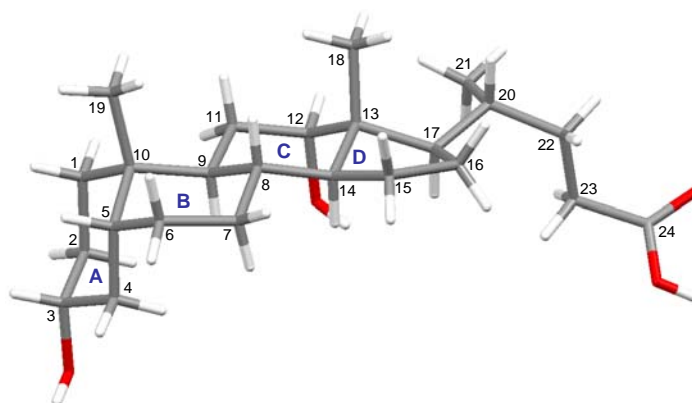


Figura I.1.- Estructura del ácido desoxicólico.

En los carbonos C10 y C13 existen dos grupos metilo (C18 y C19) orientados por lo tanto hacia la denominada cara  $\beta$  del núcleo, y en la posición C17 del anillo D se ubica una cadena lateral que porta un grupo ácido, si bien también existen compuestos con un grupo terminal hidroxilo definiendo los denominados alcoholes biliare.<sup>9</sup> Existen cuatro tipos de alcoholes biliare (C27, C26, C25 y C24) que aparecen en especies menos desarrolladas y dos clases de ácidos biliare, C27 y C24, siendo estos últimos (a los que pertenece el ácido desoxicólico) los que aparecen en los vertebrados superiores.

Además de las dos diferencias ya resaltadas (estereoquímica de los anillos A/B) y estructura de la cadena lateral, existen diversos ácidos biliare que se diferencian entre sí por el número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilo ubicados en el núcleo esteroide. Las ubicaciones más comunes son C3, C7 y C12, y la orientación más frecuente es hacia la cara  $\alpha$  del núcleo esteroide. Este último hecho determina el carácter de anfífilo facial de los ácidos biliare ya que la cara  $\alpha$  es hidrófila y la  $\beta$  es hidrófoba, siendo responsable de su



## Capítulo I

---

comportamiento como tensioactivos, formando agregados de distinta naturaleza,<sup>11</sup> y de su capacidad de solubilización de fármacos y del colesterol.<sup>12</sup> Finalmente, los ácidos biliares pueden estar conjugados con la taurina o la glicina formando los denominados tauro-derivados y glico-derivados.

Todo ello hace que los ácidos biliares tengan la capacidad de responder a distintas demandas que la actividad metabólica de un organismo pueda demandarles y que, por lo tanto, constituyan, como decíamos, la solución óptima que la naturaleza se ha otorgado.

Son diversas las formas que la *Química* otorga para modificar los ácidos biliares, siendo quizá la más obvia, la de modificar la naturaleza de las distintas funciones orgánicas que poseen. Esto ha sido explorado en la bibliografía. Por ejemplo, se ha transformado el grupo ácido terminal en un grupo amino<sup>13</sup> y en ácido fosfónico,<sup>14</sup> se han generado diversos ésteres<sup>15</sup> con los alcoholes del grupo esteroide, se han poliaminado<sup>16</sup> y también se han obtenido diversas amidas en la posición C24 que muestran una gran capacidad gelificante.<sup>17</sup> Sin embargo, es posible plantear el problema en una dimensión diferente como es la de intentar modificar la relación hidrofília/hidrofobia entre las dos caras del ácido biliar, añadiendo, por ejemplo, algún grupo hidrófobo que extienda la región hidrófoba de la cara  $\beta$ . *A priori*, sería de esperar una mayor facilidad para la auto-asociación del ácido biliar (o sus sales) con la consecuente reducción de la concentración de agregación crítica, *cac*. Los dos ejemplos publicados hasta el momento con el grupo adamantilo y el *tert*-butilfenilo ubicados en la posición 3 del anillo A, muestran una elección acertada. Ambos grupos reducen la *cac* del ácido cólico (siempre considerado en su forma de sal sódica) entre 30 y 40 veces. Pero lo que es más importante, el derivado con el grupo adamantilo genera estructuras laminares<sup>18</sup> y el derivado *tert*-butilfenilo forma estructuras tubulares.<sup>19</sup> De esta forma, se responde parcialmente a la tercera de las preguntas formuladas por Jean Marie Lehn (*cuadro 1*). Con esta idea, se sintetizaron los derivados de pireno que se discuten en el *capítulo IV*, aunque sus características fluoróforas aconsejaron realizar una caracterización más exhaustiva en la dirección de ser utilizadas como posibles sondas fluorescentes.

El caso contrario, es decir, ubicar en la posición 3 grupos hidrófilos es explorado en la presente tesis doctoral y los resultados obtenidos se discuten en el *capítulo III* de esta memoria. Al margen de los estudios de carácter fisicoquímico que allí se comentan, debemos reflejar aquí un hecho importante como es el que el compuesto portando el ácido succínico es muy activo contra la faloidina, toxina procedente de la *Amanita phalloides*, y cuyo único tratamiento conocido es el



trasplante de hígado. Estos estudios fueron realizados por el grupo del Prof. J. J. García Marín (Universidad de Salamanca) a quien le suministramos el citado compuesto. De este modo, encontramos un nuevo argumento para continuar con la investigación y metodología emprendidas.

La observación ya citada de la disminución de la *cac* al agregar los grupos hidrófobos, sugirió que una alternativa a la extensión de la región hidrófoba pudiera ser la obtención de oligómeros derivados de ácidos biliares, fundamentalmente dímeros y trímeros, algunos de los cuales fueron estudiados paralelamente por Victor H. Soto Tellini y que formaron parte de su tesis doctoral.<sup>20</sup> En relación con los dímeros, son tres las estructuras fundamentales que pueden ser diseñadas. En lo que sigue, entendemos por “cola” la posición 3 del anillo esteroide y por “cabeza” la cadena lateral portando el grupo carboxílico. Por lo tanto, los dímeros sintetizables serían *cola-cola*, *cabeza-cabeza* y *cabeza-cola*. Los primeros fueron estudiados en la citada tesis de Victor H. Soto, y los terceros están siendo explorados por el doctorando Álvaro Antelo Queijo, mientras que en esta tesis se hace referencia en el *capítulo VI* a los dímeros *cabeza-cabeza*. Ahora bien, con el fin de no perder la función carboxílica, que lógicamente define el carácter de ácido biliar, el puente elegido para la unión de las dos unidades biliares debe ser tal que conserve tal función. Para ello, se eligieron puentes dianhídridos y se transformó el grupo ácido C24 en un grupo amino. De esta forma, se obtienen tensioactivos de estructura *gemini* y que son descritos en el *capítulo V* de esta memoria. Como se verá, los valores de *cac* medidos son del orden de  $\mu\text{M}$ , observándose, en algún caso, la formación de cristales líquidos. De esta forma, ampliamos la respuesta a la pregunta de Jean-Marie Lehn y confirmamos lo acertado del planteamiento de utilizar los ácidos biliares como excelentes materiales de partida para la obtención de nuevas estructuras supramoleculares. Por otra parte, y dada la crucial importancia en el proceso evolutivo del auto-reconocimiento, siguiendo la pauta iniciada por el grupo al estudiar de forma sistemática la formación de enlaces de hidrógeno en los cristales de los cuatro epímeros del ácido desoxicólico,<sup>7</sup> se ha llevado a cabo un estudio similar con los epímeros de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico. Los resultados se recogen y discuten en el *capítulo II*.

Ahora bien, lo hasta aquí expuesto no deja de ser un ejemplo más del proceso evolutivo de las ideas ya que las planificaciones ya aludidas, y otras en curso de investigación en el grupo, son el producto de los detallados estudios sobre los procesos de agregación de las sales biliares naturales que el grupo inició hace prácticamente veinte años. Ejemplos significativos de tales esfuerzos son las revisiones ya publicadas.<sup>11,21</sup>



## Capítulo I

---

Es hora de pasar a analizar otras variables enunciadas en los dos primeros párrafos de esta introducción.

Quien con esta memoria opta al grado de doctor, se incorporó al grupo de investigación “Grupo GI-1589” gracias a una beca del MEC asociada al proyecto de investigación MAT2001-2911 “Polímeros supramoleculares derivados de ciclodextrinas y sales biliares”, en el cual el conseguir polímeros mezcla ciclodextrinas-sales biliares era su principal objetivo. De acuerdo con los modelos isodésimicos,<sup>22,23</sup> cuanto más favorable sea la interacción entre los monómeros, para nuestro caso, cuanto mayor sea la constante de equilibrio entre la ciclodextrina y el huésped, mayor será el tamaño del polímero supramolecular a obtener. La interacción entre ciclodextrinas y sales biliares es francamente favorable, con constantes de equilibrio del orden de  $10^3$ ,<sup>24</sup> y, de hecho, se han obtenido polímeros y oligómeros con los mismos.<sup>25-27</sup> Pronto se comprobó que los derivados de adamantilo poseían ventajas apreciables sobre los de las sales biliares a la hora de obtener polímeros supramoleculares,<sup>20,28,29</sup> los cuales fueron obtenidos durante la realización, paralelamente a la presente, de otra tesis doctoral.<sup>20</sup> Además los polímeros ciclodextrina-adamantano son más fácilmente caracterizables que los ciclodextrina-sal biliar, mediante técnicas como RMN. Todo ello, conjuntamente con la actual consideración de que micelas, vesículas, y otros agregados procedentes típicamente de la asociación de surfactantes, tienen la consideración de polímeros supramoleculares,<sup>23</sup> así como los resultados inicialmente obtenidos con los compuestos *gemini* diseñados (*cac* del orden de  $\mu\text{M}$ , obtención de cristales líquidos, etc) hicieron que el proyecto inicial de la presente tesis doctoral sufriera un cambio drástico en su orientación, quedando definida tal y como recoge esta memoria. Es decir, nos encontramos ante un claro ejemplo de que “el avance de la propia investigación, determinado por los logros parciales de la misma” o “la aparición de una idea más prometedora que la que se encuentra en vías de evolución” determinan el resultado final y, por ende, los objetivos de la misma. Sin embargo, no nos hemos resistido a presentar como parte de esta tesis doctoral, algunos resultados obtenidos en la etapa inicial de la misma referidos a un derivado alquilaminado de la  $\beta$ -ciclodextrina. Este sistema constituye un ejemplo poco frecuente de isomerismo “in-out”,<sup>30</sup> y puede ser considerado un ejemplo más de máquina molecular,<sup>31</sup> aspectos ambos que residen en el corazón mismo de la Química Supramolecular. Este sistema se estudia en el *capítulo VII* de la memoria.

La ejecución de la tesis doctoral también se vio afectada por la disponibilidad de las técnicas instrumentales. Así, el equipo de medida de dispersión de luz, Malvern Modelo 4700, se dañó en el curso de esta investigación, no existiendo repuestos del mismo. Afortunadamente, gracias a becas del MEC y a



la cooperación con el grupo de investigación de los Profesores N. V. Pavel y L. Galantini de la Universidad de La Sapienza de Roma, pudimos realizar las medidas pertinentes e impedir que se paralizara la investigación. Del mismo modo, el equipo de medida de fluorescencia con resolución temporal, Edinburgh CD900, también estuvo fuera de servicio por lo que no han podido completarse todas las medidas necesarias para una resolución definitiva de los sistemas estudiados. A pesar de tales vicisitudes, la tesis doctoral continuó avanzando siguiendo la línea de pensamiento esbozada en esta introducción, y de los resultados obtenidos, discusión y conclusiones alcanzadas, damos cuenta en los próximos capítulos de esta memoria.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.
2. Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017-36.
3. Jean-Marie Lehn *PNAS* **2002**, *99*, 4763–4768.
4. Menger, F. M. *PNAS* **2002**, *99*, 4819.
5. Carey, M. C.; Small, D. M. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506-27.
6. Miyata, M.; Sada, K. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; MacNicol, D. D.; Toda, F.; Bishop, R., Elsevier: Oxford, **1996**, *6*, 147-176.
7. Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J.; Núñez, E. R.; Ton-Nu, H.-T.; Hofmann, A. F. *Steroids* **2004**, *69*, 379-388.
8. Haslewood, G. A. D. *J. Lipid Res.* **1967**, *8*, 535-50.
9. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 1666-1683.
10. Clouse, S. D. *Doi: 10.1199/Tab.0009*.
11. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, *3*, 323-335.
12. Wiedmann, T. S.; Kamel, L. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1743-1764.
13. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726-30.
14. Babu Ponnusamy; Chopra D; Row T N Guru; Maitra Uday *Org. Biomol. Chem.*



## Capítulo I

---

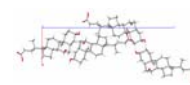
- 2005, 3, 3695-700.
15. Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Vijaykumar, P.; Maitra, U.; Rissanen, K.; Raju, A. R. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1922-1932.
  16. Davis, A. P. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 2939-2951.
  17. Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 821-836.
  18. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. J. *Phys. Chem. B* **2006**, 110, 13679-13681.
  19. Soto Tellini, V.; Jover, A.; Meijide, F.; Vázquez, J.; Galantini, L.; Pavel, N. *Adv. Mater. En imprenta.*
  20. Soto Tellini, V. H. *Tesis Doctoral* **2006**.
  21. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. J. *Pharm. Sci.* **1996**, 85, 9-15.
  22. Zhao, D.; Moore, J. S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3471-3491.
  23. A. Ciferri, *Supramolecular Polymers, 2<sup>nd</sup> Edition*; Taylor –Francis: New York, **2005**.
  24. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2003**, 15, 33-43.
  25. Singh, A.P.; Ramos Cabrer, R.; Álvarez Parrilla, E.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. J. *Inclusion Phenom. Mac. Chem.* **1999**, 35, 335–348.
  26. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Angew. Chem. Int., Ed.* **2000**, 39, 2856-2858.
  27. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Singh, A. P.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2002**, 14, 397-404.
  28. Tellini, V. H. S.; Jover, A.; Galantini, L.; Meijide, F.; Tato, J. V. *Acta Cristal.* **2004**, B60, 204-210.
  29. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Carrazana Garcia, J.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5728-5734.
  30. Álvarez Alcalde, M.; Gancedo, G.; Jover, A.; Carrazana, J.; Soto, V. H.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. J. *Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 13399-13404.
  31. Balzani, V.; Gomez-Lopez, M.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 405-414.



*CAPÍTULO II.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS  
EPÍMEROS DE ÁCIDOS BILIARES 3, 7 DIHIDROXÍLICOS*

---



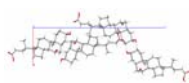


## II.1.- PERSPECTIVAS HISTÓRICAS

A pesar de que la investigación sobre los ácidos biliares tiene una historia de más de 100 años, en la actualidad no ha perdido vigencia alguna dada la importancia biológica y médica de los mismos. En estos últimos años, se ha logrado identificar la mayoría de los ácidos biliares naturales, tarea que comenzó en los inicios del siglo XIX con las primeras investigaciones sobre la naturaleza de los componentes de la bilis.

Gemelin, Thenard y Berzelius enfocaron su trabajo hacia los ácidos presentes en la bilis a mediados del siglo XIX. En 1848 Strecker logró aislar el ácido taurocólico y el glicocólico de la vesícula biliar del buey. Demarcay fue el primero en reconocer la uniformidad de la materia sólida en la bilis y caracterizar la taurina en 1838. Platner fue el primero en preparar una muestra cristalina de un ácido biliar mediante la adición de éter a una disolución seca de ácido biliar. En 1886 Mylius descubrió el ácido desoxicólico, y también otorgó una gran importancia biológica al ácido cólico al encontrarse presente en la bilis de un gran número de animales vertebrados. El ácido litocólico no se conoció hasta 1911 cuando Fischer consiguió aislarlo de piedras generadas en la vesícula biliar de buey.<sup>1</sup>

En 1912, Heinrich Otto Wieland<sup>1</sup> comienza su investigación sobre los ácidos biliares producidos por el hígado, y encontró que los tres ácidos que él había aislado tenían una estructura similar a la del colesterol. Al mismo tiempo, Windaus logró con éxito la transformación del colesterol en ácido colánico, uno de los ácidos biliares aislados ya por Wieland. Bernal en 1932 resolvió la estructura del ciclopentano-*per*hidrofenantreno del colesterol mediante Espectroscopia de Rayos X y Rosenheim y King determinaron correctamente la estructura de los ácidos biliares en 1934. Gracias a estos trabajos, algunos de estos autores fueron merecedores del Premio Nobel. La *tabla II.1* recoge los galardonados con tal premio cuyas investigaciones han estado relacionadas con el colesterol o los ácidos biliares. Los trabajos citados sentaron una base científica sólida para el estudio de los ácidos biliares y compuestos relacionados. Así, en la década de los cuarenta el ácido cólico, que ya se aislaba fácilmente de la bilis de buey, se convirtió en un producto de interés comercial al descubrirse los efectos anti-inflamatorios de la cortisona (*figura II.1*), por lo que los esfuerzos sintéticos en estos años se centraron en la ruta de conversión del ácido desoxicólico en esteroides con propiedades anti-inflamatorias. A partir de la década de los cincuenta se desarrollaron multitud de estudios sobre ácidos biliares, entre los que cabe citar el aislamiento y caracterización de numerosos ácidos biliares presentes en diferentes especies

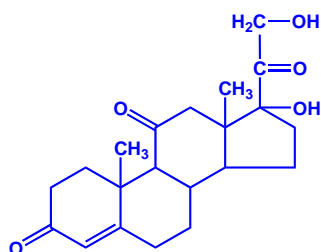


animales, exhaustivos estudios metabólicos y estudios detallados de las propiedades fisicoquímicas de los mismos.

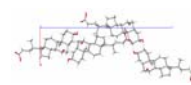
**Tabla II.1.-** Premios Nobel otorgados a investigadores cuyo trabajo estuvo relacionado con el colesterol o con sales biliares.

Año	Investigador/es	Premio Nobel
1927	Wieland, H. O.	Química
1928	Windaus, O. R.	Química
1939	Ruzicka, L.	Química
1947	Robinson, R.	Química
1950	Diles, O. P.	Química
1964	Bloch, K. E. y Lynen, F.	Fisiología y Medicina
1965	Woodward, R. B., Hassel, O. y Barton, D. H.	Química
1975	Conforth, J. W.	Química
1985	Goldstein, J. L. y Brown, M. S.	Fisiología y Medicina

**Figura II.1.-** Fórmula química de la cortisona.

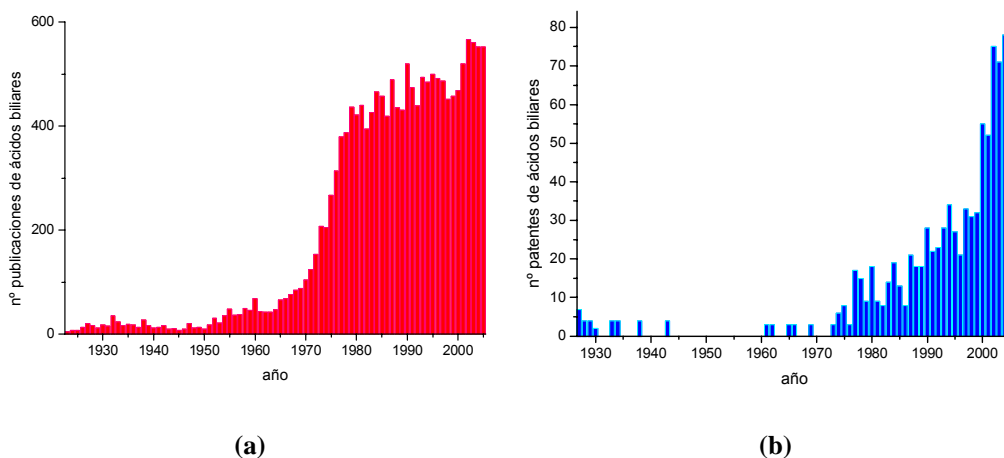


En los años 60-80 se observó un gran auge en el número de publicaciones y patentes que versan sobre sales biliares (*figura II.2*), lo que se atribuye al descubrimiento de nuevas aplicaciones en campos muy variados. Así, por ejemplo, los ácidos biliares y sus derivados han sido utilizados como receptores supramoleculares de varios tipos de huéspedes e iones. Debido a su esqueleto químico, los ácidos biliares constituyen un pilar importante en el estudio del reconocimiento molecular, de la química huésped-anfitrión y de la química



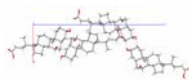
biomimética. También se han utilizado los ácidos biliares como quelatantes y agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen. Han sido preparados diversos derivados como agentes antibacterianos, antifúngicos o precursores de fármacos. Ciertos ácidos biliares y sus análogos actúan como agentes gelificantes potentes en medio acuoso u orgánico. En consecuencia, el número de patentes ha aumentado considerablemente. Buscando el término “bile acid” nos aparecen 16655 referencias bibliográficas que lo incluyan y 50615 su concepto.<sup>#</sup> La búsqueda de patentes arroja 1013 referencias.

En 1984, A. Hofmann se aventuró a decir que si los 25 años precedentes habían sido fructíferos en el campo de las sales biliares, los próximos 25 años, en los que nos encontramos, serían todavía más satisfactorios ya que a los estudios fisicoquímicos y fisiológicos sobre ácidos biliares se les uniría la química orgánica y la biología celular. Efectivamente, esta unión se tradujo en un clarísimo aumento en el número de publicaciones tal y como se refleja en la *figura II.2*. En la *tabla II.2* se puede observar el número de publicaciones referidas a cada ácido biliar por separado. El ácido cólico y desoxicólico presentan un nivel de publicaciones bastante superior a los ácidos quenodesoxicólico, ursodesoxicólico, y litocólico.



**Figura II.2.-** Número de (a) publicaciones y (b) patentes que contienen el término “bile acid” localizados mediante SCIFINDER.

<sup>#</sup>La búsqueda fue realizada hasta el 14-07-2006, mediante SCIFINDER. GOOGLE ACADÉMICO arroja 1360 referencias a lo largo de 2006.



**Tabla II.2.-** Número de publicaciones referidas a los distintos ácidos biliares presentes en el organismo humano. Búsqueda realizada desde el año 1920 hasta la actualidad.

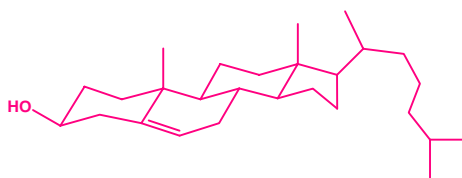
Término de búsqueda	Nombre en castellano	Nº de publicaciones
Cholic acid	Ácido cólico	8459
Deoxycholic acid	Ácido desoxicólico	7543
Chenodeoxycholic acid	Ácido quenodesoxicólico	5128
Ursodeoxycholic acid	Ácido ursodesoxicólico	4540
Lithocholic acid	Ácido litocólico	4012

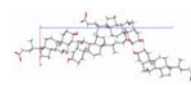
No es de esperar el descubrimiento de muchos ácidos biliares naturales nuevos. Se podría predecir que no son muchos los nuevos ácidos C24 (*figura I.1*) que se van a encontrar, ya que la mayoría de las especies de vertebrados presentan ácidos biliares comunes. Sin embargo sí que se espera encontrar nuevas moléculas de ácidos C27.<sup>2</sup>

## II.2.- ÁCIDOS BILIARES NATURALES. ASPECTOS IMPORTANTES. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES

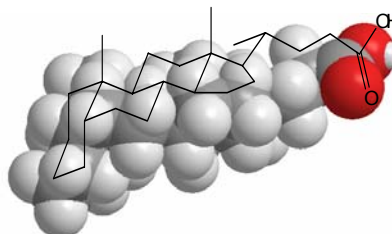
Se considera ácido biliar o sal biliar a cualquiera de los ácidos resultantes de la bioconversión o modificación química del colesterol (*figura II.3*). En los vertebrados superiores, los ácidos biliares más importantes presentan una estructura que deriva del ácido colánico (*figura II.4*): un grupo esteroide de 24 átomos de carbono con un núcleo compuesto por cuatro anillos saturados y una cadena lateral alifática corta.

**Figura II.3.-** Estructura del colesterol, molécula casi completamente saturada. El único doble enlace, entre los átomos de carbono 5 y 6, le otorga cierta planaridad. Posee un núcleo esteroide 3β-hidroxilado con 19 átomos de carbono y una cadena lateral compuesta de 8 átomos de carbono.

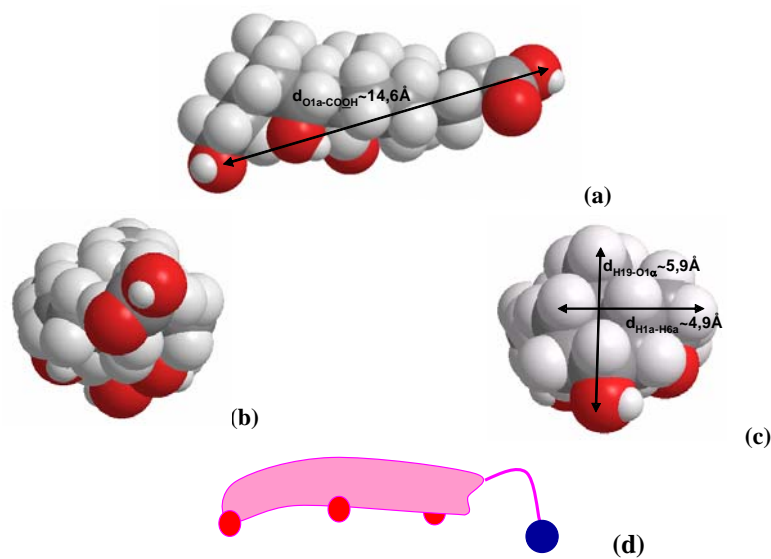




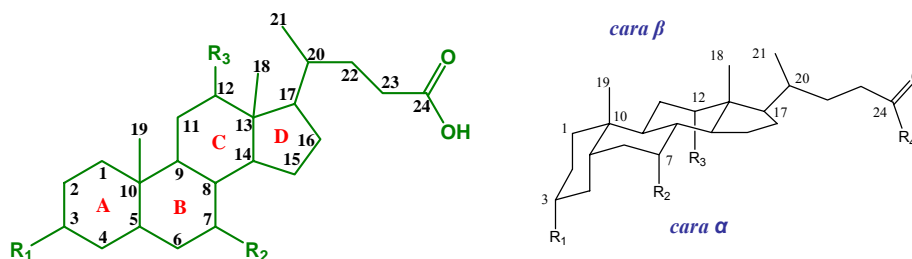
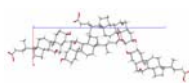
**Figura II.4.-** Estructura del ácido colánico o (R)-4-((8R,9S,10S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoico.



Como se puede observar en la *figura II.5*, el núcleo esteroide de los ácidos biliares consiste en una estructura hidrocarbonada saturada, denominada ciclopentano-*per*hidrofenantreno.<sup>3</sup> Otros aspectos ya han sido comentados en la *introducción* de esta tesis doctoral. La *figura II.6* recoge la funcionalidad de los ácidos biliares más comunes.



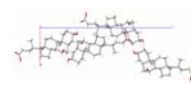
**Figura II.5.-** Estructura del ácido cólico tridimensional. Vistas lateral (a) y frontal desde la cadena lateral (b) o desde el anillo A (c). (d) Croquis representativo. Las medidas son aproximadas y han sido obtenidas a partir de los modelos básicos que presenta el programa de diseño molecular CHEM3D.



	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>Ácido colánico</b>	H	H	H	OH
<b>Ácido cólico</b>	OH	OH	OH	OH
<b>Ácido quenodesoxicólico</b>	OH( $\alpha$ )	OH( $\alpha$ )	H	OH
<b>Ácido desoxicólico</b>	OH	H	OH	OH
<b>Ácido ursodesoxicólico</b>	OH( $\alpha$ )	OH( $\beta$ )	H	OH
<b>Ácido litocólico</b>	OH	H	H	OH
<b>Glicocolato</b>	OH	OH	OH	NHCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>
<b>Taurocolato</b>	OH	OH	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

**Figura II.6.-** Estructura bi y tridimensional y numeración de un ácido biliar C24. Se indica la estructura de los ácidos biliares más importantes y de sus derivados con glicina y taurina (presentes en el cuerpo humano).

Los ácidos biliares más comunes presentan como base la estructura del ácido colánico con las posiciones 3 y 7 hidroxiladas por lo general, con orientación  $\alpha$ , siendo el ácido ursodesoxicólico la gran excepción. Los ácidos biliares C24 suelen presentar con más o menos frecuencia un grupo hidroxilo adicional, ya sea en el núcleo o en la cadena lateral. La hidroxilación en la cadena lateral se realiza en la posición C23, generando los ácidos  $\alpha$ -hidroxi biliares, o en la C22, constituyendo los ácidos  $\beta$ -hidroxi biliares. Esta hidroxilación en el núcleo puede tener lugar en varios lugares:  $1\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $2\beta$ ,  $4\beta$ ,  $5\beta$ ,  $6\alpha$ ,  $6\beta$ ,  $12\alpha$ ,  $12\beta$ ,  $15\alpha$ ,  $16\alpha$  y  $19\beta$ . Basados en los análisis de Hagey, esta tercera hidroxilación parece tener preferencia por las posiciones C12 y C16. Debido al largo número de especies



avícolas que poseen el ácido  $3\alpha,7\alpha,16\alpha$ -trihidroxi- $5\beta$ -colánico (ácido avicolico, véase la *figura II.7*), posiblemente sea el de mayor distribución entre las especies dentro de las sales biliares trihidroxiladas.<sup>2</sup> En resumen, los ácidos biliares de las distintas especies difieren químicamente en tres aspectos: **(i)** estereoquímica de los anillos A/B, **(ii)** estructura de la cadena lateral y **(iii)** distribución del número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilos en el núcleo esteroide.<sup>4 5</sup>

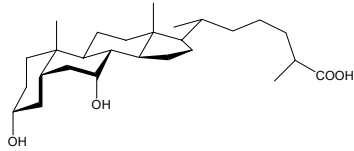
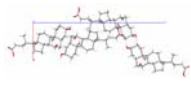
La mayoría de los ácidos biliares se encuentran en la naturaleza en forma de sus sales sódicas aunque en algunos casos pueden aparecer conjugados con determinados aminoácidos como la glicina (un 75% de los ácidos biliares conjugados) y con la taurina (un 25%), dando lugar a la formación de las correspondientes amidas.

### II.3.- BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES

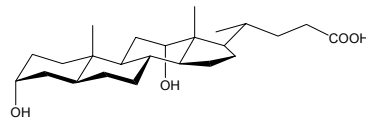
La síntesis del colesterol a partir del acetyl-coenzima A, a través de la ruta del ácido mevalónico, y su posterior degradación metabólica a ácidos biliares, representan las dos rutas biosintéticas fundamentales en la regulación de la homeostasis del colesterol. Por ello las sales biliares naturales proceden en su mayoría de esta modificación enzimática del colesterol (*figura II.8*), siendo por lo tanto estas sales biliares los derivados polares del colesterol.<sup>4,6</sup>

Como ya hemos visto, la molécula de colesterol tiene 27 átomos de carbono y sólo una posición hidroxilada, por lo que es necesario realizar modificaciones estructurales en esta molécula para obtener las sales biliares. En esta ruta metabólica se encuentran unas 15 reacciones enzimáticas y requiere, al menos, de unos cinco pasos tanto en el cuerpo cíclico como en la cadena lateral. Además, los pasos biosintéticos podrían ocurrir en cualquier orden, no siendo sencilla la elucidación del mecanismo.<sup>7</sup>

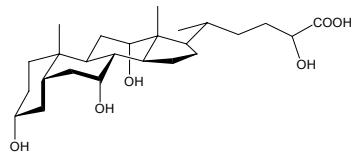
Según esta ruta biosintética, los ácidos biliares se pueden dividir en dos grandes grupos: ácidos biliares primarios que se obtienen directamente de la conversión del colesterol, como son el ácido cólico y el quenodesoxicólico, y los ácidos biliares secundarios como el desoxicólico y el litocólico que se obtienen de la conversión de los ácidos primarios.



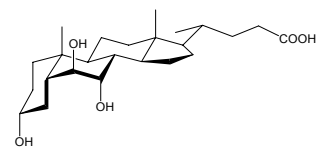
Ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxiprostánico (cocodrilos y condor)



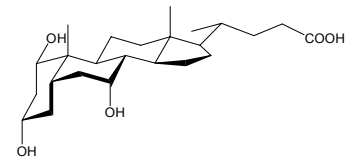
Ácido alodesoxicólico (conejos)



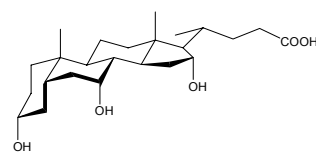
Ácido 23R-hidroxicólico (serpientes y focas)



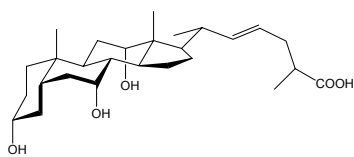
Ácido  $\beta$ -muricólico (rata)



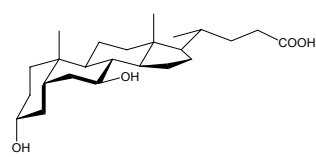
Ácido 1 $\alpha$ -hidroxiqenodesoxicólico (marsupiales)



Ácido avicólico (aves)

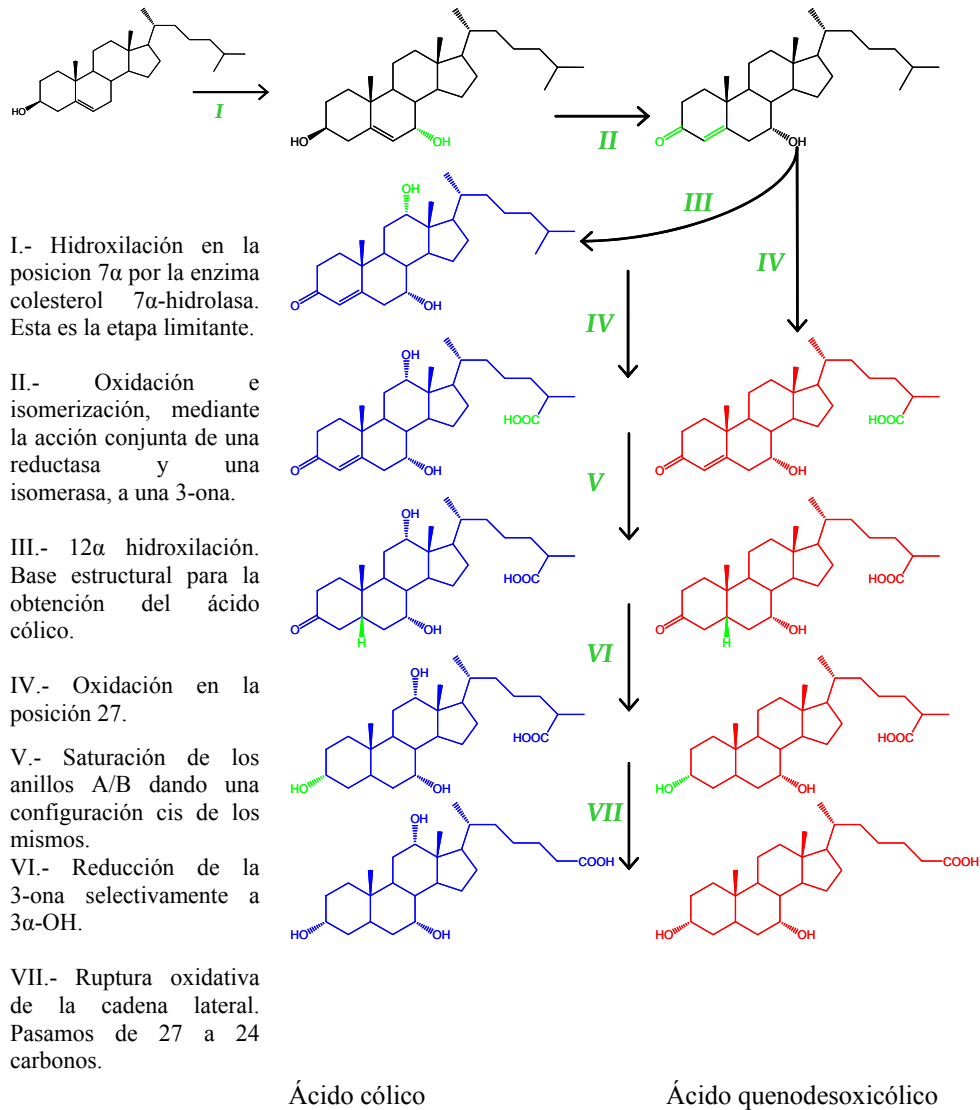
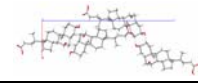


Ácido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihidroxi-23-eno-25 $\alpha$ -coprostánico (sapos)

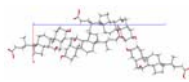


Ácido ursodesoxicólico (5% de los ácidos biliares presentes en los humanos, osos y nutrias)

**Figura II.7.-** Estructura de algunas estructuras presentes en ácidos biliares de diferentes especies vertebradas.



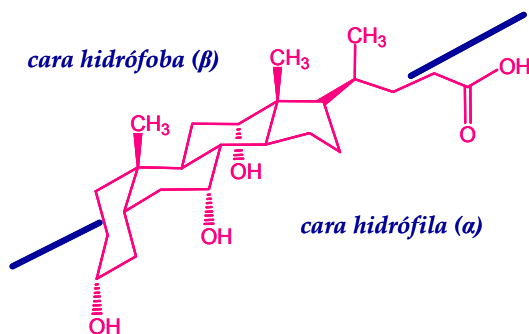
**Figura II.8.-** Posible ruta metabólica de obtención de los ácidos biliares primarios presentes en el organismo humano.



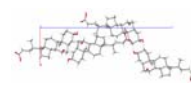
#### II.4.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS BILIARES

La naturaleza anfipática de los ácidos biliares se debe a que presentan una zona convexa hidrófoba superior, cara  $\beta$ , en la que se sitúan los dos grupos metilo C18 y C19 apolares, y una zona inferior cóncava e hidrófila, cara  $\alpha$ , cuyo carácter hidrófilo se debe a existencia de los grupos OH orientados hacia esta cara (*figura II.9*). También les confiere características de surfactantes la cadena lateral con un grupo carboxílico en el extremo. Esta doble polaridad planar explica la tendencia que estas moléculas tienen a la auto-asociación en medio acuoso dando lugar a agregados, comúnmente llamados micelas. Algunas de las propiedades fisiológicas más importantes de las sales biliares, como puede ser el transporte de lípidos, se derivan de esta naturaleza anfífila.<sup>8</sup>

**Figura II.9.-** Representación del carácter anfífilo de un ácido biliar. El esquema molecular representado corresponde al ácido cólico.<sup>9</sup>

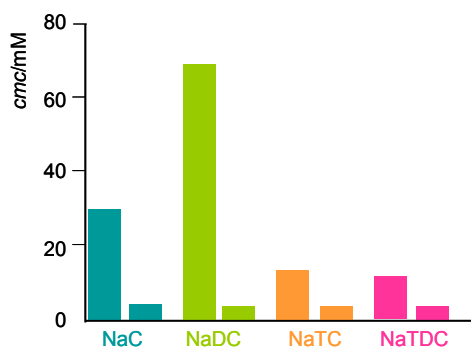


El concepto de *cmc* (concentración micelar crítica) aplicado a las sales biliares no es aceptado universalmente. Así, Kratochvil<sup>10</sup> afirma que no existe una *cmc* real, sino que la transición entre monómeros y agregados es progresiva. Por su parte, Ekwall<sup>11</sup> sugiere un proceso de agregación de tres etapas con concentraciones críticas características. Estas discrepancias nacen, en parte, de la diferente sensibilidad de los métodos experimentales hacia la detección de los agregados que se forman. A grandes rasgos (en el *capítulo III* se verá con más detalle) podemos agrupar estos métodos en dos categorías, los invasivos y los no invasivos. Entre los primeros cabe mencionar los que utilizan sondas (colorantes, fluoróforos, etc.) que se solubilizan en el interior de los agregados, o aquellos que miden coeficientes de partición. Entre los segundos, podemos citar la medida de



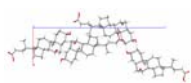
tensión superficial, crioscopía, índice de refracción, etc.<sup>12</sup> El resultado de todo ello es una enorme dispersidad de los valores publicados para la *cmc* de las sales biliares. La *figura II.10* es fiel reflejo de lo afirmado. Por otra parte, podemos encontrar una discusión detallada sobre los méritos de tales aproximaciones en el trabajo de Carey.<sup>13</sup> En nuestra opinión, los métodos no invasivos suministran valores de *cmc* más realistas. Por su parte, Kratochvil<sup>10</sup> ha evaluado de un modo crítico, la utilización en este campo de técnicas instrumentales como *Light Scattering*, sedimentación, osmometría de membrana, etc. Otros motivos responsables de las discrepancias anteriores pueden deberse al grado de pureza de los reactivos<sup>14</sup> o a la utilización de un pH demasiado bajo que no asegura la completa ionización de la función carboxílica (debemos recordar aquí que este hecho puede tener importantes consecuencias como, por ejemplo, originar geles).<sup>15</sup>

La controversia acerca de la existencia o no de una verdadera *cmc* está fuertemente ligada al tamaño de los agregados y su polidispersidad, y alcanza a la estructura de los agregados.



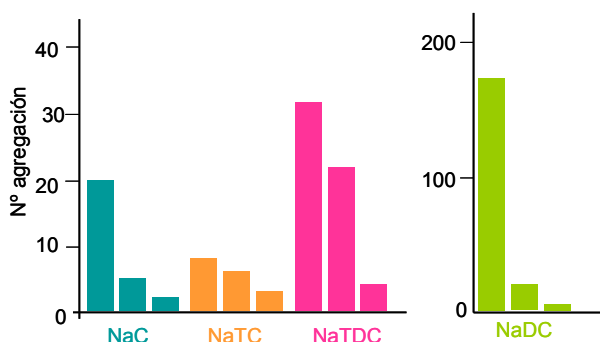
**Figura II.10.-** Valores máximos y mínimos publicados para la *cmc* de cuatro sales (sódicas) biliares representativas: colato (NaC), desoxicolato (NaDC), taurocolato (NaTC) y taurodesoxicolato (NaTDC).<sup>12,16</sup>

Dado que el tamaño y crecimiento de los agregados de las sales biliares es sensible a variables como la temperatura, la fuerza iónica, el pH, la existencia de impurezas, etc., las condiciones experimentales en las que se ha llevado a cabo la determinación deberían ser perfectamente controladas y especificadas, aspectos que no siempre han sido definidos correctamente en las fuentes bibliográficas



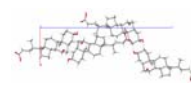
oportunas. Por otra parte, la mayoría de los métodos utilizados para determinar el tamaño de los agregados requiere la extrapolación a la *cmc*, por lo que, estrictamente hablando, los valores así conseguidos sólo serían válidos a esa concentración (supuesto que esté correctamente determinada). Como consecuencia de lo anterior, la bibliografía arroja una dispersión de valores difícilmente justificable. La *figura II.11*, referida a los valores máximos y mínimos de los números de agregación para cuatro sales biliares típicas, refleja claramente esta problemática. En nuestra opinión aquellas técnicas, como la medida del punto de congelación, que permiten la determinación del número de agregación del tamaño a cada concentración utilizada, son propicias frente a las que demandan cualquier tipo de extrapolación.

La dispersión de valores en los trabajos publicados también concierne a la determinación de la fracción de contraiones enlazados a la micela. Por ejemplo, para el colato sódico se han publicado valores que van desde 0,03<sup>14</sup> hasta 0,7.<sup>17</sup> La *figura II.12* resume los valores máximo y mínimo de la fracción de contraiones publicados para las mismas sales biliares a las que venimos refiriéndonos.<sup>12</sup>

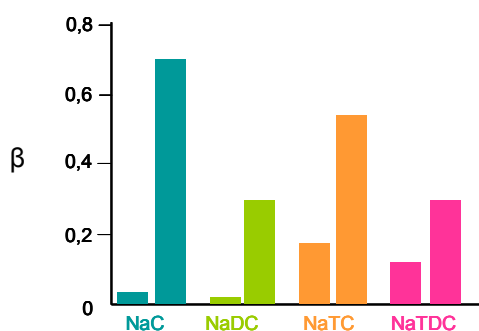


**Figura II.11.-** Números de agregación máximo, medio y mínimo publicados para las cuatro sales biliares indicadas en la imagen.<sup>12</sup>

Además de la problemática acerca de la pureza de los reactivos o de la influencia de variables no consideradas, también es necesario considerar la utilización de teorías inadecuadas o extrapoladas a límites inadmisibles. Las mayores simplificaciones suelen ser (i) que los solutos se comportan de un modo ideal (coeficientes de actividad igual a la unidad) y (ii) la no consideración de la



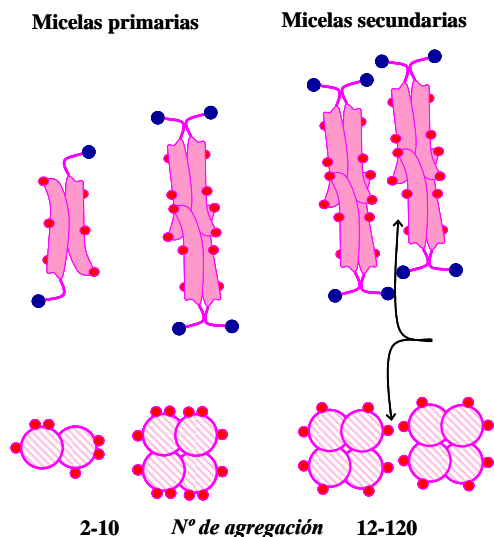
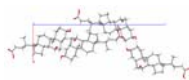
fracción de contraiones ligada a la micela. Kratochvil<sup>10</sup> ha publicado una evaluación crítica sobre la utilización de determinadas técnicas y teorías en el estudio de los ácidos biliares. Al trabajo anterior, habría que añadir el estudio de Nagarajan<sup>18</sup> quien correlaciona la polidispersidad y el crecimiento de los agregados. Así, si las micelas son monodispersas, su tamaño no puede aumentar significativamente con la concentración de tensioactivo o la adición de sales inertes. Del mismo modo, si las micelas son polidispersas, el número de agregación promedio en peso tiene que aumentar al hacerlo la concentración total del tensioactivo. Todo ello es válido también para la fracción de contraiones. En los estudios publicados, no ya sobre ácidos biliares sino sobre otros tensioactivos, estas cuestiones no siempre han sido tenidas en cuenta, tal y como Nagarajan ha puntualizado.



**Figura II.12.-** Valores mínimo y máximo publicados para la fracción de contraiones asociada a los agregados de las sales biliares indicadas.<sup>12</sup>

A estas alturas no debe ya sorprendernos que se hayan propuesto diversas estructuras para los agregados de los ácidos biliares, algunas claramente contrapuestas entre sí. Analicemos las dos que consideramos más importantes.

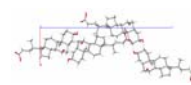
El primer modelo considera que la formación de micelas por parte de las sales biliares se debe a una interacción entre las caras hidrófobas ( $\beta$ ) de los esteroides. Este tipo de micelas, denominadas *primarias* (figura II.13), tendría un número de agregación bajo (comprendido entre 2 y 10).<sup>19</sup> Los agregados con números de agregación mayores que los indicados formarían las denominadas micelas secundarias formadas a partir de las anteriores mediante la unión de enlaces de hidrógeno (figura II.13).



**Figura II.13.-** Estructura de los agregados de sales biliares propuesta por Small.<sup>19</sup>

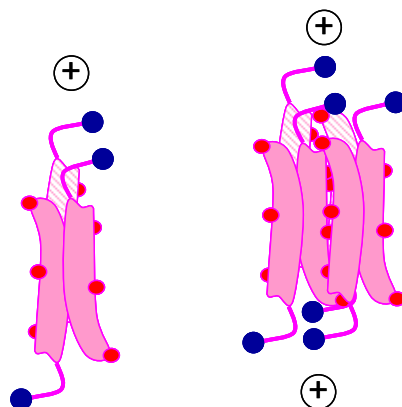
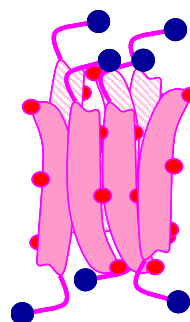
Esta interacción entre las caras  $\beta$ , también denominada *espalda-contra-espalda*, ha sido apoyada por medidas de ESR utilizando sondas que portan el grupo radical nitrosilo.<sup>20</sup> Estos autores indican que las micelas tendrían una forma de disco con la cara hidrófoba de las sales biliares orientada hacia el interior de la micela y la cara hidrófila ( $\alpha$ ) dirigida hacia el disolvente (*figura II.14*). Tal modelo estaría de acuerdo con los estudios de fluorescencia de sondas solubilizadas en el interior de los agregados. Una discusión más detallada puede ser consultada en la revisión debida a Jover *et al.*<sup>12</sup>

El anterior modelo sería posteriormente completado por Coello *et al.*<sup>16</sup> Si los componentes de los agregados se orientan alternativamente hacia arriba y hacia abajo, para un número de agregación igual a 3, dos grupos carboxílicos deben estar orientados en la misma dirección (*figura II.15*). La ubicación de un contraion (normalmente  $\text{Na}^+$ ) entre ambos grupos carboxilato permitiría apantallar las repulsiones electrostáticas desfavorables. Ello implica que la fracción de contraiones de los agregados debería ser  $1/3$  lo que fue corroborado experimentalmente por los citados autores. En la *figura II.15* puede verse la disposición de los contraiones para un trímero (número de agregación determinado para sales trihidroxílicas) y un hexámero (número de agregación determinado para



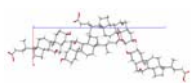
sales dihidroxílicas). Dado el bajo número de agregación, la disposición de los iones agregados, difícilmente recuerda las micelas clásicas originadas por tensioactivos alquílicos de cadena larga.

**Figura II.14.-** Estructura en forma de disco propuesta por Kawamura *et al.*<sup>20</sup> para los agregados de sales biliaris.



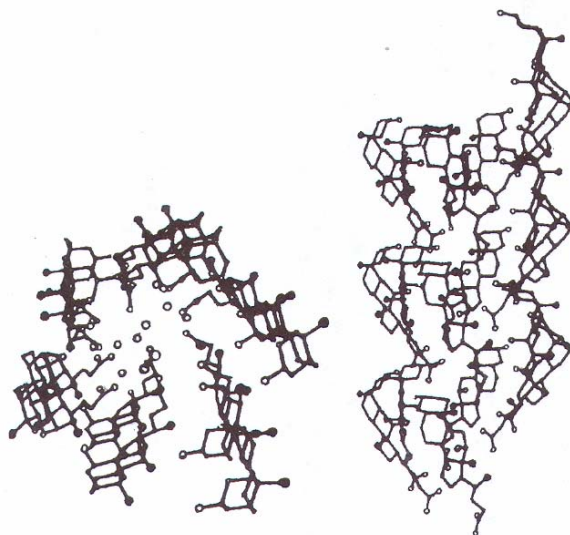
**Figura II.15.-** Ubicación de los contraiones en los trímeros (izquierda) y hexámeros (derecha) de sales biliaris según Coello *et al.*<sup>16</sup>

A pesar del bajo número de agregación, las medidas de fluorescencia parecen sugerir que el agregado protege ampliamente a la sonda fluorófora de su entorno. Así, Vethamuthu *et al.*<sup>21</sup> han estimado que la fracción de pireno en contacto con el agua es tan sólo de un 4% cuando está solubilizado en colato sódico, porcentaje que se reduce al 0% en las micelas de desoxicolato. En las

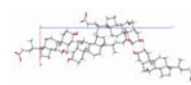


micelas clásicas es más fácil que entre en contacto con el agua, al ubicarse hacia el exterior de las mismas,<sup>22</sup> donde residen entre 5 y 10 moléculas de agua por monómero agregado.<sup>23</sup>

El segundo de los modelos, claramente contrapuesto a los anteriores, es debido a Giglio *et al.*<sup>24</sup> Este modelo acepta que la estructura de los agregados es helicoidal estando los contraiones de la micela en el interior de la hélice, donde también se ubican las moléculas de agua. La molécula sería neutra por cuanto las cargas positivas de los contraiones neutralizarían exactamente las negativas de los monómeros de sal biliar. Los grupos polares se ubicarían en la cara lateral de la hélice, recordando la estructura de una micela inversa (*figura II.16*). El modelo fue inferido por Giglio *et al* a partir de la resolución de las estructuras cristalinas de las sales biliares objeto de estudio. Ello constituye razón suficiente para justificar el esfuerzo dedicado durante la ejecución de la presente tesis doctoral a los cristales de los epímeros del ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico así como de los nuevos derivados de ácidos biliares sintetizados y que se exponen en el *capítulo III*. Pero antes conviene que realicemos una presentación de los cristales resueltos por otros autores. Por la extensión de la revisión le dedicaremos un apartado específico a la misma.



**Figura II.16.-** Estructura propuesta por Giglio *et al*<sup>25</sup> para los agregados de desoxicolato sódico. Vistas a lo largo del eje de la hélice (izquierda) y transversal (perpendicular) al mismo.



Por otra parte, el conocimiento de la estructura cristalina de estos derivados puede ser también útil a la hora de proponer estructuras para los agregados que originan en disolución acuosa, una estrategia que ha sido seguida durante años por el Profesor Giglio *et al.*<sup>24</sup>

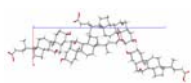
## II.5.- ANÁLISIS DE LOS CRISTALES DE LOS EPÍMEROS DEL ÁCIDO DESOXICÓLICO

Jover *et al.*<sup>26</sup> pudo predecir con éxito la estructura de los enlaces de hidrógeno del ácido 3-cetodesoxicólico en estado cristalino a partir del estudio de la red de enlaces de hidrógeno en los cristales de los diferentes epímeros del ácido desoxicólico (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ) y los otros tres epímeros, además del análisis en referencias bibliográficas donde se muestra que el desoxicólico forma complejos de inclusión con una gran variedad de huéspedes,<sup>27-33</sup> incluyendo el *p*-xileno,<sup>34-39</sup> mientras que el epímero 3 $\beta$ ,12 $\alpha$  no los forma (al menos con el citado disolvente).<sup>40</sup> Además, las redes de enlaces de hidrógeno que establecen son también muy diferentes.

Todos los epímeros del ácido desoxicólico fueron recrystalizados en *p*-xileno, disolvente que no forma enlaces de hidrógeno con el ácido biliar. Los sistemas de empaquetamiento resultaron diferentes en los cuatro epímeros del ácido desoxicólico, y sólo el cristal del ácido desoxicólico 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ , incluye al disolvente *p*-xileno con una estequiometría 2:1. También genera inclusión de disolvente el ácido 3-oxo,12 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -colán-24-oico con una estequiometría 1:1/2. Todos estos parámetros se pueden observar en la *tabla II.3* donde se aparecen las características de los cristales. Los datos del cristal del ácido desoxicólico en *p*-xileno se deben a Gallese *et al.*,<sup>38</sup> mientras que el resto de los epímeros se resolvieron dentro de nuestro grupo de investigación en diferentes publicaciones, el 3 $\beta$ ,12 $\alpha$ <sup>40</sup> y los restantes.<sup>41</sup>

La *figura II.17* ilustra con detalle los enlaces de hidrógeno que se forman entre los grupos hidroxilo y carboxílico de los cuatro compuestos.

Se demuestra en este trabajo que los tres grupos funcionales de los cuatro epímeros actúan simultáneamente como donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, y el resultado de todo ello es que cada uno de los cuatro epímeros participa en la formación de seis enlaces de hidrógeno intermoleculares con seis moléculas diferentes. El estudio de estos enlaces permite concluir que cualquier cambio de la configuración de un grupo hidroxilo del núcleo esteroide afecta a la red de enlaces de hidrógeno del cristal. Los grupos implicados en la formación de

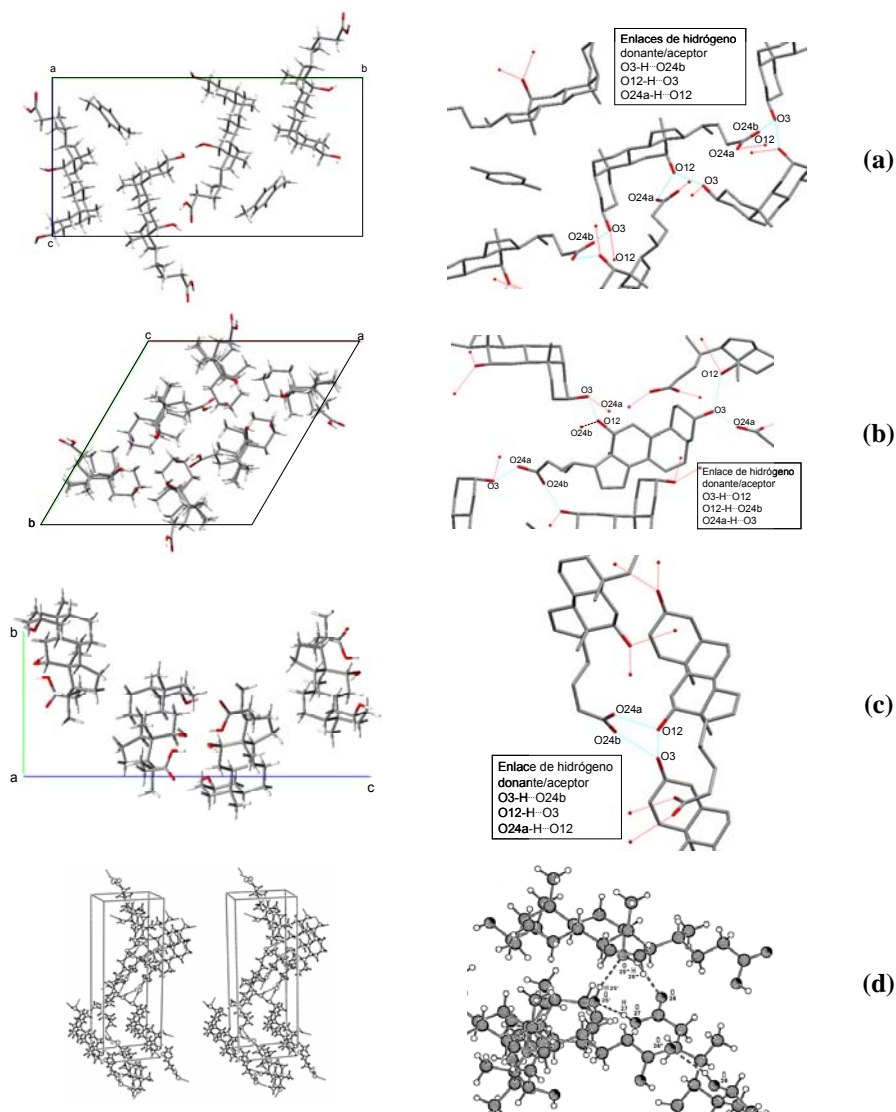
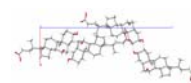


tales enlaces también dependen de la configuración. Estos patrones quedan resumidos en el esquema de la *figura II.17*. En la *figura II.18* la flecha indica qué oxígeno es el donante y cuál es el aceptor del enlace de hidrógeno. Asimismo, el recuadro indica qué átomos pertenecen a la misma función orgánica.

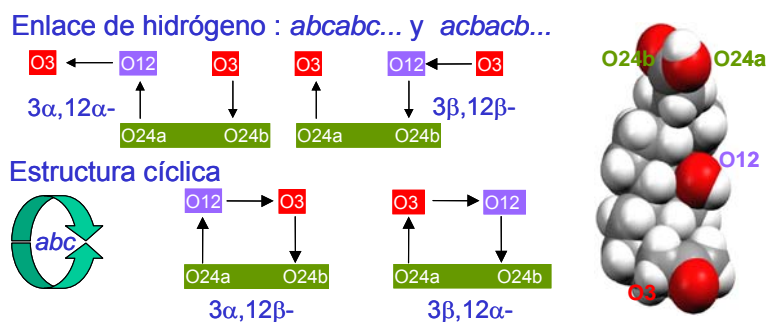
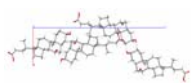
**Tabla II.3.** Datos de los cristales de tres epímeros derivados del ácido desoxicólico:  $3\alpha,12\alpha$ ,<sup>38</sup>  $3\beta,12\alpha$ ,<sup>40</sup>  $3\alpha,12\beta$ ;  $3\beta,12\beta$  y el ácido 3-oxo,12 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -colán-24-oico.<sup>41</sup>

Fórmula empírica	$C_{48}H_{80}O_8 \cdot C_8H_{10}$	$C_{24}H_{40}O_4$	$C_{24}H_{40}O_4$	$C_{24}H_{40}O_4$	$C_{24}H_{38}O_4 \cdot \frac{1}{2}C_8H_{10}$
Epímero	$3\alpha,12\alpha$	$3\alpha,12\beta$	$3\beta,12\beta$	$3\beta,12\alpha$	3ceto,12 $\alpha$
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico $P2_1$	Ortorrómico $P2_12_12_1$	Hexagonal $P6_5$	Ortorrómico $P2_12_12_1$	Monoclínico $P2_1$
a/Å	7,196 (13)	9,0670 (12)	18,2134 (14)	7,3232 (6)	6,904 (2)
b/Å	26,205 (5)	10,030 (3)	18,2134 (14)	10,5938 (16)	13,286 (4)
c/Å	13,313 (2)	24,086 (5)	12,5060 (19)	28,2957 (18)	26,669 (7)
$\alpha$ (°)	90	90	90	90	90
$\beta$ (°)	90,007 (4)	90	90	90	92,51 (2)
$\gamma$ (°)	90	90	120	90	90
Volumen/Å <sup>3</sup>	2510,7 (8)	2190,5 (8)	3592,8 (7)	2195,2 (4)	2443,9 (12)

Las secuencias aquí establecidas nos informan de que cada receptor de un enlace de hidrógeno actúa de un modo específico, es decir, interactúa con un donante exclusivo. Ello es equivalente a afirmar que no existen ramificaciones en las secuencias formadas.

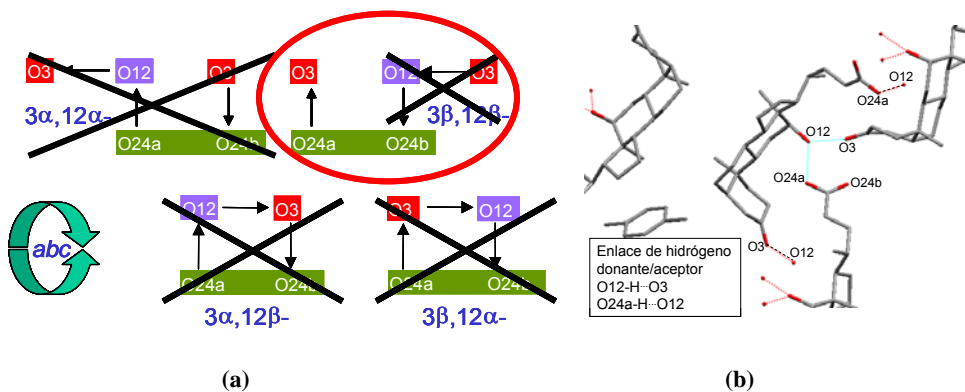


**Figura II.17.-** (a) Empaquetamiento del cristal (monoclínico  $P2_1$ ) del ácido desoxicólico (epímero  $3\alpha,12\alpha$ ) con el que forma un complejo de inclusión de estequiometría 2:1. (b) Empaquetamiento del cristal (hexagonal  $P6_5$ ) del epímero  $3\beta,12\beta$  del ácido desoxicólico. (c) Empaquetamiento del cristal (ortorrómbico  $P2_12_12_1$ ) del epímero  $3\alpha,12\beta$  del ácido desoxicólico. (d) Empaquetamiento del cristal (ortorrómbico  $P2_12_12_1$ ) del epímero  $3\beta,12\alpha$  del ácido desoxicólico. Todos los cristales fueron obtenidos en *p*-xileno.

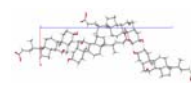


**Figura II.18.-** Esquema de los enlaces de hidrógeno observados en los cristales de los cuatro epímeros (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ; 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ ; 3 $\beta$ ,12 $\alpha$  y 3 $\beta$ ,12 $\beta$ ) del ácido desoxicólico.<sup>41</sup>

A partir de este esquema se logró predecir con éxito la red de enlaces de hidrógeno de la molécula del ácido 3-oxo,12 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -colán-24-oico (3-cetodesoxicólico). En la *figura II.19.a* mostramos la deducción de la red de enlaces de hidrógeno a la que obedece y en la *figura II.19.b* los enlaces de hidrógeno que se obtuvieron al resolver el cristal en *p*-xileno encontrándose una completa coincidencia entre lo predicho y lo observado.

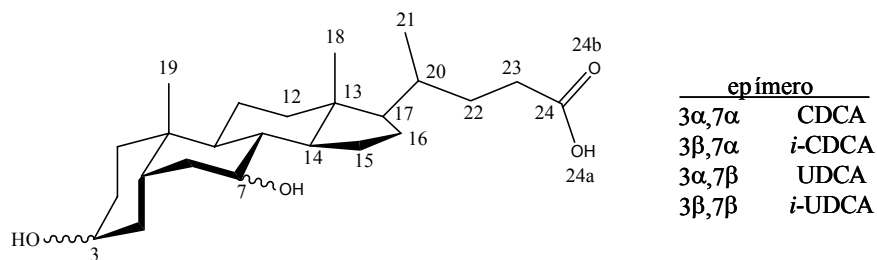


**Figura II.19.-** (a) Esquema de los enlaces de hidrógeno observados en los cristales de los cuatro epímeros (3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ; 3 $\alpha$ ,12 $\beta$ ; 3 $\beta$ ,12 $\alpha$  y 3 $\beta$ ,12 $\beta$ ) del ácido desoxicólico aplicado al 3-cetodesoxicolato. (b) Enlaces de hidrógeno del cristal del 3-oxo,12 $\alpha$  derivado del ácido desoxicólico.



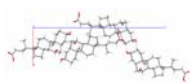
## II.6.- RESOLUCIÓN DE LOS CRISTALES DE LOS EPÍMEROS DEL ÁCIDO QUENODESOXICÓLICO Y URSODESOXICÓLICO

El éxito del análisis anterior hizo que se plantease un estudio análogo para la serie de epímeros de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico con grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 7 (*figura II.20*) con el fin de conseguir una base completa de referencia para la predicción de las propiedades de nuevos cristales. Aunque algunas estructuras cristalinas de estos derivados han sido ya publicadas, en este trabajo se hace uso de la sistemática de la recrystalización de todos ellos en el mismo disolvente. Y así, del mismo modo que en la serie del ácido desoxicólico, los cristales fueron obtenidos de *p*-xileno a excepción del correspondiente al ácido quenodesoxicólico que se obtuvo de una mezcla *p*-xileno con cantidades mínimas de *n*-pentanol, lo que no afectó al cristal obtenido.



**Figura II.20.-** Estructura de los epímeros estudiados y nomenclatura utilizada en el desarrollo del capítulo.

A diferencia del ácido desoxicólico del que existe mucho material bibliográfico sobre los cristales que forma, del ursodesoxicólico y quenodesoxicólico apenas existen referencias. Sí ha sido posible obtener información sobre un cristal de ácido ursodesoxicólico sin huéspedes,<sup>42</sup> (no así para el ácido desoxicólico) difiriendo su empaquetamiento molecular del de los cristales con huéspedes incluidos. Con fenantreno cristaliza en el sistema ortorrómbico P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> y la estequiometría es 1:1.<sup>43</sup> La red de enlaces de hidrógeno origina un canal a lo largo de *b* (*figura II.21*), donde se aloja el fenantreno. La estructura de los canales es diferente a la del ácido cólico y desoxicólico.



Anteriormente, se había comprobado<sup>44</sup> que este ácido biliar incluye a los huéspedes fenantreno y antrona cuando los complejos se preparan usando la técnica de *co-grinding* por medio de un molino vibracional, aunque no lo hace cuando se utiliza el método convencional de coprecipitación. Esto muestra una mayor selectividad del ácido ursodesoxicólico hacia los huéspedes en comparación con el ácido desoxicólico.

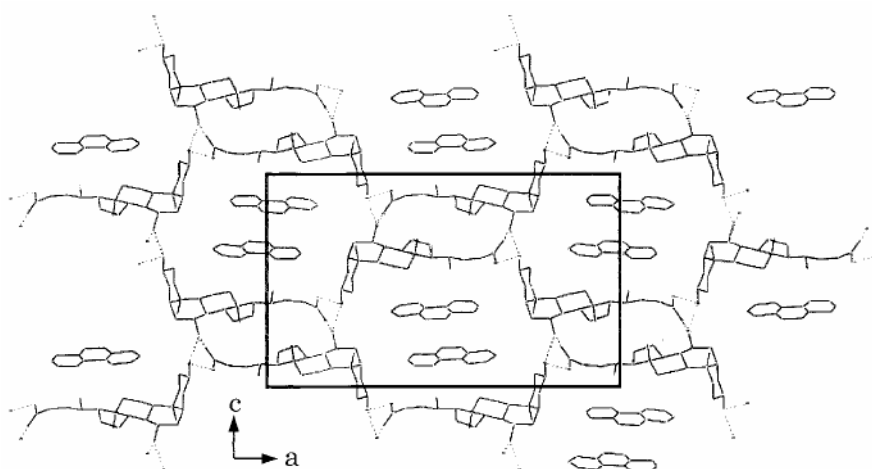
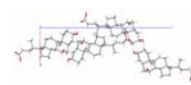
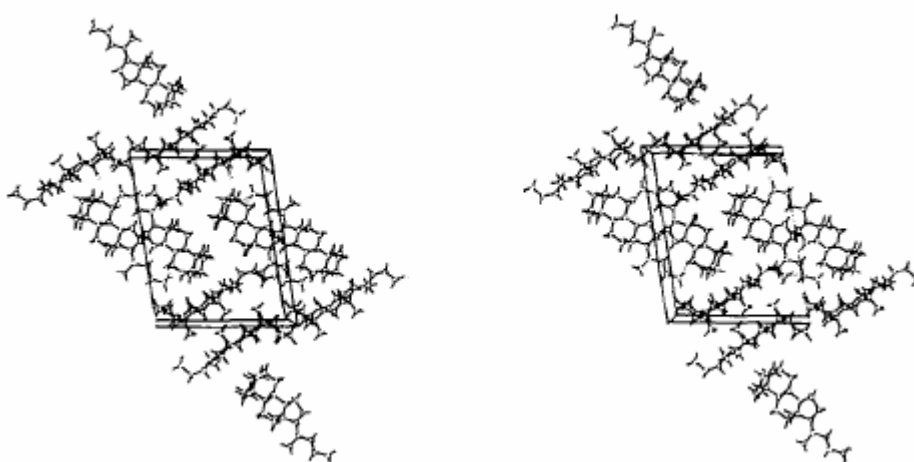


Figura II.21.- Estructura del cristal del ácido ursodesoxicólico con fenantreno.<sup>43</sup>

En 1978 se informó del fenómeno de polimorfismo presentado por el ácido quenodesoxicólico, habiéndose establecido, mediante análisis térmico diferencial, tres formas cristalinas y una amorfa.<sup>45</sup> Dos años más tarde, Lindley *et al*<sup>46</sup> publicaron la estructura del cristal (monoclínico  $P2_1$ ) de la forma polimórfica de mayor punto de fusión (438-439K), obtenido a partir de su cristalización en acetonitrilo (no incluyendo huéspedes). En la celda aparecen dos tipos de moléculas de ácido que se diferencian ligeramente en la conformación del anillo D. Debemos destacar que las dos moléculas se comportan anómalamente porque, aún presentando una orientación inadecuada del grupo carboxilo, en comparación con otros cristales de ácidos biliares, éste está implicado en la formación de enlaces de hidrógeno, los cuales se establecen entre moléculas de cada uno de los dos tipos entre sí y también de forma cruzada. Así, entre las moléculas de tipo I se establece el enlace bifurcado  $O3 \cdots O24b$  y  $O3 \cdots O24a$ , y entre las de tipo II se establece un enlace sencillo  $O3 \cdots O24b$  que genera una hélice *cabeza-cola* paralela a *b*, dejando

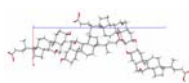


las moléculas de tipo I y II prácticamente perpendiculares entre sí. Ambos tipos de moléculas se unen de la siguiente forma: en las proximidades del O7 de I quedan dos moléculas de tipo II. Una le ofrece su cabeza y la otra su cola, formándose así el enlace de hidrógeno bifurcado  $O7 \cdots O3$  y  $O7 \cdots O24a$ , enlaces que aparecen invertidos en la parte opuesta de la hélice. Asimismo, aparece el enlace de hidrógeno  $O24a \cdots O7$  entre una molécula I y una molécula II de la hélice. La estructura del cristal se visualiza en la *figura II.22*.

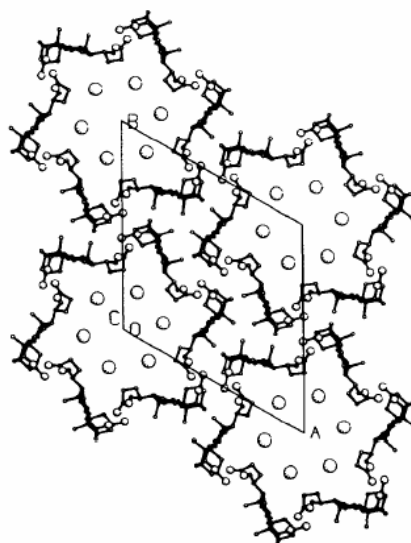


**Figura II.22.-** Vista estereoscópica de la estructura del cristal polimórfico del ácido quenodesoxicólico (438-439K).<sup>46</sup>

Chikada *et al*<sup>47</sup> llevaron a cabo un estudio de intercalación (intercambio de huéspedes) y polimerización en canales del ácido quenodesoxicólico. En primer lugar, obtuvieron cristales a partir del gel que se forma por disolución del ácido biliar en acetato de *n*-octilo, y luego procedieron al intercambio de huéspedes disolviendo los cristales en el líquido correspondiente. El cristal con acetato de *n*-octilo posee una estequiometría 1:1 y es hexagonal  $P6_5$ , presentando una estructura con columnas helicoidales, isomorfa con la de los cristales con acetato de etilo<sup>48</sup> o cloroformo.<sup>49</sup> Los monómeros empleados para el intercambio fueron vinilos y dienos, aunque sólo aportan datos cristalográficos para el cristal con estireno (también hexagonal  $P6_5$  y estequiometría 1:1). Estos autores también indican que la polimerización (llevada a cabo por irradiación  $\gamma$  con una fuente de <sup>60</sup>Co) tiene lugar en los canales cristalinos y separan los polímeros en una gran cantidad de metanol.

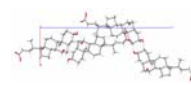


El cristal polimórfico del ácido quenodesoxicólico que funde a 388-390K fue estudiado por Rizkallah *et al.*<sup>49</sup> Cristalizado desde cloroformo, pertenece al sistema hexagonal  $P6_5$ . El ángulo de torsión  $\psi_3$  vale  $65^\circ$ , lo que indica una conformación sinclinal. Los enlaces de hidrógeno  $O3 \cdots O7$  hacen que las dos moléculas implicadas queden relacionadas por un eje binario. Cada una de estas moléculas se une al grupo carboxilo de otras dos a través del O7 de una y del O3 de la otra. En la estructura abierta resultante (*figura II.23*) las moléculas forman hélices como en la fase hexagonal del ácido desoxicólico: etanol: agua,<sup>30</sup> dejando canales suficientemente amplios como para acomodar huéspedes. Entre ambos existe, sin embargo, una gran diferencia: en el ácido desoxicólico las superficies interiores de las hélices son hidrófilas y participan en enlaces de hidrógeno con los huéspedes; sin embargo, en el ácido quenodesoxicólico dichas superficies son hidrófobas, lo que puede explicar tanto la aparente estructura desordenada de las moléculas polares como su número, variable en diferentes cristales.



**Figura II.23.-** Estructura del cristal polimórfico (388-390K) del ácido quenodesoxicólico vista a lo largo del eje  $c$ .<sup>49</sup>

Como en el caso de los epímeros 3,12 del ácido desoxicólico, los derivados 3,7 del ácido quenodesoxicólico poseen tres sitios potenciales que pueden generar

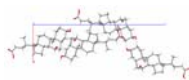


enlaces de hidrógeno (dos grupos hidroxilo y el grupo carboxilato de la posición 24) que pueden participar en la formación de una red de enlaces de hidrógeno. El hidroxilo en la posición C3 y el carboxilato son comunes para los dos grupos de derivados, por ello las diferencias que se pueden encontrar entre las redes de enlace de hidrógeno de estas dos familias serán generadas por el grupo hidroxilo en la posición C12 (derivados del ácido desoxicólico) o en la posición C7 (familia quenou/ursodesoxicólico). Es necesario recordar que la fuerza intermolecular más importante en la generación de estructuras supramoleculares a partir de moléculas individuales es, probablemente, el enlace de hidrógeno, no sólo por ser la interacción no covalente más fuerte, sino por sus características “direccionales”. El número y localización de los posibles lugares de enlace de hidrógeno son características cruciales para el teselado, la estabilidad y la selectividad de un ensamblaje supramolecular.<sup>50</sup> Todo ello podría ayudar en un futuro a la comprensión de diferentes estructuras supramoleculares (micelas,<sup>12,51</sup> geles,<sup>52</sup> fibras,<sup>53</sup> tubos moleculares<sup>54,55</sup> o estructuras laminares<sup>56</sup>) que podrían formar los derivados de ácidos biliares.

Como ya se ha visto en este mismo capítulo, es frecuente encontrar la formación de complejos de inclusión en cristales de ácidos biliares. Como el huésped a menudo modifica la estructura cristalina y, por tanto, influencia la red de enlaces de hidrógeno, se han recrystalizado los cuatro isómeros del mismo disolvente (*p*-xileno, que ya se usó en la familia de los epímeros del ácido desoxicólico) para prevenir así cualquier tipo de influencia originada por el uso de otros disolventes y facilitar estudios comparativos.<sup>40,41</sup>

Los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico utilizados son productos comerciales de la casa Aldrich. Los otros dos isómeros, el 3 $\beta$ ,7 $\alpha$  y el 3 $\beta$ ,7 $\beta$  fueron obtenidos de acuerdo con el método de Thomas<sup>57</sup> (véase el *apéndice A*). La pureza de los compuestos fue confirmada por cromatografía de capa fina y por RMN. El disolvente utilizado para la recrystalización fue Panreac *p.a.*

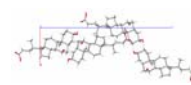
Se obtuvieron para todos los epímeros estudiados cristales prismáticos incoloros que se montaron en un capilar de vidrio. Los datos del cristal del quenodesoxicólico se recogieron en un ENRAF NONIUS TurboCAD4; para los cristales del ursodesoxicólico y del epímero 3 $\beta$ ,7 $\alpha$  en un Bruker Smart-CCD-1000, y para el cristal del isómero 3 $\beta$ ,7 $\beta$  se utilizó un Nonius FR591-KappaCCD2000. Todos los gráficos usados en este capítulo se obtuvieron con el programa Mercury (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/prods/mercury>). Los detalles experimentales se especifican en la *tabla II.4*.



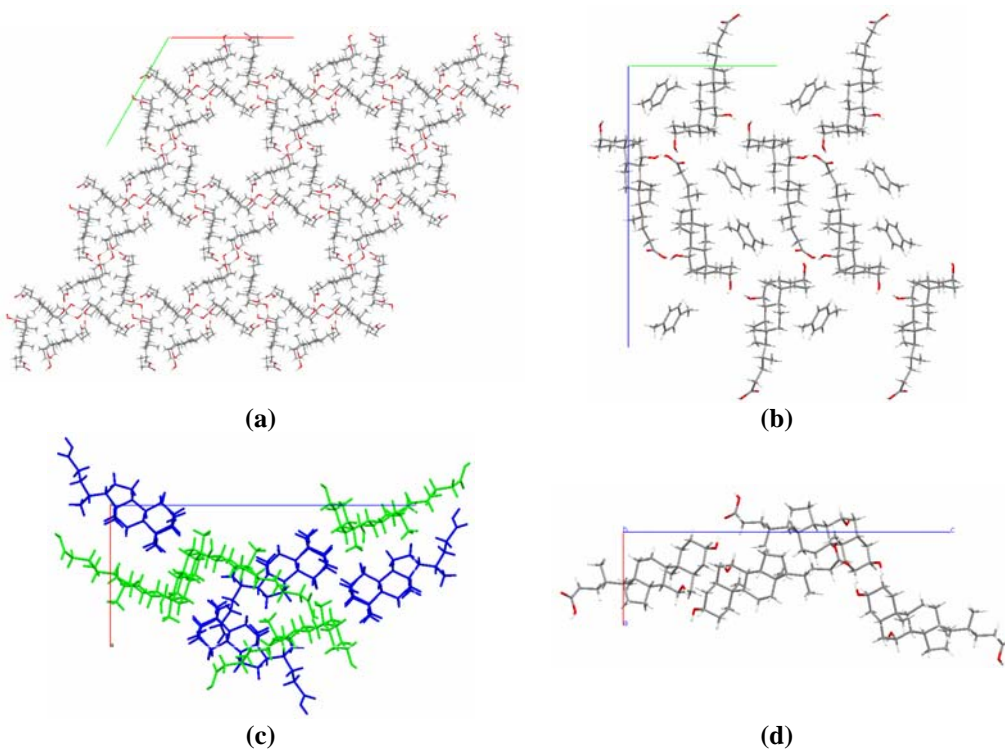
**Tabla II.4.** Datos de los cristales de los cuatro epímeros derivados del ácido urso y quenodesoxicólico.

Fórmula empírica	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> ·C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>
Epímero	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ (CDCA)	3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ( <i>i</i> -CDCA)	3 $\alpha$ ,7 $\beta$ (UDCA)	3 $\beta$ ,7 $\beta$ ( <i>i</i> -UDCA)
Peso molecular	392,578	392,578	392,578	498,745
Temperatura (K)	293 (2)	293 (2)	293 (2)	120 (2)
Longitud de onda (Å)	1,5418	0,71069	0,71073	1,5418
Sistema cristalino, grupo espacial	hexagonal P6 <sub>5</sub>	ortorrómbico P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	ortorrómbico P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	ortorrómbico P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	22,246 (3)	8,063 (5)	12,311 (4)	6,871 (2)
b (Å)	22,246 (3)	9,983 (5)	13,272 (4)	15,020 (5)
c (Å)	10,226 (7)	28,093 (5)	26,606 (9)	28,321 (9)
$\alpha$ (°)	90,00	90,00	90,00	90,00
$\beta$ (°)	90,00	90,00	90,00	90,00
$\gamma$ (°)	120,00	90,00	90,00	90,00
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4382,64 (0,89)	2261,3 (18)	4347,02 (2,48)	2922,83 (0,16)
Z/ densidad calculada (g/cm <sup>3</sup> )	6/ 0,8925	4/ 1,153	8/ 1,1997	4/ 1,1334
Coefficiente de absorción (mm <sup>-1</sup> )	0,465	0,076	0,079	0,565
F (000)	1296	864	1728	1096
Tamaño del cristal (mm <sup>3</sup> )	0,80x0,16x0,16	0,25x0,18x0,15	0,54x0,49x0,26	0,42x0,17x0,05
Intervalo Theta (recogida de datos) (°)	3,97-56,85	1,45-26,83	1,53-26,45	3,12-70,35
Intervalo de los índices	-24 ≤ h ≤ 20 0 ≤ k ≤ 24 -11 ≤ l ≤ 11	0 ≤ h ≤ 10 0 ≤ k ≤ 12 0 ≤ l ≤ 35	-15 ≤ h ≤ 15 0 ≤ k ≤ 16 0 ≤ l ≤ 33	-8 ≤ h ≤ 8 0 ≤ k ≤ 18 0 ≤ l ≤ 34
Datos/restricciones/parámetros	3912/5/268	2780/0/414	8918/2/536	5416/0/333
Bondad del ajuste en F <sup>2</sup>	1,024	1,185	1,02	1,106
Índices R finales [I>2 $\sigma$ (I)]	R1 = 0,1171, wR2 = 0,2743	R1 = 0,0405, wR2 = 0,0801	R1 = 0,0537, wR2 = 0,1297	R1 = 0,0803, wR2 = 0,2088
Índices R (datos completos)	R1 = 0,2503, wR2 = 0,3613	R1 = 0,0926, wR2 = 0,1023	R1 = 0,0934, wR2 = 0,1554	R1 = 0,0814, wR2 = 0,2105
Máxima diferencia (Å <sup>-3</sup> )		0,185 y -0,153	0,386 y -0,233	0,568 y -0,725

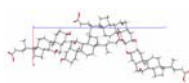
La *tabla II.4* muestra los datos de los cristales para los cuatro isómeros. El cristal del quenodesoxicólico es hexagonal P6<sub>5</sub>, y sus parámetros de celda son idénticos a los cristales recrystalizados de acetato de etilo<sup>48</sup> y cloroformo.<sup>49</sup> Ésta es la primera vez que el ácido quenodesoxicólico recrystaliza como la forma polimorfa de bajo punto de fusión sin huéspedes. Los cristales de los otros tres isómeros son ortorrómbicos (grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>). Solamente el isómero 3 $\beta$ ,7 $\beta$  forma



complejos de inclusión con el disolvente *p*-xileno con una estequiometría 1:1. Esto concuerda con las observaciones realizadas por Miyake *et al*<sup>58</sup> puesto que los cristales del isómero 3 $\beta$ ,7 $\beta$  forman complejos de inclusión con derivados del naftaleno con estequiometría 1:1. La celda unidad del ácido ursodesoxicólico tiene dos moléculas que se diferencian entre sí en las conformaciones de la posición de la cadena lateral 17 $\beta$  y el anillo D, en concordancia con los resultados de otros autores.<sup>42</sup> Este comportamiento también fue observado por Lindley *et al*<sup>46</sup> para cristales de la forma polimorfa de alto punto de fusión del ácido quenodesoxicólico. Los empaquetamientos cristalinos se muestran en la *figura II.24* a lo largo de diferentes ejes.



**Figura II.24.-** Empaquetamiento cristalino de: **(a)** ácido quenodesoxicólico, 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$  (a lo largo del eje *c*); **(b)** 3 $\beta$ ,7 $\beta$  (a lo largo del eje *a*); **(c)** ácido ursodesoxicólico, 3 $\alpha$ ,7 $\beta$  (a lo largo del eje *b*) y **(d)** 3 $\beta$ ,7 $\alpha$  (a lo largo del eje *b*).

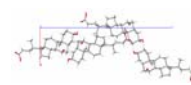


En primer lugar se analizará la conformación del anillo D en función del ángulo máximo de torsión,  $\varphi_m$ , y la fase del ángulo de pseudorotación,  $\Delta$ , definido por Altona *et al*<sup>59</sup> que describe la flexibilidad de los anillos de cinco miembros. Los valores para los cuatro cristales se resumen en la *tabla II.5*. El ángulo de torsión máximo de todos los anillos D es prácticamente constante (próximo a 47°) de acuerdo con los valores publicados por Altona *et al*.<sup>59</sup> Un valor de  $\Delta$  cercano a cero indica que la conformación del anillo es *media-silla*, mientras que valores absolutos cercanos a 36° indican una conformación en *sobre*. Por lo tanto, los valores de la *tabla II.5* sugieren que los isómeros 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$  y 3 $\beta$ ,7 $\beta$  tienen una conformación *media-silla*, mientras que los otros dos isómeros, (3 $\beta$ ,7 $\alpha$  y 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ) tienen una conformación intermedia entre *media-silla* y *sobre*. La conformación *media-silla* fue observada en los cristales del ácido desoxicólico que forman complejos de inclusión con pinacolona,<sup>60</sup> ferroceno,<sup>61</sup> tiocanfenilona,<sup>62</sup> y *o*-xileno.<sup>33</sup> La conformación intermedia *media-silla* y *sobre* ha sido encontrada en varios cristales de ácido cólico/ alcoholes alquílicos<sup>63,64</sup> y en el cristal de un complejo 1:1 ácido desoxicólico: ácido salicílico.<sup>65</sup>

**Tabla II.5.** Máximo ángulo de torsión,  $\varphi_m$ , y la fase del ángulo de pseudorotación,  $\Delta$ , del anillo D y ángulos de torsión de la cadena lateral para los cuatro isómeros. Los dos valores para el ácido ursodesoxicólico corresponden a las dos moléculas (I en azul y II en verde, *figura II.24*).

Ángulo de torsión (°)	Epímero			
	CDCA 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$	<i>i</i> -CDCA 3 $\beta$ ,7 $\alpha$	UDCA 3 $\alpha$ ,7 $\beta$	<i>i</i> -UDCA 3 $\beta$ ,7 $\beta$
$\varphi_m$	49,31	46,63	46,99/47,25	46,84
$\Delta$ (°)	4,58	18,63	21,77/16,55	4,73
$\psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	173,92	176,76	170,97/172,55	178,67
$\psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	-173,52	-178,05	68,27/-179,82	-162,41
$\psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	64,38	167,28	173,05/159,40	160,71
$\psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a}$	73,80	-54,28	60,29/110,87	-150,55
$\psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-53,32	-58,59	-59,66/-62,26	-58,02
Conformación de la cadena lateral	tggg	tttg	tggt/ttti*	tttt

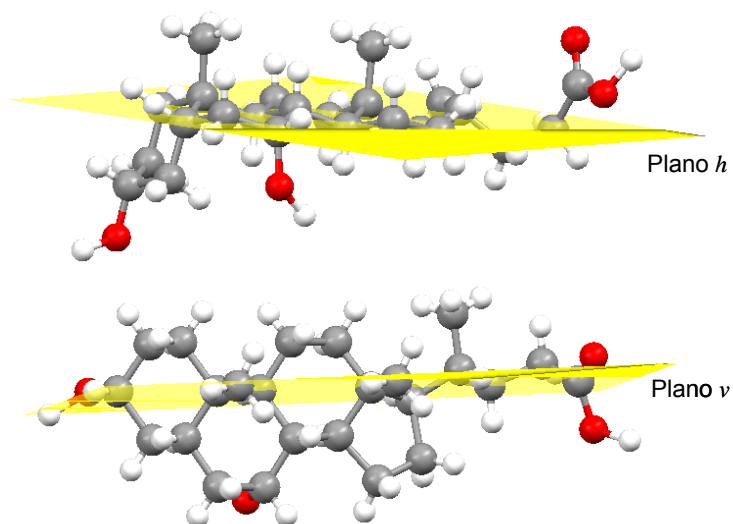
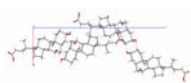
\* “i” significa un ángulo intermedio entre *gauche* y *trans*.



Los dos grupos hidroxilo (C3 y C7) están localizados en posiciones fijas y su participación en la red de enlaces de hidrógeno requiere una orientación apropiada del núcleo esteroide rígido. Éste no es el caso del grupo carboxílico ya que la cadena alquílica lateral es suficientemente flexible para adoptar los requerimientos geométricos y facilitar la formación de enlaces de hidrógeno sin forzar una completa reorientación de la molécula. La conformación de la cadena lateral en la posición 17 del esteroide ha sido frecuentemente analizada mediante los ángulos de torsión que forman desde el átomo de carbono C17 al átomo de carbono C24. La *tabla II.5* muestra los valores experimentales para los cuatro isómeros.

Los valores para  $\psi_5$  están en el estrecho intervalo de  $-53^\circ$  a  $-60^\circ$  que, de acuerdo con Giglio y Quagliata,<sup>66</sup> corresponden a un mínimo en el perfil de energía para los ácidos colánicos y compuestos relacionados. Este mínimo tiene valores entre  $60^\circ$  y  $-170^\circ$  para  $\psi_2$  y alrededor de  $50^\circ$ ,  $165^\circ$  y  $-95^\circ$  para  $\psi_3$ . Los valores en la *tabla II.5* están de acuerdo con los cálculos de estos autores. Los valores de  $\psi_1$ - $\psi_3$  corresponden fundamentalmente a conformaciones *trans* con las excepciones de  $\psi_3$  para el ácido quenodesoxicólico y  $\psi_2$  para una de las moléculas de la unidad asimétrica del cristal del ácido ursodesoxicólico. Los valores para  $\psi_4$  cubren un intervalo más amplio debido a que el grupo carboxilato adopta una conformación controlada por la formación de enlaces de hidrógeno, tomándose como ejemplo la conformación intermedia observada para una de las moléculas de la unidad asimétrica del ácido ursodesoxicólico. Esta flexibilidad permite a los ácidos colánicos formar diferentes redes de enlaces de hidrógeno. La conformación mayoritariamente observada para  $\psi_4$  en esta tesis doctoral es *gauche*. La *tabla II.5* también engloba el total de las posibles conformaciones de la cadena lateral. Se debe enfatizar que los valores en la *tabla II.5* para el ácido quenodesoxicólico concuerdan con los publicados por Van der Sluis *et al*<sup>48</sup> para el cristal del ácido quenodesoxicólico: acetato de etilo, pero difieren en los valores para el cristal sin huéspedes.<sup>46</sup> Los valores para el ácido ursodesoxicólico están también en concordancia con los valores previamente publicados por Lindley y Carey.<sup>67</sup>

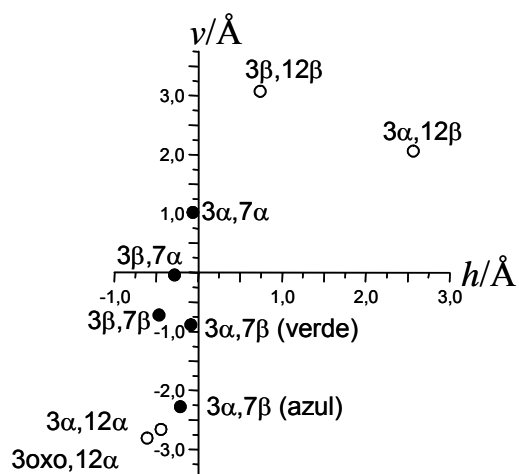
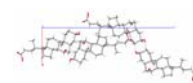
A continuación proponemos un modo alternativo para visualizar la conformación de la cadena alquílica lateral, consistente en medir la distancia del grupo carboxílico (particularmente su átomo de carbono C24) a dos planos que se definen como sigue. El primer plano (horizontal, *h*) se define por los átomos de carbono C1/C6-C17 (es decir, los anillos B, C y D)/C20. El segundo plano (vertical, *v*) se define por los dos grupos metilo C18 y C19 y los dos átomos de carbono a los que están unidos, C10 y C13, respectivamente (*figura II.25*).



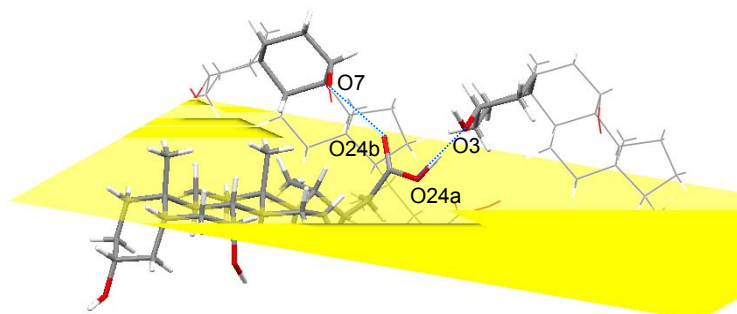
**Figura II.25.-** Planos utilizados para referenciar la posición del grupo carboxílico del ácido quenodesoxicólico. Arriba: plano horizontal, *h*, definido por 15 átomos de carbono C1/C6-C17/C20. Debajo: plano vertical, *v*, definido por los dos grupos metilo C18 y C19 y los átomos de carbono a los que se enlazan, C10 y C13.

Los dos planos son casi perpendiculares entre sí, el valor del ángulo promedio para los cuatro ácidos biliares estudiados aquí es  $88,4 \pm 0,6^\circ$  (valor máximo  $89,3^\circ$  para el ácido ursodesoxicólico (verde); valor mínimo  $87,9^\circ$  para el isómero  $3\beta,7\alpha$ ). Las distancias del átomo de carbono carboxílico C24 a los dos planos se representan en la *figura II.26*.

Para una mejor comprensión de la magnitud de las desviaciones de los planos, debemos recordar que la longitud de la cadena alquílica desde C17 hasta C24 tiene un valor medio de  $6,08 \pm 0,02 \text{ \AA}$ . Por tanto podemos concluir que las cuatro sales biliares evidencian pequeñas desviaciones con respecto al plano vertical, correspondiendo el valor máximo al isómero  $3\beta,7\beta$  ( $=-0,466 \text{ \AA}$ ), mientras que se observa un intervalo más amplio ( $=3,3 \text{ \AA}$ ) para las coordenadas verticales (distancias al plano horizontal). Solamente el ácido quenodesoxicólico da lugar a desviaciones hacia la parte hidrófoba de la molécula ( $\beta$ ), facilitando así la formación de dos enlaces de hidrógeno,  $O24b \leftarrow O7$  y  $O24a \rightarrow O3$ , con otras dos moléculas localizadas encima del grupo carboxílico (*figura II.27*).

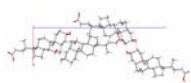


**Figura II.26.-** Coordenadas de los átomos carboxílicos C24 respecto a los dos planos definidos en la *figura II.25* para varios ácidos biliares.

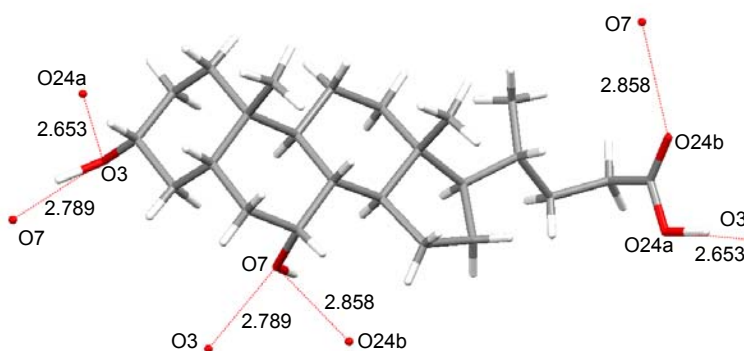


**Figura II.27.-** Orientación hacia arriba del grupo carboxilato del ácido quenodesoxicólico que facilita la formación de los enlaces de hidrógeno  $O24b \leftarrow O7$  y  $O24a \rightarrow O3$  con otras dos moléculas.

La red de enlaces de hidrógeno observada en los cristales del ácido quenodesoxicólico ( $3\alpha,7\alpha$ ) es bastante compleja. Cada posición capaz de formar un enlace de hidrógeno puede participar, a su vez, en la formación de dos enlaces de



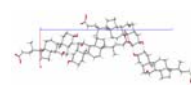
hidrógeno con otras dos moléculas y, consecuentemente, cada molécula de ácido quenodesoxicólico se interconecta con seis moléculas, pero solamente existen tres enlaces de hidrógeno diferentes ( $O7 \rightarrow O24b$ ,  $O24a \rightarrow O3$  y  $O3 \rightarrow O7$ ; figura II.28). Estos enlaces de hidrógeno son los mismos que los observados para las formas polimórficas de bajo punto de fusión que incluyen acetato de etilo<sup>48</sup> o cloroformo.<sup>49</sup>



**Figura II.28.-** Distancias en Å de los enlaces de hidrógeno observados en el cristal del ácido quenodesoxicólico en *p*-xileno.

Siguiendo la interconexión de los enlaces de hidrógeno nos encontramos con la existencia de dos ciclos diferentes requiriendo ambos cuatro moléculas de quenodesoxicólico. El primer ciclo sigue la secuencia \*O24b-O24a→O3→O7-O3→O7\* y el segundo obedece al esquema \*O7-O3→O24a-O7→O24b-O24a→O3-O24b\*. Aquí los átomos de oxígeno que pertenecen a la misma molécula aparecen subrayados y el asterisco significa que ambos átomos están unidos mediante un enlace de hidrógeno cerrando el polígono. En el primer ciclo hay dos enlaces de hidrógeno  $O3 \rightarrow O7$ , sin embargo, este enlace de hidrógeno no existe en el segundo ciclo.

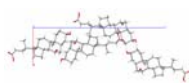
Estos ciclos son muy diferentes a los observados para los isómeros  $3\alpha,12\beta$  y  $3\beta,12\alpha$  del ácido desoxicólico.<sup>41</sup> La red de enlaces de hidrógeno de estos dos isómeros engloba tres moléculas que forman un triángulo en el cual cada vértice es donante de enlace de hidrógeno hacia el segundo vértice y aceptor de enlace de hidrógeno del tercer vértice. Para el isómero  $3\alpha,12\beta$  del ácido desoxicólico<sup>41</sup> la longitud total de los tres enlaces de hidrógeno es 8,234 Å, y para el  $3\beta,12\alpha$ <sup>40</sup> es



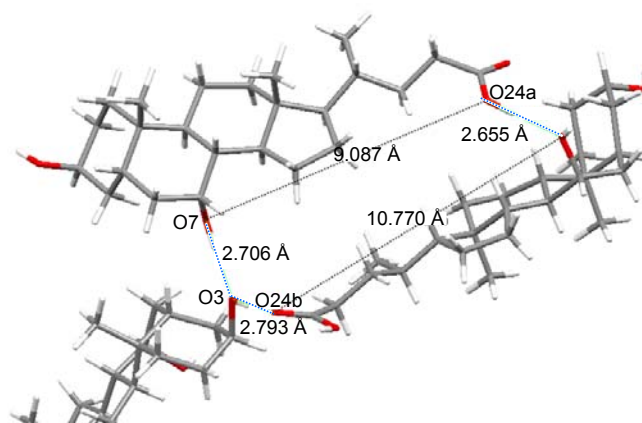
8,405 Å. Es decir, los triángulos de los derivados  $3\alpha,12\beta$  y  $3\beta,12\alpha$  tienen los lados formados exclusivamente por enlaces de hidrógeno mientras que los dos polígonos del ácido quenodesoxicólico están formados por moléculas enlazadas por enlaces de hidrógeno. Las longitudes totales de los polígonos son 16,130 Å (solamente 11,089 Å corresponden a enlaces de hidrógeno) y 38,837 Å (11,022 Å corresponden a enlaces de hidrógeno).

Para los otros tres isómeros se evidencian situaciones similares ya que en todos los casos cada átomo susceptible de enlace de hidrógeno participa en la formación de dos enlaces de hidrógeno con otras dos moléculas. Para el *i*-quenodesoxicólico ( $3\beta,7\alpha$ ) los enlaces de hidrógeno observados son  $O3 \rightarrow O24b$ ,  $O24a \rightarrow O7$  y  $O7 \rightarrow O3$ . Ahora se requieren sólo tres moléculas de ácido biliar para cerrar el ciclo  $*O7-O24a \rightarrow O7-O24b \leftarrow O3 \leftarrow O7*$  (figura II.29). Dos de las moléculas se encuentran en disposición casi opuesta una con respecto a la otra, permitiendo una doble interacción casi directa del grupo carboxílico/grupo hidroxilo O7H. Sin embargo, en una de las terminaciones, el grupo hidroxilo O3H de una tercera molécula se localiza entre los grupos anteriores formando dos enlaces de hidrógeno,  $O7 \rightarrow O3$  y  $O3 \rightarrow O24b$ . Sus planos esteroideos horizontales forman un ángulo de  $48,6^\circ$ , es decir, sus lados hidrófobos están rotados un ángulo de  $131,4^\circ$ .

El isómero  $3\beta,7\beta$  sigue el mismo esquema de enlaces de hidrógeno que el isómero  $3\beta,7\alpha$ , pero ahora los dos núcleos esteroideo de las dos moléculas opuestas están casi perpendiculares entre sí con un valor de  $79,6^\circ$  entre ellas (sus superficies hidrófobas están rotadas un ángulo de  $100,4^\circ$ ). Tal diferencia entre los dos valores de los ángulos de los isómeros se puede comprender en función de la diferente orientación del grupo hidroxilo O7H que para formar el enlace de hidrógeno  $O24a \rightarrow O7$  necesita un giro de las moléculas. Sin embargo, se debe resaltar que el epímero  $3\beta,7\beta$  forma complejos de inclusión con el disolvente, estando localizado el huésped fuera del ciclo de enlaces de hidrógeno mencionado (véase la figura II.30). La orientación de las moléculas de ácido biliar hacia el huésped facilita las interacciones hidrófobas anfitrión-huésped. La cavidad hidrófoba del anfitrión está formada por: (i) el grupo C19 de una primera molécula, (ii) los átomos de hidrógeno de la posición C1 y C2 del anillo A, y C11 y C12 del anillo C de una segunda molécula; y (iii) los átomos de hidrógeno en C17 y C16 del anillo D y el grupo metilo C21, y el primer grupo metileno C22 de la cadena lateral de una tercera molécula (figura II.31). Esta estructura es muy similar a la encontrada por Miyake *et al*<sup>58</sup> para los cristales de inclusión del isómero  $3\beta,7\beta$  con la 2-acetonafona y por Fukami *et al*<sup>43</sup> para los cristales del ácido

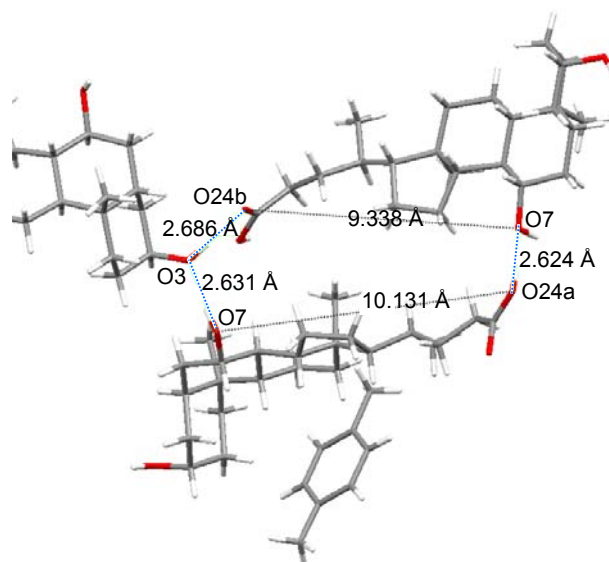
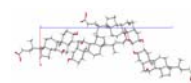


ursodesoxicólico/fenantreno. Esta estructura fue bautizada<sup>58</sup> como de tipo “cierre de gallinero”. Los canales donde se acomoda la molécula de huésped tienen una sección transversal aproximadamente rectangular de unas dimensiones aproximadas de  $7 \times 16 \text{ \AA}^2$ . Las moléculas huésped se acomodan paralelas a los canales con una distancia entre sí de  $2,97 \text{ \AA}$  y las de esteroide con una distancia de  $4,4 \text{ \AA}$ .

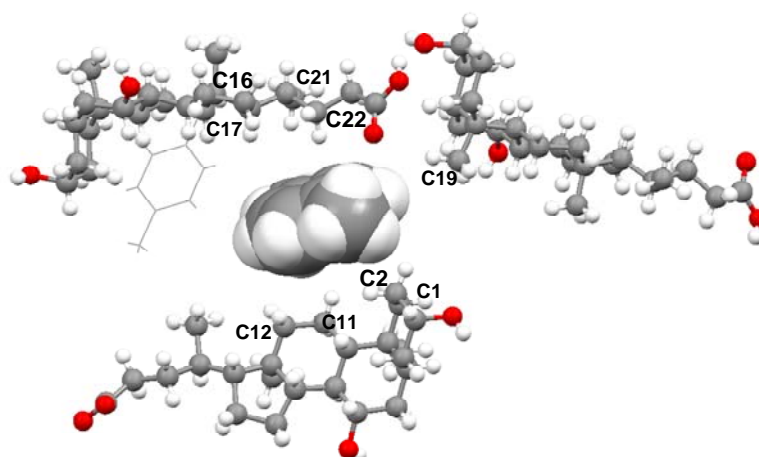


**Figura II.29.-** Red de enlaces de hidrógeno que engloba tres moléculas de ácido biliar de  $3\beta,7\alpha$ -*i*-quenodesoxicólico. Distancias en  $\text{Å}$ .

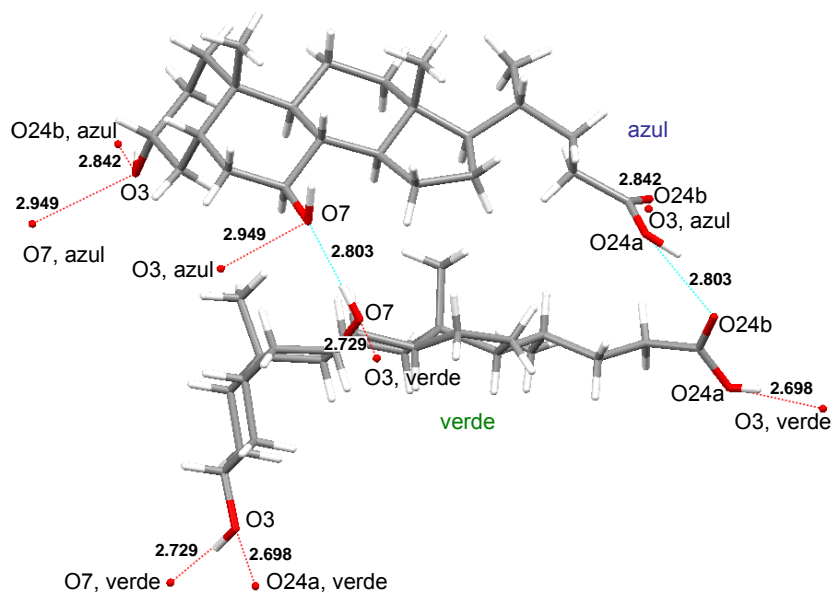
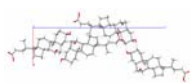
La red de enlace de hidrógeno en los cristales del ácido ursodesoxicólico (derivado  $3\alpha,7\beta$ ) es compleja debido a que existen interacciones entre moléculas de tipo I, entre moléculas de tipo II, y entre moléculas de tipo I y II como ya observaron Lindley y Carey.<sup>67</sup> Teniendo en cuenta que nuestros datos concuerdan con sus resultados no comentaremos con más profundidad este tema para esta molécula. La *figura II.32* resume los resultados obtenidos. Solamente resaltaremos que estas dos moléculas están directamente enlazadas por dos enlaces de hidrógeno, implicando los átomos de oxígeno O7 y los grupos carboxílicos de ambas moléculas, lo cual requiere que los planos de los núcleos esteroide formen un ángulo de  $54,7^\circ$  (*figura II.33*). Éste es el único ácido biliar que exhibe este tipo de interacción de enlace de hidrógeno.



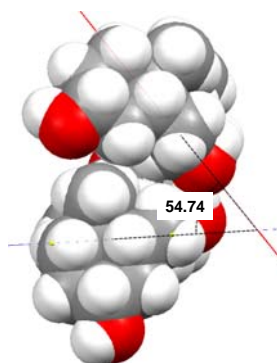
**Figura II.30.-** Distancias de los ciclos de enlace de hidrógeno del ácido *i*-ursodesoxicólico (epímero 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ).



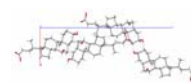
**Figura II.31.-** Interacciones hidrófobas anfitrión-huésped del ácido *i*-ursodesoxicólico (epímero 3 $\beta$ ,7 $\beta$ ).



**Figura II.32.-** Red de enlaces de hidrógeno formada por las dos moléculas de la unidad asimétrica de la celda del cristal del ácido ursodesoxicólico. Distancias en Å.



**Figura II.33.-** Ángulo formado por los dos planos esteroide de las dos moléculas de la unidad asimétrica del cristal del ácido ursodesoxicólico.

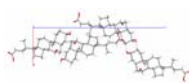


La *tabla II.6* resume los parámetros geométricos de los enlaces de hidrógeno de los cuatro epímeros.

**Tabla II.6.** Enlaces de hidrógeno, longitudes y ángulos para los cuatro isómeros.

Epímero					
CDCA			<i>i</i> -CDCA		
D-H <sup>⋯</sup> A	d (D <sup>⋯</sup> A)/Å	<DHA (°)	D-H <sup>⋯</sup> A	d (D <sup>⋯</sup> A)/Å	<DHA (°)
O(24a)-H <sup>⋯</sup> O(3)	2,652 (14)	169 (15)	O(24a)-H <sup>⋯</sup> O(7)	2,654	
O(3)-H <sup>⋯</sup> O(7)	2,789 (11)	162 (4)	O(7)-H <sup>⋯</sup> O(3)	2,705	
O(7)-H <sup>⋯</sup> O(24b)	2,857 (13)	119 (6)	O(3)-H <sup>⋯</sup> O(24b)	2,793	
UDCA			<i>i</i> -UDCA		
D-H <sup>⋯</sup> A	d (D <sup>⋯</sup> A)/Å	<DHA (°)	D-H <sup>⋯</sup> A	d (D <sup>⋯</sup> A)/Å	<DHA (°)
O(24a)-H <sup>I</sup> ⋯O(24b) <sup>II</sup>	2,803		O(24a)-H <sup>⋯</sup> O(7)	2,621 (3)	171 (5)
O(7)-H <sup>I</sup> ⋯O(3) <sup>I</sup>	2,949		O(7)-H <sup>⋯</sup> O(3)	2,632 (3)	161 (5)
O(7)-H <sup>I</sup> ⋯O(7) <sup>II</sup>	2,803		O(3)-H <sup>⋯</sup> O(24b)	2,682 (3)	167 (5)
O(3)-H <sup>II</sup> ⋯O(7) <sup>II</sup>	2,729				
O(3)-H <sup>II</sup> ⋯O(24a) <sup>II</sup>	2,698				
O(7)-H <sup>II</sup> ⋯O(7) <sup>I</sup>	2,803				
O(7)-H <sup>II</sup> ⋯O(3) <sup>II</sup>	2,729				
O(3)-H <sup>I</sup> ⋯O(7) <sup>I</sup>	2,949				
O(3)-H <sup>I</sup> ⋯O(24b) <sup>I</sup>	2,842				

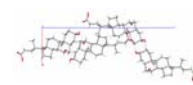
Cuando se comparan los resultados para los cuatro isómeros aquí estudiados con la familia del ácido desoxicólico se pueden obtener varias conclusiones: (i) Cada uno de los cuatro isómeros del ácido desoxicólico muestra su propio patrón de enlaces de hidrógeno y diferente de los otros tres derivados. Sin embargo en el presente caso, los dos isómeros que tienen una orientación  $\beta$  para el grupo hidroxilo O3H, muestran patrones de enlace de hidrógeno idénticos, \*O7-O24a→O7-O24b←O3←O7\* como ya se mencionó anteriormente. (ii) Teniendo en cuenta que el O24a es siempre donante y el O24b es siempre aceptor, las secuencias de enlace de hidrógeno se pueden comprender en función de la interacción entre los dos grupos hidroxilo. El conjunto de orientaciones del ácido desoxicólico ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del grupo hidroxilo en la posición C3, O3H, determina la



secuencia aceptor-donante, puesto que es O12→O3 cuando O3H es  $\alpha$ , pero es O3→O12 cuando O3H es  $\beta$ . La comparación para los cuatro isómeros dihidroxilados 3,7 es compleja debido a la existencia de dos moléculas en la unidad asimétrica del cristal del ácido ursodesoxicólico que obliga a que el mismo sitio de enlace de hidrógeno (por ejemplo O3) sea donante hacia diferentes aceptores (O7 o O24b) (*figura II.32*). Para los restantes ácidos biliares la “regla del ácido desoxicólico”<sup>41</sup> es obedecida ya que la secuencia es O7→O3 cuando O3H es  $\beta$  y O3→O7 cuando es  $\alpha$ . (iii) Para los derivados del ácido desoxicólico, cuando los dos grupos hidroxilo tienen orientaciones opuestas (es decir,  $3\alpha,12\beta$  y  $3\beta,12\alpha$ ) las redes de enlace de hidrógeno engloban tres moléculas que conforman un triángulo de enlaces de hidrógeno en el cual cada vértice es donante de enlace de hidrógeno hacia un segundo vértice y aceptor de enlace de hidrógeno desde el tercer vértice.<sup>40</sup> Este patrón no ha sido observado para ningún isómero de la familia estudiada, por ello la comparación se complica nuevamente por el caso excepcional del ácido ursodesoxicólico. (iv) Se han introducido dos planos  $h$  y  $v$ , para visualizar la orientación de la cadena alquílica con respecto al núcleo esteroide. Para la familia del ácido quenodesoxicólico las distancias del grupo carboxílico al plano vertical (*figura II.26*) son cortas (el valor máximo corresponde al isómero  $3\beta,12\beta$ ). Además, sólo el ácido quenodesoxicólico muestra una desviación positiva hacia la parte hidrófoba de la molécula (cara  $\beta$ ). Sin embargo, los isómeros del ácido desoxicólico muestran desviaciones considerablemente mayores (*figura II.26*). Los cristales de los isómeros del ácido desoxicólico se utilizaron para predecir la estructura del cristal del derivado 3-oxo-desoxicólico. De acuerdo con esta predicción, este compuesto debería cristalizar como el ácido desoxicólico, como así lo hace. Es notable que los dos compuestos tienen casi las mismas coordenadas en el sistema de referencia de los dos planos.

## BIBLIOGRAFÍA

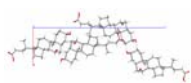
1. Wieland, H. *Angew. Chem.* **1929**, 42, 421-4.
2. Roda, A.; Roda, E.; Hofmann, A. F. Ed. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**.
3. Nair, P. P.; Kritchevsky, D. *The Bile Acids. Chemistry, Physiology, and Metabolism. Volume I: Chemistry.*; Plenum Press: New York, **1971**.
4. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, 87, 1666-83.



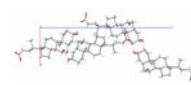
## Capítulo II

---

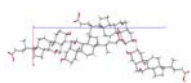
5. Haslewood, G. A. D. *J. Lipid Res.* **1967**, *8*, 535-50.
6. Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids Surfaces* **1988**, *30*, 145-73.
7. Zarras, P.; Vogl, O. *Progress Polymer Sci.* **1999**, *24*, 485-516.
8. Carey, M. C.; Small, D. M. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506-27.
9. Hildebrand, A.; Garidel, P.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 320-8.
10. Kratochvil, J. P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, *26*, 131.
11. Ekwall, P. *Acta Acad. Aboensis Math. Phys.* **1951**, *17*, 1-10.
12. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, *3*, 323-35.
13. Carey, M. C. *Bile Acids in Gastroenterology*. L. Barbara, R. H. Dowling, A. F. Hofmann, E. Roda. Lancaster. MTP Press Limited **1983**, 19-56.
14. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10186-91.
15. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, *18*, 987-991.
16. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 9-15.
17. Sugihara, G.; Yamakawa, K.; Murata, Y.; Tanaka, M. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 2784-8.
18. Nagarajan, R. *Langmuir* **1994**, *10*, 2028-34.
19. Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, *84*, 31-52.
20. Kawamura, H.; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3321-6.
21. Vethamuthu, M. S.; Almgren, M.; Mukhtar, E.; Bahadur, P. *Langmuir* **1992**, *8*, 2396.
22. Lianos, P.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *84*, 100-7.
23. Bales, B. L.; Shahin, A.; Lindblad, C.; Almgren, M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 256-63.
24. Campanelli, A. R.; Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Quagliata, C. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **1989**, *7*, 391-400.



25. Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 356-62.
26. Jover, A.; Meijide, F.; Mosquera, V.; Vázquez Tato, J. *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*, 530.
27. Bonamico, M.; Giacomello, G. *Gazzetta Chim. Ital.* **1962**, 647-50.
28. Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1972**, *B28*, 3656-61.
29. Schaefer, J. P.; Reed, L. L. *Acta Crystal.* **1972**, *28*, 1743-8.
30. Candeloro de Sanctis, S.; Coiro, V. M.; Giglio, E.; Pagliuca, S.; Pavel, N. V.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1978**, *B34*, 1928-33.
31. Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Petri, F.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1979**, *B35*, 226-8.
32. Coiro, V. M.; D'Andrea, A.; Giglio, E. *Acta Crystal.* **1979**, *B35*, 2941-4.
33. Cerrini, S.; Pochetti, G.; Gallese, F.; Possagno, E. *Acta Crystal.* **1993**, *C49*, 1087-92.
34. Craven, B. M.; DeTitta, G. T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 530-1.
35. Jones, J. G.; Schwarzbaum, S.; Lessinger, L.; Low, B. W. *Acta Crystal.* **1982**, *B38*, 1207-15.
36. Padmanabhan, K.; Venkatesan, K.; Ramamurthy, V. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2025-8.
37. Popovitz-Biro, R.; Tang, C. P.; Chang, H. C.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4043-58.
38. Gallese, F.; Guarino, A.; Possagno, E. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, *14*, 55-64.
39. Candeloro de Sanctis, S.; Coiro, V. M.; Mazza, F.; Pochetti, G. *Acta Crystal.* **1995**, *B51*, 81.
40. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Castiñeiras, A.; Hofmann, A. F.; Ton-Nu, H.-T. *J. Mol. Struct.* **2000**, *523*, 299-307.
41. Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J.; Rodríguez Núñez, E.; Ton-Nu, H.-T.; Hofmann, A. F. *Steroids* **2004**, *69*, 379.



42. Higuchi, T.; Kamitori, S.; Hirotsu, K.; Takeda, H. *Yakugaku Zasshi* **1985**, *105*, 1115-21.
43. Fukami, T.; Yamaguchi, K.; Tozuka, Y.; Moribe, K.; Oguchi, T.; Yamamoto, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 227-9.
44. Oguchi, T.; Kazama, K.; Yonemochi, E.; Churimaworapan, S.; Choi, W.-S.; Limmatvapirat, S.; Yamamoto, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2815-20.
45. Giuseppetti, G.; Paciotti, M. *Farmaco, Ed. Sci.* **1978**, *33*, 64-72.
46. Lindley, P. F.; Mahmoud, M. M.; Watson, F. E.; Jones, W. A. *Acta Crystal.* **1980**, *B36*, 1893-7.
47. Chikada, M.; Sada, K.; Miyata, M. *Polymer J.* **1999**, *31*, 1061-4.
48. Van der Sluis, P.; Schouten, A.; Kanters, J. A. *Acta Crystal.* **1990**, *C46*, 2165-8.
49. Rizkallah, P. J.; Harding, M. M.; Lindley, P. F.; Aigner, A.; Bauer, A. *Acta Crystal.* **1990**, *B46*, 262-6.
50. Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.
51. Cozzolino, S.; Galantini, L.; Giglio, E.; Hoffmann, S.; Leggio, C.; Pavel, N. V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 12351-9.
52. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*, 1789-93.
53. Briganti, G.; D'Archivio, A. A.; Galantini, L.; Giglio, E. *Langmuir* **1996**, *12*, 1180-7.
54. Jean, B.; Oss-Ronen, L.; Terech, P.; Talmon, Y. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 728-31.
55. Soto, V. H.; Jover, A.; Mejjide, F.; Vázquez Tato, J.; Galantini, L.; Pavel, N. V. *Adv. Mater.* **2006**, en imprenta.
56. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Mejjide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13679-81.
57. Thomas, H. G. *DE1994-4443377*, **1996**.
58. Miyake, Y.; Hirose, J.; Hasegawa, Y.; Sada, K.; Miyata, M. *Chem. Commun.* **1998**, 111-2.
59. Altona, C.; Geise, H. J.; Romers, C. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 13-32.
60. Coiro, V. M.; Mazza, F.; Pochetti, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V. *Acta Crystal.*

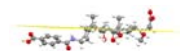


- 1985**, *C41*, 229-32.
61. Miki, K.; Kasai, N.; Tsutsumi, H.; Miyata, M.; Takemoto, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 545-6.
62. Padmanabhan, K.; Ramamurthy, V.; Venkatesan, K. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **1987**, *5*, 315-23.
63. Johnson, P. L.; Schaefer, J. P. *Acta Crystal.* **1972**, *28*, 3083-8.
64. Jones, E. L.; Nassimbeni, L. R. *Acta Crystal.* **1990**, *B46*, 399-405.
65. Limmatvapirat, S.; Yamaguchi, K.; Yonemochi, E.; Oguchi, T.; Yamamoto, K. *Acta Crystal.* **1997**, *C53*, 803-5.
66. Giglio, E.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1975**, *B31*, 743-6.
67. Lindley, P. F.; Carey, M. C. *J. Crystall. Spect. Res.* **1987**, *17*, 231-49.

*CAPÍTULO III.- NUEVOS SURFACTANTES MONOMÉRICOS  
DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO*

---





### III.1.- ALGUNAS PROPIEDADES CRÍTICAS DE LAS SALES BILIARES

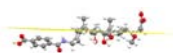
En este capítulo presentamos los resultados obtenidos con nuevos surfactantes monoméricos derivados del ácido 3- $\beta$ -aminocólico. Asimismo, obtuvimos cristales de calidad con los que pudimos resolver la estructura de las moléculas sintetizadas y se estudian, de un modo similar al *capítulo II*, los enlaces de hidrógeno formados. Comenzaremos presentando una breve introducción basada fundamentalmente en las propiedades fisicoquímicas de las sales biliares convencionales.

Como todos los detergentes, las sales biliares tienden a auto-asociarse al aumentar su concentración en agua. Este fenómeno en las sales biliares ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los últimos 30 años. Se han usado multitud de métodos para la determinación de su *cmc* obteniéndose resultados más o menos concordantes entre sí. Los métodos utilizados se pueden dividir en dos grupos:<sup>1</sup>

1. *Métodos invasivos*: implican la introducción de moléculas que pueden interferir en las características de los agregados, por ejemplo, la solubilización de sondas para medir cambios espectrales en fluorescencia. Estas sondas suelen tener un marcado carácter apolar, ello les llevaría a situarse en el interior de estos agregados para protegerse del medio acuoso. De este modo, podrían modificar tanto el número de moléculas necesarias para formar un agregado como la concentración a la cual se generaría esta agregación espontánea.
2. *Métodos no invasivos*: no modifican ni la estructura ni la concentración de formación espontánea de agregados. En estos métodos se incluyen técnicas como la tensión superficial, conductividad, medida estática y dinámica de la dispersión de luz y osmometría entre otras.

La peculiar estructura bifacial de las sales biliares, con la cara  $\alpha$  hidrófila y la  $\beta$  hidrófoba, hace que estas moléculas se agreguen de forma diferente a como lo hace un detergente típico. El proceso, en este caso, suele tener lugar en varios pasos: uno inicial que está gobernado por las interacciones hidrófobas de la cara  $\beta$ , mientras que una segunda agregación se producirá a través de interacciones de enlace de hidrógeno entre los hidroxilos de la cara  $\alpha$  de los agregados iniciales.<sup>2</sup>

El conocimiento, por tanto, de la estructura de los agregados micelares en disolución es básico para obtener una comprensión clara de sus propiedades fisicoquímicas, y con ello de numerosos fenómenos con los que se pueden relacionar como son, el proceso de solubilización y transporte, catálisis, polimerización y detergencia. En realidad, para un número importante de sales

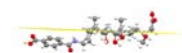


biliares, y especialmente para las trihidroxílicas, no hay una verdadera *cmc* sino un estrecho intervalo de concentraciones sobre el que ocurre el proceso de agregación. Otro factor clave que influye en la *cmc* es el número y orientación de sustituyentes hidroxilo u oxo ya que puede perderse la diferenciación de polaridad entre las caras. Si se cambia de orientación un sustituyente hidroxilo desde una configuración alfa a una beta, la *cmc* aumenta. Si se tiene en cuenta la cadena lateral en la posición 17, se observan dos efectos, siendo uno de ellos el aumento de la *cmc* al acortarse la cadena lateral que concuerda con lo observado para detergentes con cadenas apolares largas. Otro efecto es que la amidación con glicina o con taurina tiene poca importancia sobre la *cmc*, ya que el aumento de un metileno o dos (según sea conjugado) se ve compensado por el incremento de polaridad que introduce el enlace amida. De aquí se deduce que el efecto de la conjugación con glicina o taurina introduce un cambio más importante en el valor de  $pK_a$  que en la *cmc*.<sup>3</sup>

**Tabla III.1.-** Propiedades fisicoquímicas de algunas sales biliares. <sup>a</sup>Referida a las formas protonadas; <sup>b</sup>a 25°C; <sup>c</sup>datos tomados a 75°C; <sup>d</sup>valores tomados de la figura II.11; <sup>e</sup>[Na]=150mM.<sup>4</sup>

Nombre común	Posiciones hidroxiladas	Solubilidad <sup>a</sup> en agua <sup>b</sup> /mM	<i>cmc</i> /mM		Nº de agregación en agua
			Agua <sup>b</sup>	NaCl <sup>b</sup>	
Litocolato sódico	3 $\alpha$	0,00005	0,9 <sup>c</sup>	0,5 <sup>c</sup>	
Quenodesoxicolato sódico	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$	0,027	9	4	
Ursodesoxicolato sódico	3 $\alpha$ ,7 $\beta$	0,0009	19	7	
Desoxicolato sódico	3 $\alpha$ ,12 $\alpha$	0,028	10	3	2-170 <sup>d</sup>
Colato sódico	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$	0,273	13	11	2-20 <sup>d</sup>
Ursocolato sódico	3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,12 $\alpha$	1,67	60	39	
Glicocolato	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$		12	10	9,6 <sup>e</sup>
Taurocolato	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$		10	6	4-10 <sup>d</sup>

Existe una gran controversia en los valores de *cmc*, número de agregación o tamaño de los agregados a los que dan lugar las diferentes sales biliares (*vide supra*). En algunos casos estas diferencias se corresponden a la presencia de impurezas y en otros al uso de técnicas no comparables.<sup>5</sup> Se han usado muchas técnicas para tratar de elucidar cuál es el método correcto pero el problema puede radicar en aplicar un único modelo de agregación para todas las sales biliares.



Tampoco está muy claro si los agregados primarios son monodispersos o si aumenta el número de agregación con la concentración de sal biliar. En la actualidad ya se acepta la formación de esa primera etapa y se la suele denominar etapa de premicelización.<sup>6-9</sup>

### **Temperatura micelar crítica de sales biliares**

En la *figura III.1* se puede ver un diagrama de fases de un tensioactivo típico. A baja temperatura, los detergentes se encuentran en una fase cristalina altamente insoluble en equilibrio con pequeñas cantidades de monómero disuelto. Si se aumenta la temperatura, la fase cristalina se va disolviendo hasta alcanzar un valor en el que el monómero no se encuentre en forma libre sino agregado formando micelas. Se alcanza entonces lo que se conoce como *cmc* y la temperatura donde se ha alcanzado la *cmc* se denomina *cmt* (temperatura micelar crítica).

Existe una temperatura conocida como punto de Kraft en el que coexisten las tres fases en equilibrio: estado cristalino, monómero libre y micelas. Ésta es la temperatura mínima por debajo de la cual no tiene lugar la micelización sea cual sea la cantidad de surfactante, y por encima de la misma el exceso de surfactante que se añada dará lugar a la formación de más micelas, o incluso a cambios de fase pudiendo llegar a la formación de geles.

El valor de la *cmt* depende de la fuerza iónica del medio ya que ésta influye en la solubilidad del monómero y, por lo tanto, en su valor de *cmc* y en la estabilidad de la estructura cristalina. El valor de la *cmt* ha sido medido para varios ácidos biliares naturales, obteniéndose como norma que un aumento en el número de grupos hidroxilo produce una disminución en la *cmt*.<sup>10</sup> El colanoato sódico tiene una *cmt* aproximada de 90°C, mientras que la mayoría de las sales monohidroxílicas presentan valores en torno a 40-80°C. Por ejemplo, el litocolato sódico, considerado en su momento insoluble, tiene una *cmt* de 65°C por encima de la cual su solubilidad aumenta debido a la formación de micelas.<sup>11,12</sup> El resto de sales naturales tanto di- como trihidroxiladas tienen una temperatura de micelización crítica por debajo de los 0°C. Este hecho tiene poca relevancia en los animales homeotérmicos ya que presentan valores de temperatura en torno a los 36-38°C, pero en peces u otros animales que viven en las latitudes árticas, este valor de *cmt* por debajo de la temperatura de congelación del agua tiene gran importancia.

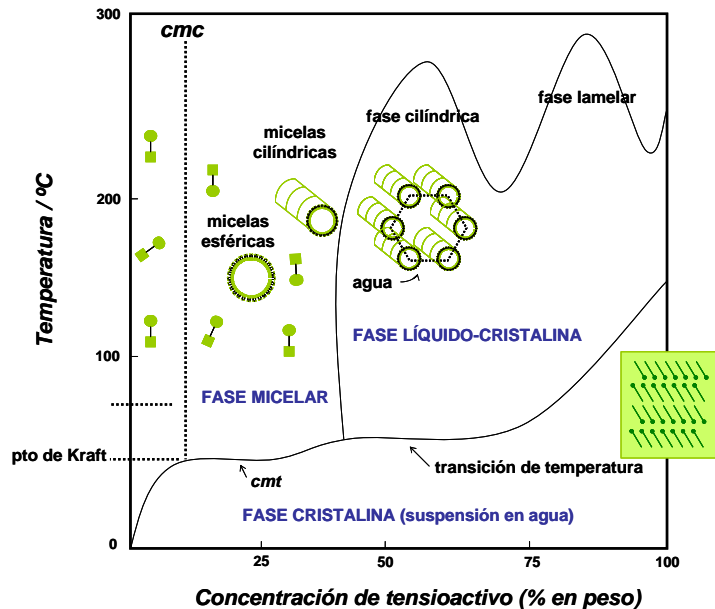
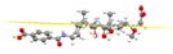
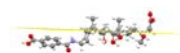


Figura III.1.- Diagrama de fases de un sistema agua-tensioactivo. La *cmt* se muestra como una línea en la que la fase cristalina se convierte en una fase micelar en un intervalo estrecho de temperaturas. La línea desde el origen que denota un aumento en la solubilidad con la temperatura muestra un cambio brusco en el punto de Kraft cuando la concentración alcanza la *cmc* del sistema.

### *pH micelar crítico de sales biliares*

El *cmpH* es un intervalo de pH estrecho por debajo del cual el detergente está en una forma cristalina de baja solubilidad y por encima del cual se disuelve para formar una disolución micelar. La solubilidad de los ácidos biliares protonados en general se incrementa con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula, es decir, se incrementa en proporción inversa al tamaño del área hidrofóbica de la molécula (normalmente la cara  $\beta$ ). Como cualquier molécula aniónica cuya forma protonada tiene baja solubilidad, el logaritmo de la solubilidad aumenta al aumentar el pH, por ello cuando la concentración de especies ionizadas alcanza la *cmc*, las micelas que se forman solubilizan las especies protonadas. Estas especies suelen tener un  $pK_a$  comprendido entre 6-7 cuando están solubilizadas dentro de la micela. Si se adicionan iones  $\text{OH}^-$ , las especies protonadas solubilizadas dentro de las micelas se transforman en aniones, incrementando con



ello el número de micelas con un mínimo cambio en el pH del medio. Cuanto más insoluble es la forma protonada para una *cmc* dada, mayor es el *cmpH*. A modo de ejemplo, el valor de *cmpH* del quenodesoxicolato sódico está en torno a un pH 6-7, para el desoxicolato sódico sobre un pH 7-8, y para el ursodesoxicolato sódico próximo a 8. Si una disolución de estas sales biliares se prepara con una concentración y pH similar a la que hay en el intestino delgado, es decir 10 mM y pH 6,3, los ácidos biliares estarán protonados y precipitarán de la disolución.

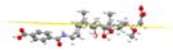
El  $pK_a$  de todos los ácidos biliares no conjugados es, aproximadamente, 5, ya que la cadena lateral de las sales biliares es análoga a un ácido pentanoico y el núcleo sustituyente no tiene influencia en la ionización. La amidación con glicina reduce el  $pK_a$  aproximadamente hasta un valor de 3,9, y con taurina a menos de la unidad. Por consiguiente, el valor de *cmpH* de los conjugados con glicina del quenodesoxicolato y del desoxicolato sódico debería ser aproximadamente sobre 1,1 unidades de pH inferior a la del derivado no conjugado, esto es, sobre 5,6 y 5,9, respectivamente. Para las sales trihidroxiladas, el *cmpH* es inferior, en torno a 6. Por tanto, la amidación con glicina o taurina proporciona sales solubles a pH inferiores a las sales sin conjugar (pH=5,5-7).<sup>13</sup>

### III.2.- FUNCIONES FISIOLÓGICAS

#### *Solubilización y transporte de lípidos polares en micelas mixtas*

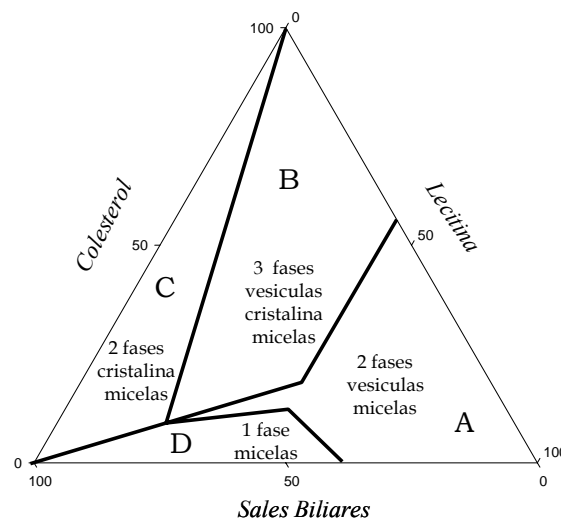
La bilis es un fluido complejo generado por la secreción hepática (hepatocitos) y modificado (secreción, absorción) por la vía biliar (colangiocitos) en su tráfico desde el hepatocito hacia la vesícula biliar y el intestino. Sus principales solutos son las sales biliares (68%), lecitina (22%), colesterol libre (4%), proteínas (4,5%) y bilirrubina (0,3%). El colesterol es una molécula prácticamente insoluble en agua, y por ello la presencia de sales biliares y lecitina en la bilis es fundamental para mantener en disolución al colesterol biliar. En condiciones fisiológicas se logra formando asociaciones moleculares donde se unen estos tres lípidos en relaciones de concentración definidas (relaciones molares) que le dan estabilidad en una disolución acuosa. Estas asociaciones moleculares se denominan micelas mixtas (sales biliares, lecitina, colesterol) y vesículas o liposomas (lecitina y colesterol).<sup>14,15</sup> Véase la *figura III.2*.

La capacidad de las sales biliares de solubilizar lípidos mediante la formación de micelas mixtas con el colesterol y monoglicéridos es una de las propiedades fisicoquímicas y biológicas más importantes de los ácidos biliares y



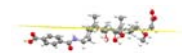
sus funciones fisiológicas se ven mejoradas en casi todos sus aspectos. También son responsables de la solubilización y absorción de vitaminas, como por ejemplo la vitamina E. Las vesículas unilamelares formadas por el colesterol y la lecitina son metaestables y se considera que el fluido biliar es más estable desde un punto de vista termodinámico cuando el colesterol presente es solubilizado en micelas mixtas.

Las sales biliares y los fosfolípidos, por sus propiedades anfipáticas, orientan sus regiones polares hacia la fase acuosa manteniendo sus regiones apolares alejadas del agua y crean un centro micelar hidrófobo donde se disuelve el colesterol. El tamaño de las micelas mixtas es mayor que el de las micelas de sales naturales puras. Es este aumento en el área superficial de la grasa lo que hace que sea posible su digestión por las lipasas, que de otra manera no podrían acceder al interior de los agregados lipídicos.



**Figura III.2.-** Triángulo de fases en porcentaje molar de los constituyentes de la bilis. (A) Zona de dos fases: vesículas y micelas mixtas. (B) Zona de tres fases: vesículas, micelas mixtas y colesterol cristalino. (C) Zona de dos fases: colesterol cristalino y micelas mixtas. (D) Zona de única presencia de micelas mixtas.<sup>16</sup>

La solubilidad del colesterol en agua (aproximadamente 1 nM) puede verse incrementada en más de un millón de veces en presencia de micelas de sales



biliares, y son las dihidroxisales las que poseen una mayor capacidad de solubilización frente a las trihidroxisales.<sup>17,18</sup>

#### ***Activación de enzimas***

En el intestino se encuentra una enzima pancreática del tipo lipasa (BAL) que depende de la presencia de las sales biliares para realizar su función, la lipólisis o digestión de los triglicéridos.<sup>19</sup> La activación de esta enzima sólo tiene lugar en presencia de sales biliares trihidroxiladas, en este caso en la presencia del  $7\alpha\text{OH}$ . Esto indica también la gran especificidad de la interacción.<sup>20</sup> Ha sido resuelta la estructura cristalina de este tipo de lipasa en ausencia y en presencia de sales biliares, en concreto del taurocolato sódico. En ausencia de sal biliar el cristal muestra un “loop” con conformación dinámica entre abierto y cerrado, mientras que la presencia de la sal biliar estabiliza su conformación abierta que es necesaria para su unión al sustrato.<sup>21</sup>

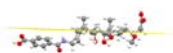
#### ***Homeostasis del colesterol***

La principal vía de eliminación del colesterol en los humanos es la conversión diaria de 500 mg del mismo en ácidos biliares. Probablemente, esta ruta de eliminación sea igual de importante en todos los animales. Durante la circulación enterohepática las sales biliares realizan un viaje cíclico desde el hígado (donde son sintetizados por las células hepáticas) hasta el tracto gastrointestinal. Durante esta circulación sólo un 5% de las sales biliares se pierde en el intestino. Si en algún momento, el nivel de las sales biliares presentes aumenta (por ejemplo, por la ingesta de comida) se produce una supresión de la síntesis de las sales biliares y esto afecta a la ruta de eliminación del colesterol.<sup>22,23</sup>

Recientemente se ha descubierto que los ácidos biliares pueden actuar como hormonas, y por tanto enlazar receptores nucleares y consecuentemente modular la expresión de proteínas que repercuten en la homeostasis del colesterol.<sup>12</sup>

### **III.3.- ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS. NUEVOS DERIVADOS**

La primera modificación de la estructura de los ácidos biliares para mejorar sus funciones fue llevada a cabo por la naturaleza mediante su complejación con glicina y taurina. Esta conjugación aumenta la solubilidad en disolución acuosa de las sales biliares bajo condiciones fisiológicas, lo que produce varios efectos: evita la precipitación bajo las condiciones ácidas que se dan en las proximidades del



duodeno y a altas concentraciones del catión calcio en la vesícula biliar, además permite que los ácidos biliares puedan estar en concentraciones bastante elevadas en el tracto intestinal sin atravesar las membranas celulares. Una segunda modificación que se produce en el organismo es la  $7\alpha$ -deshidroxilación para obtener el desoxicólico y el litocólico, ácidos biliares secundarios, que tienen mejor capacidad de formación de micelas mixtas en presencia de lípidos y colesterol. Otras reacciones de los ácidos biliares que tienen lugar en el organismo son la hidroxilación en  $3\beta$  (en lugar de la posición  $3\alpha$ ) que da lugar a colestasis; la hidroxilación en C25 (en el lugar de C27) provoca una interrupción en la inhibición por retroalimentación del colesterol, lo que aumenta la biosíntesis del colesterol y con ello la acumulación de más alcoholes.

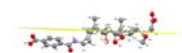
Antes del auge en la modificación de las sales biliares, que tiene lugar a principios de los noventa, ya estaba ampliamente implantado el uso de ácidos biliares naturales en el tratamiento de enfermedades intestinales. A modo de ejemplo, el ácido ursodesoxicólico (ácido  $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi- $5\beta$ -colánico) inició su andadura como agente clínico a principios de los ochenta, aunque en 1961 ya se conocía su eficacia en el tratamiento de la hepatitis crónica y, desde 1975, su eficacia en la disolución de las piedras biliares.<sup>24-26</sup>

El ácido ursodesoxicólico sustituyó al ácido quenodesoxicólico en la disolución de cálculos de colesterol a pesar de su menor eficacia en la disolución de colesterol.<sup>27</sup> La razón radica en que no es citotóxico ya que tiene menor tendencia a solubilizar membranas. De este modo, se consiguieron evitar los efectos secundarios del ácido quenodesoxicólico: aumento de las transaminasas y fiebre alta. El ácido ursodesoxicólico tiene como límites de aplicación farmacéutica su bajo grado de absorción por el organismo (un 50% de la dosis suministrada) y su metabolismo intestinal que da lugar a la 7-deshidroxilación, de todas formas es el único ácido biliar ampliamente usado en clínica en la actualidad.<sup>16</sup>

En los últimos años, las peculiaridades estructurales y fisicoquímicas de los ácidos biliares han favorecido el resurgimiento de otras aplicaciones además de las ya mencionadas, como son: nuevas aplicaciones farmacéuticas, la química supramolecular, la química combinatoria, la química de geles...

#### III.4.- NUEVAS APLICACIONES EN LA INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

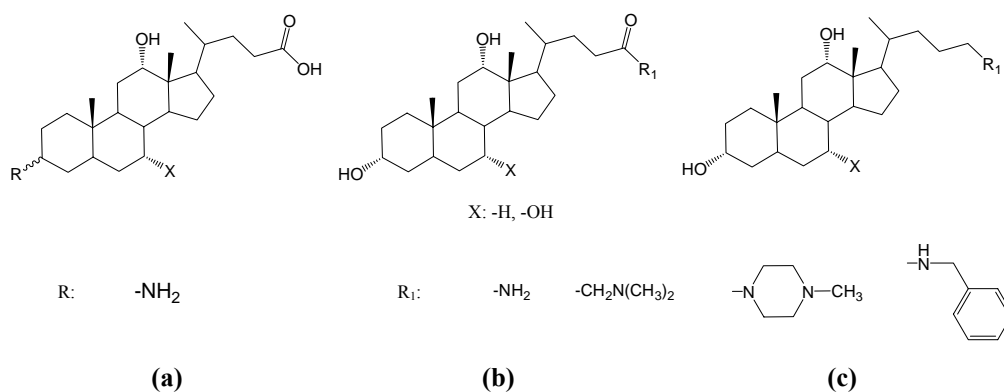
En la bibliografía aparecen descritas un gran número de aplicaciones farmacológicas de los ácidos biliares y sus derivados modificados como puede ser



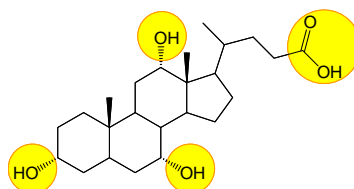
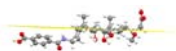
su uso en el tratamiento de la deficiencia de ácidos biliares, en enfermedades hepáticas y la disolución de cálculos biliares de colesterol.

En las últimas décadas se le ha dado una gran importancia a la síntesis y el estudio de sales biliares de carácter catiónico. En muchos de estos estudios, una diamina se une al grupo carboxílico del ácido biliar mediante un enlace amida, mientras el grupo amino remanente forma una sal de amonio cuaternaria<sup>28</sup> (figura III.3). El estudio de las propiedades fisicoquímicas en disolución acuosa muestra que el cambio del grupo carboxílico en la posición 24 no compromete la capacidad de formación de micelas, siendo la única diferencia que, en este caso, pasan a ser catiónicas a pH fisiológico.<sup>29</sup> Estos derivados aminados y/o las amidas presentan una elevada actividad antibacteriana *in vitro* a dosis relativamente bajas (~10 µg/mL) que, en general, son menores que las de compuestos convencionales de función similar.<sup>30</sup>

Un apartado interesante desde el punto de vista farmacéutico es la obtención de un fármaco de actividad selectiva que se suele conseguir confiriendo a la molécula una característica que le permita un transporte efectivo al órgano diana (figura III.4). Para obtener fármacos dotados con selectividad hepática se usan nanocápsulas o liposomas, pero ha surgido una vía alternativa mediante ácidos biliares oportunamente modificados que actuarán de transportadores a través de la vía hepática-gastrointestinal.

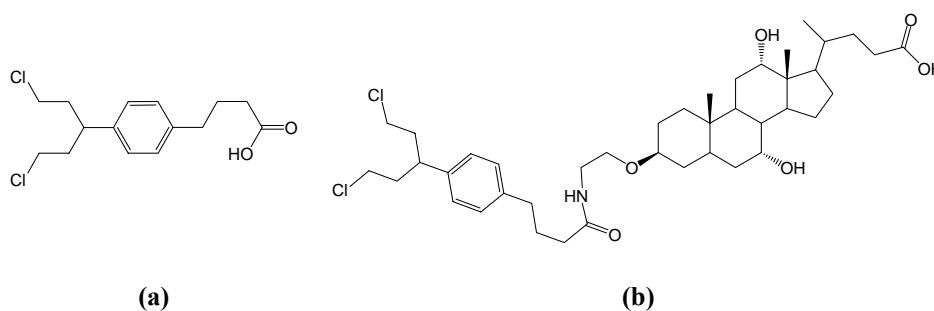


**Figura III.3.-** Estructuras de (a) ácido 3-β-aminocólico y 3-β-aminodesoxicólico; (b) 24-colanamidas; (c) colan-24-amina y desoxicolan-24-amina.

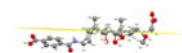


**Figura III.4.-** Posiciones susceptibles de conjugación con un fármaco.

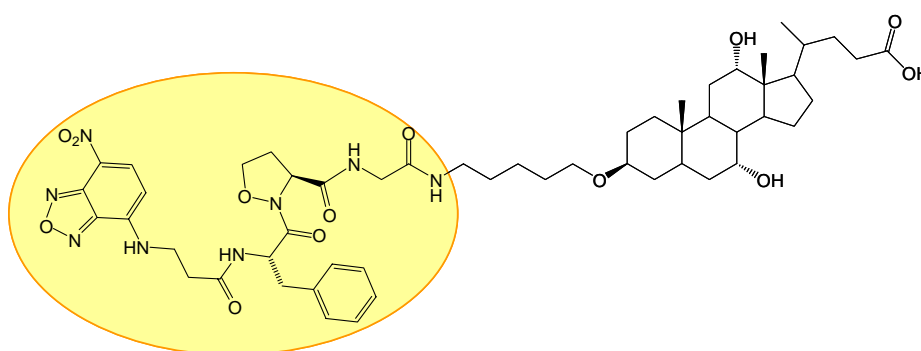
A continuación se muestran ejemplos de conjugación de ácidos biliares con diferentes indicaciones médicas. Con la conjugación se consigue activar la acción de un fármaco inactivo a nivel hepático e intestinal. En la *figura III.5* se muestra el clorambucil, un agente químico con capacidad citostática usado en el tratamiento de varios tipos de cáncer (leucemia linfoblástica crónica y linfoma de Hodgkin). Los metabolitos del clorambucil son eliminados básicamente por vía renal. Para favorecer su eliminación por vía hepática se ha diseñado su conjugado con ácido cólico manteniendo intacto el grupo carboxílico para su posterior conjugación con glicina y taurina. Este conjugado se absorbe a nivel intestinal y es transportado al hígado donde realiza su acción al permanecer inalterada su capacidad de alquilar las proteínas en los hepatocitos. Así se consigue un fármaco de acción selectiva a nivel hepático.<sup>31</sup>



**Figura III.5.- (a)** Estructura del clorambucil; **(b)** clorambucil-ácido cólico. Ambos compuestos tienen potencial en la quimioterapia contra el carcinoma hepatocelular.



Los oxaprolilpéptidos (*figura III.6*) son inhibidores eficaces de la prolil-4-hidrolasa, enzima clave en la biosíntesis de colágeno. Dotar a este fármaco de selectividad a nivel hepático ofrece la posibilidad de que sea utilizado como fármaco contra la fibrosis hepática. Este fármaco tiene demostrada una mayor absorción en el íleon que su fármaco no conjugado por vía parental. Además su enlace peptídico protege al compuesto conjugado del catabolismo de la propia enzima a desactivar.<sup>16</sup>



**Figura III.6.-** Conjugado de oxaprolilpéptido-ácido cólico, se ha resaltado el fármaco de partida.

La conjugación del fullereno-C60 con el ácido ursodesoxicólico ofrece la posibilidad de estudiar este derivado en patologías gastrointestinales (datos sin publicar). Este conjugado puede resaltar las características fisicoquímicas comunes a las dos moléculas que lo componen, como son la actividad membranotrópica y la posibilidad de actuar como transportador. Este derivado de ácido biliar puede ejercer el papel de agente bloqueante del transporte específico para ácidos biliares debido a la presencia de un grupo estéricamente enorme<sup>16</sup> tal y como puede verse en la *figura III.7*.

Otros ejemplos de pro-fármacos son los mostrados en las *figuras III.8.b*, *III.9* y *III.10*. La primera de ellas muestra el conjugado de un inhibidor de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol), cuya eficacia como fármaco es tres órdenes de magnitud menor que el fármaco original.<sup>32</sup> En las siguientes, se combinan en la misma molécula las propiedades peculiares de las moléculas iniciales y se unen en una única molécula actividad y selectividad.<sup>6,33,34</sup>

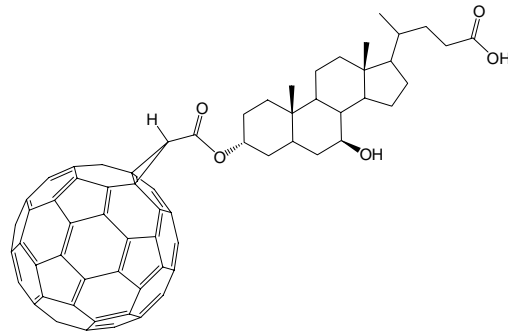
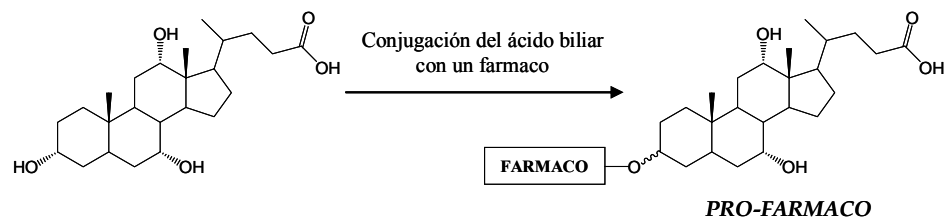


Figura III.7.- Derivado del ácido ursodesoxicólico con una molécula de fullereno.



1.- Captación por lo hepatocitos.  
2.- Liberación intramolecular del fármaco.

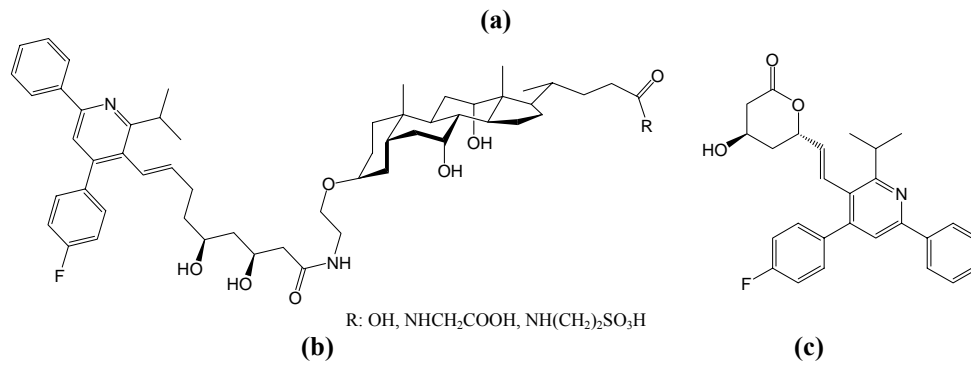
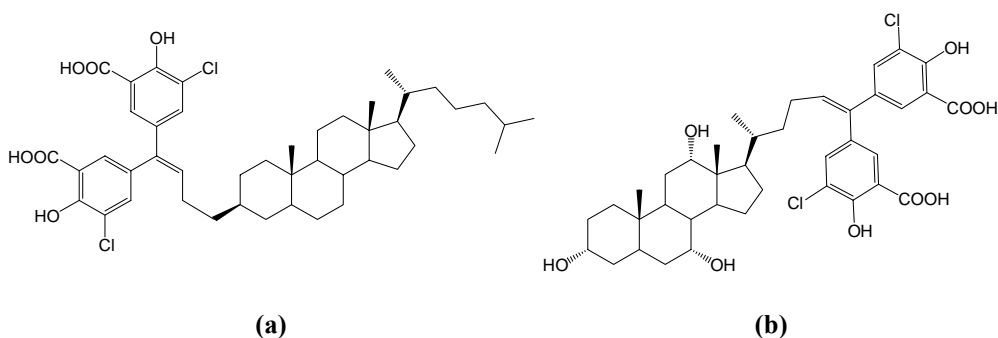
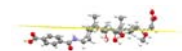
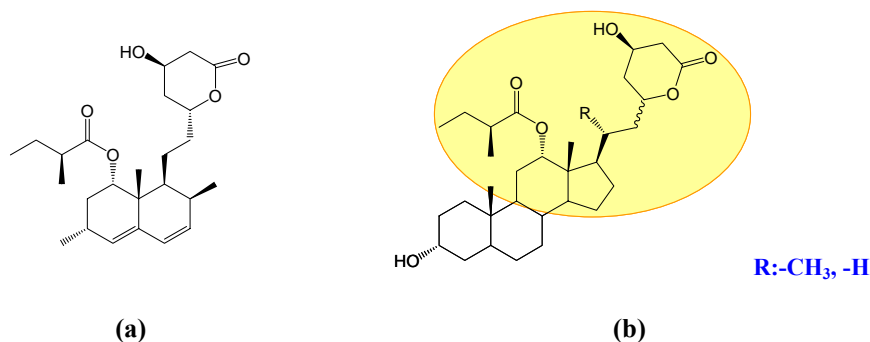


Figura III.8.- (a) Esquema de actuación de un pro-fármaco. (b) Pro-fármaco conjugado del inhibidor de la reductasa HMG-CoA, que sólo llega a ser farmacológicamente activo después de la liberación del fármaco (c).

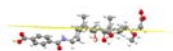


**Figura III.9.-** (a) Estructura del cosalano, un agente anti-VIH; (b) su análogo, derivado del ácido cólico que ha sido diseñado para mejorar la baja absorción que tenía el cosalano por vía oral.

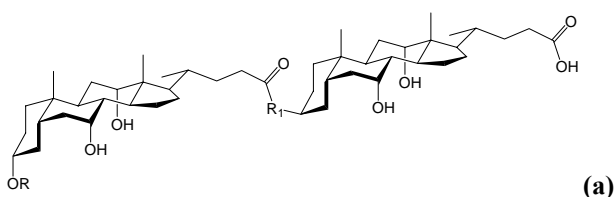


**Figura III.10.-** (a) Lovastalina, agente inhibidor de la reductasa HMG-CoA. (b) Molécula 2 en 1, aumenta la absorción hepática.

Se han sintetizado también muchos dímeros de sal biliar (*figura III.11.a*)<sup>7,35</sup> en los que ambos residuos se unen en una disposición *cabeza-cola* (véase la *Introducción* en el *capítulo I*) y también, trímeros mediante la unión de tres unidades de esteroide a un puente central (*figura III.11.b*).<sup>7</sup> Debido a su gran tamaño, estas moléculas no son capaces de atravesar la membrana ílica que es fundamental para el sistema de transporte de los ácidos biliares, pero, por ello,



pueden considerarse como inhibidores de este proceso. La comprobación de esta inhibición se hizo mediante el análisis de los ácidos biliares fecales, observándose una mayor presencia de éstos. Esta nueva clase de derivados biliares no absorbibles e inhibidores del transporte de sales biliares pueden convertirse en una nueva clase de agentes capaces de disminuir el nivel de lípidos en el organismo.

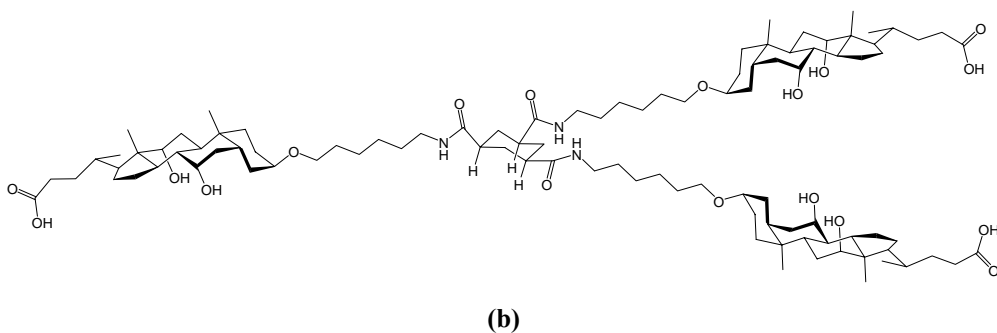


(i) R: -PH<sub>2</sub>CH-     R<sub>1</sub>: -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-

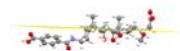
(ii) R: -PH<sub>2</sub>CH-     R<sub>1</sub>: -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-

(iii) R: -H            R<sub>1</sub>: -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O-

(iv) R: -H            R<sub>1</sub>: -NH

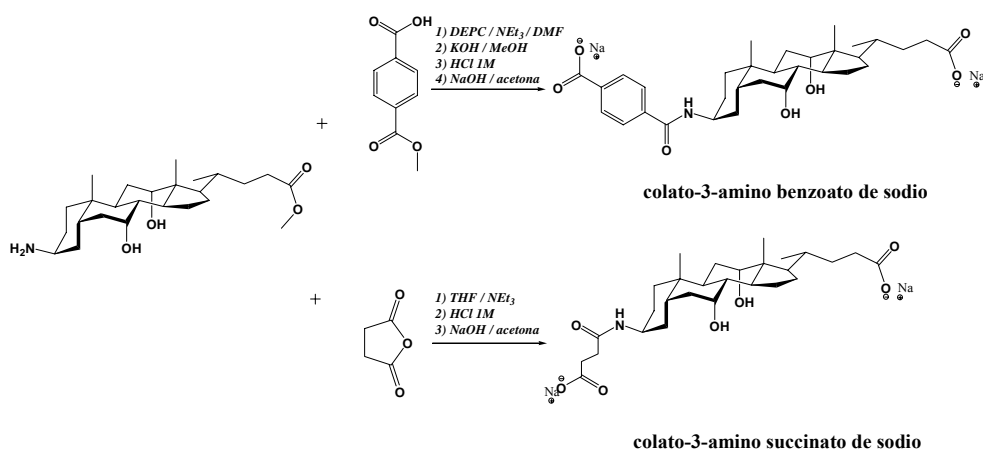


**Figura III.11.-** Ejemplos de dímeros de sal biliar **(a)** y de trímeros de sal biliar **(b)** capaces de inhibir el transporte normal de sales biliares en el organismo.



### III.5.- SÍNTESIS DEL DERIVADO ALIFÁTICO, COLATO-3-AMINO SUCCINATO DE SODIO, Y DEL DERIVADO AROMÁTICO, COLATO-3-AMINO BENZOATO DE SODIO

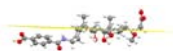
La ruta sintética de obtención de los dos monómeros derivados del ácido 3- $\beta$ -aminocólico puede verse en la *figura III.12*, y el procedimiento con todo detalle puede consultarse en el *apéndice A*. Ambos monómeros se han hidrolizado para formar sales disódicas que tienen una mayor solubilidad en disolventes acuosos. En el caso del derivado aromático, se trata de una reacción de acoplamiento mediante dietilcianofosfonato, y en el caso del derivado alifático, de una reacción de sustitución nucleófila directa de una amina primaria y apertura cíclica de un anillo de cinco miembros.



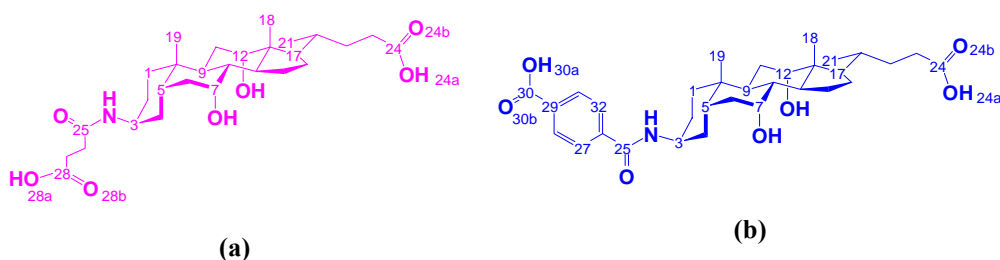
**Figura III.12.-** Ruta sintética del colato-3-amino succinato de sodio, y del colato-3-amino benzoato de sodio.

### III.6.- RESOLUCIÓN DE LOS CRISTALES DE LOS MONÓMEROS SINTETIZADOS

El conocimiento de la estructura cristalina de un surfactante puede ser útil a la hora de proponer modelos para la formación de agregados en disolución acuosa, una estrategia ampliamente utilizada durante las dos últimas décadas por el Profesor E. Giglio y colaboradores.<sup>36</sup> Por este motivo hemos realizado un estudio de difracción de Rayos X de los cristales correspondientes a los ácidos de los

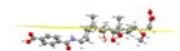


compuestos indicados en el apartado anterior. En ambos monómeros se mantienen las características principales de la molécula de partida, el ácido cólico, conservándose los grupos OH en las posiciones 7 y 12 así como el ácido carboxílico de la posición 24, estando la diferencia principal en la funcionalización de la posición 3 que lleva asociada una inversión de configuración ( $3\alpha$  a  $3\beta$ ). En la *figura III.13* se representa la estructura y se describe la numeración habitual de los átomos de ambos compuestos.



**Figura III.13.-** Estructura y descripción de las posiciones de los átomos en las moléculas de los monómeros colato-3-amino succínico **(a)** y colato-3-amino bencílico **(b)**.

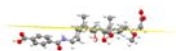
El cristal del monómero colato-3-amino succínico fue obtenido por recristalización en acetato de etilo (Panreac *p.a.*)/agua mientras que el cristal del colato-3-amino bencílico por recristalización de metanol (Panreac *p.a.*). Los cristales obtenidos para el monómero colato-3-amino succínico eran incoloros de tipo prismático, mientras que los cristales obtenidos del colato-3-amino-bencílico eran incoloros y planos. Ambos fueron montados en un capilar de vidrio y los datos recogidos en un difractor Smart-CCD-1000 BRUKER. La fuente de radiación fue  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda=0,71069 \text{ \AA}$ ) y corregida para los efectos de Lorentz y de polarización.<sup>37</sup> En ambos compuestos se efectuó una corrección de la absorción SADABS.<sup>38</sup> Las estructuras fueron resueltas por métodos directos<sup>39</sup> que revelan la posición de todos los átomos no-hidrógenos y refinadas en  $F^2$  mediante un método de mínimos cuadrados utilizando parámetros de desplazamiento anisotrópicos.<sup>40</sup> Los átomos de hidrógeno y los grupos hidroxilo implicados en la formación de enlaces de hidrógeno fueron localizados mediante síntesis de Fourier o bien ubicados geométricamente y refinados mediante AFIX 147 en SHELXL.<sup>40</sup> Las figuras de las estructuras cristalinas que aparecen en este capítulo fueron obtenidas mediante el programa Mercury, como ya se hizo en el *capítulo II*.



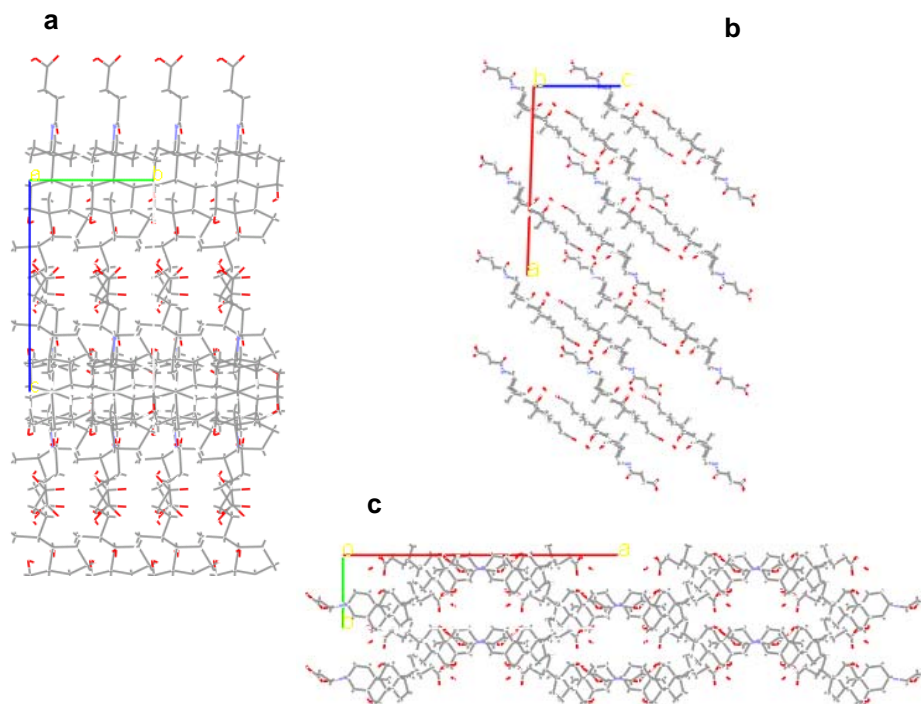
Estos dos monómeros cristalizan en diferentes grupos espaciales. El derivado alifático cristaliza en el sistema monoclinico  $C_2$  y el derivado aromático en el sistema ortorrómbico  $P2_12_12_1$ . La *tabla III.2* muestra los datos de los cristales para los dos monómeros derivados. Ambos monómeros forman complejos de inclusión con el disolvente de recristalización, el derivado alifático con agua y el aromático con metanol con estequiometrías 1:1 y 1:2, respectivamente.

**Tabla III.2.-** Datos de los cristales, de su recolección y refinado correspondientes al colato-3-amino succínico (<sup>†</sup>) y colato-3-amino benílico (<sup>††</sup>).

Fórmula empírica	$C_{28}H_{45}NO_7 \cdot H_2O^{\dagger}$	$C_{32}H_{45}NO_7 \cdot 2CH_4O^{\dagger\dagger}$
Peso molecular	525,67	619,77
Temperatura (K)	293 (2)	120 (2)
Longitud de onda/Å	0,71069	0,71069
Sistema cristalino	Monoclinico	Ortorrómbico
Grupo espacial	$C_2$	$P2_12_12_1$
a (Å)	29,420 (5)	10,453 (5)
b (Å)	7,848 (5)	14,620 (5)
c (Å)	13,434 (5)	21,774 (5)
$\alpha$ (°)	90,000 (5)	90,000 (5)
$\beta$ (°)	91,940 (5)	90,000 (5)
$\gamma$ (°)	90,000 (5)	90,000 (5)
Volumen	3100 (2)	3328 (2)
Z, densidad calculada (g/cc)	4; 1,126	4; 1,237
Coefficiente absorción ( $mm^{-1}$ )	0,081	0,088
F(000)	1144	1344
Tamaño del cristal ( $mm^3$ )	0,41×0,14×0,09	0,41×0,14×0,055
Intervalo theta (recogida de datos) (°)	1,39 a 20,81	1,68 a 23,33
Intervalo de los índices	-29 =< h =< 29 0 =< k =< 7 0 =< l =< 13	0 =< h =< 11 0 =< k =< 16 0 =< l =< 24
Corrección de absorción	SADABS	SADABS
Datos/restricciones/parámetros	1781/3/350	2740/0/423
Calidad del ajuste en $F^2$	1,065	1,051
Ind. R finales [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1=0,0488, wR2=0,1361	R1=0,0495, wR2=0,1153
Todos los datos	R1=0,0726, wR2=0,1489	R1=0,0729, wR2=0,1289

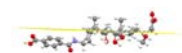


Los empaquetamientos cristalinos de ambos derivados se muestran en las figuras III.14 y III.15.



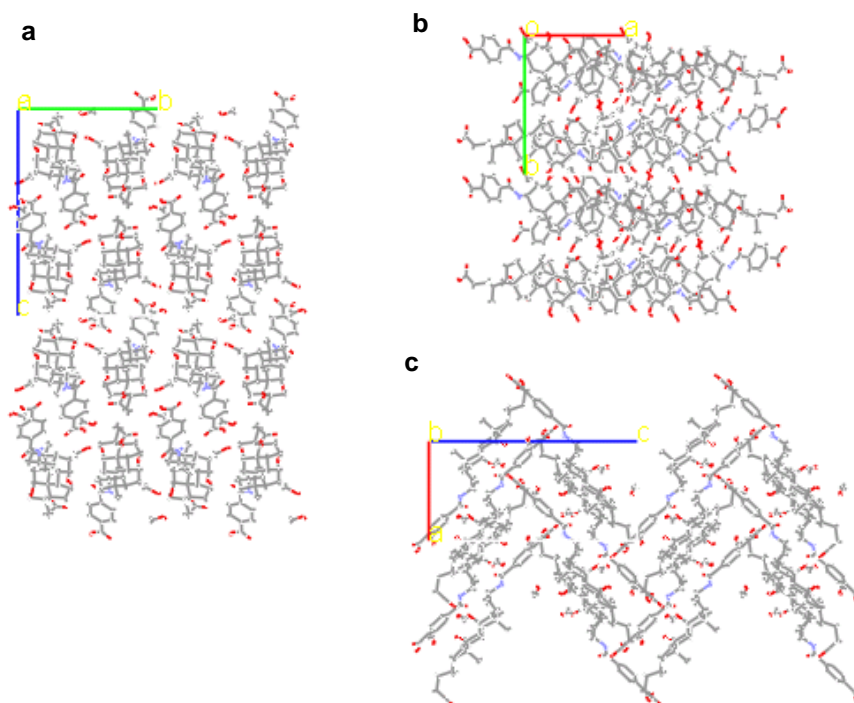
**Figura III.14.-** Empaquetamiento cristalino del monómero colato-3-amino succínico, vista a lo largo de los ejes *a*, *b* y *c*.

La *tabla III.3* muestra los valores de los ángulos de torsión más relevantes y la conformación de la cadena lateral para ambos derivados. Los ángulos de torsión vienen condicionados por las interacciones que existen entre las moléculas en el cristal. Por ello los valores que alcanzan se ven condicionados, entre otros factores, por la red de enlaces de hidrógeno. La conformación del anillo D se analiza siguiendo el criterio de Altona *et al*<sup>41</sup> por medio de los llamados ángulos de torsión máximo posible ( $\varphi_m$ ) y ángulo de fase ( $\Delta$ ). Los valores obtenidos de  $\varphi_m$  y de  $\Delta$  para los monómeros estudiados son indicativos de una conformación intermedia entre *media-silla* y  *$\beta$ -sobre*, la misma que en los cristales de ácido cólico con los



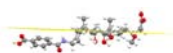
huéspedes metanol, etanol y 1-propanol de estequiometrías 1:1,<sup>42</sup> y de otros cristales de sales biliares.<sup>43,44</sup>

Por otra parte, los valores de los ángulos de torsión alrededor de los enlaces C20-C22 y C22-C23 indican que la cadena lateral en el monómero colato-3-amino succínico se encuentra en una conformación estirada, que supone una distancia  $d(\text{C3-C24})$  de 1,301 nm. En el colato-3-amino bencílico dicha distancia es 1,212 nm. Este menor valor es debido a que el ángulo de torsión  $\varphi_3$  proporciona una conformación *gauche* en torno al enlace C22-C23.



**Figura III.15.-** Empaquetamiento cristalino del monómero colato-3-amino bencílico, vista a lo largo de los ejes *a*, *b* y *c*.

Como ya hemos visto, la orientación de la cadena alquílica lateral en la posición 17 del esteroide respecto al núcleo esteroide puede evaluarse midiendo la distancia del grupo carboxílico, concretamente desde el átomo de carbono C24, al

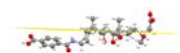


plano horizontal y vertical definidos ambos en el *capítulo II* y que aparecen representados en las *figuras III.16* y *III.17*. Por otra parte, en dichas figuras también se ilustran los valores de los ángulos que forman entre sí los dos planos en cada una de las moléculas. El valor del ángulo para el monómero colato-3-amino succínico es 88,40°, y para el monómero colato-3-amino bencílico es de 88,21°, por lo que son prácticamente perpendiculares entre sí.

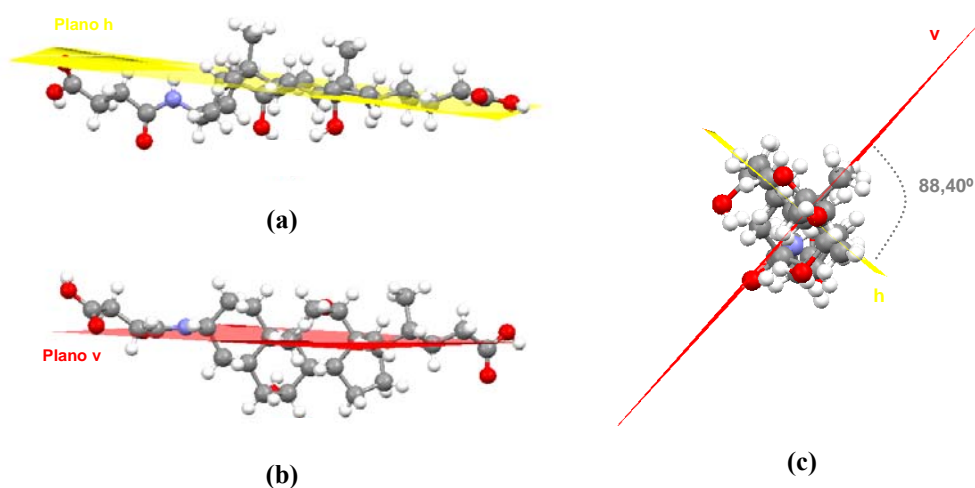
**Tabla III.3.-** Ángulos de torsión de la cadena lateral y el anillo D para los dos monómeros.  $^{\dagger}\varphi_0 = \varphi_m \cdot \cos(\Delta/2)$ ;  $^{\dagger\dagger}\text{tg}(\Delta/2) = [(\varphi_2 + \varphi_4) - (\varphi_1 + \varphi_3)] / 3,0777 \cdot \varphi_0$ .

colato-3-amino succínico	colato-3-amino bencílico
<b>ángulos de torsión (°)</b>	
$\Psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22} = 170,53$	$\Psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22} = -179,23$
$\Psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23} = -171,06$	$\Psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23} = -165,14$
$\Psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24} = 166,07$	$\Psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24} = 66,31$
$\Psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a} = 142,78$	$\Psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a} = -117,12$
<b>conformación de la cadena lateral</b>	
tttt	ttgt
<b>ángulos de torsión (°)</b>	
$\varphi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15} = 46,13^\circ$	$\varphi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15} = 45,07^\circ$
$\varphi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14} = -41,76^\circ$	$\varphi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14} = -37,68^\circ$
$\varphi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13} = -2,78^\circ$	$\varphi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13} = 17,23^\circ$
$\varphi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17} = 5,35^\circ$	$\varphi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17} = 10,38^\circ$
$\varphi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16} = -32,25$	$\varphi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16} = -34,26^\circ$
<b><math>\varphi_m^{\dagger}</math> (ángulo máximo de torsión)</b>	
46,13°	45,19°
<b><math>\Delta^{\dagger\dagger}</math> (fase del ángulo de pseudorotación)</b>	
1,11°	8,47°

En el cristal del colato-3-amino succínico, la distancia del C24 al plano horizontal es de 0,414 Å, y la distancia al plano vertical de -0,315 Å. Por otro lado,

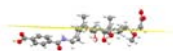


la distancia del C28 a dichos planos es de 1,250 Å y 1,042 Å, respectivamente. Cabe resaltar la coincidencia del plano en el que se encuentra el grupo amida (CONH) con el plano vertical. Lo mismo sucede con el grupo hidroxilo de la posición 3 del ácido cólico no modificado.<sup>45</sup> En el cristal del colato-3-amino bencílico, la distancia del C24 al plano horizontal es de 1,779 Å, y la distancia al plano vertical es de -0,436 Å. Además, la distancia del C30 al plano horizontal y vertical es de 1,842 Å y de 0,638 Å, respectivamente. Por otra parte, el ángulo del anillo bencénico con el plano horizontal es de 29,24° mientras que con el plano vertical es de 63,05°, por lo que el anillo bencénico no se dispone ni paralela ni perpendicularmente a ninguno de los planos ya definidos.

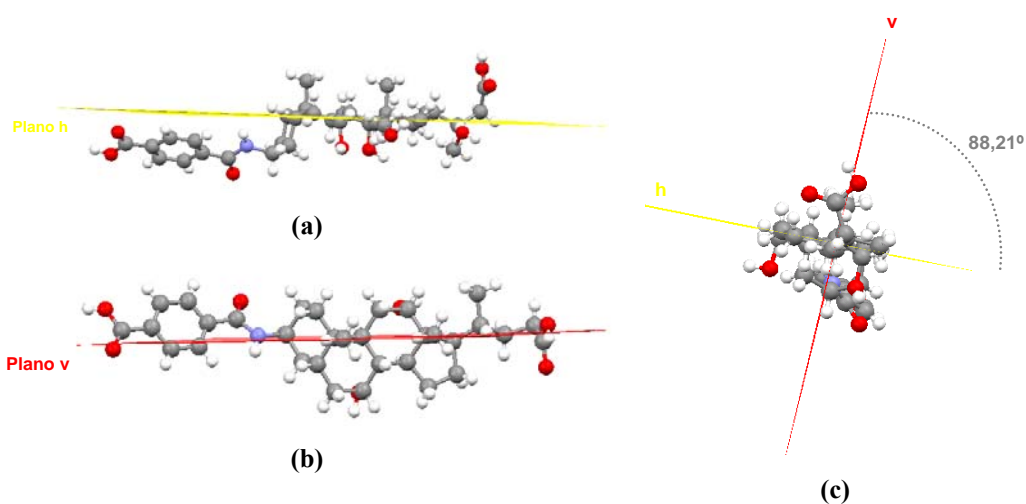


**Figura III.16.-** Análisis de la geometría de la molécula colato-3-amino succínico respecto a los planos (a) horizontal, *h* (definido por 14 átomos de carbono C1/C6-C17/C20) y (b) vertical, *v* (definido por los dos grupos metilo C19 y C18 y los átomos C10 y C13). (c) Ángulo entre ambos planos.

En el caso del ácido cólico cristalizado de una mezcla etanol y agua,<sup>46</sup> la distancia del C24 al plano vertical es de 0,245 Å y al plano horizontal de 0,856 Å. En la *figura III.18* se representan las coordenadas del ácido cólico y de los dos

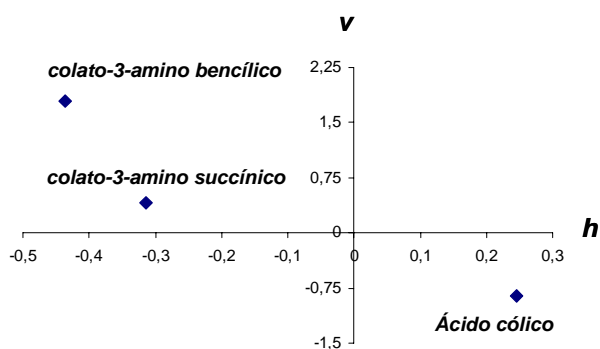


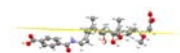
monómeros derivados del colato. Se puede apreciar un claro cambio de la posición del ácido carboxílico desde el ácido cólico a sus mono-derivados y también respecto a los epímeros del ácido quenodesoxicólico (*capítulo II*).



**Figura III.17.-** Análisis de la geometría de la molécula colato-3-amino bencílico respecto a los planos (a) horizontal, *h* (definido por 14 átomos de carbono C1/C6-C17/C20) y (b) vertical, *v* (definido por los dos grupos metilo C19 y C18 y los átomos C10 y C13). (c) Ángulo entre ambos planos.

**Figura III.18.-** Representación esquemática de la posición del grupo carboxílico de la cadena lateral de los colato-derivados y del ácido cólico en función de su distancia a los planos.





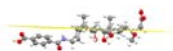
Una de las características más importantes en la química supramolecular es el reconocimiento molecular, mediante el cual las moléculas se asocian selectivamente dando lugar a estructuras perfectamente definidas. El reconocimiento molecular se basa en las fuerzas intermoleculares compuestas mayoritariamente por interacciones no covalentes, de las que destaca el enlace de hidrógeno. El enlace de hidrógeno ocurre en una amplia diversidad de bio-moléculas, en las que juega un papel importante en la regulación de estructuras supramoleculares y empaquetamiento molecular necesario para realizar sus funciones biológicas. Por ello, se ha realizado un estudio de los enlaces de hidrógeno presentes en ambos cristales. Sus características principales se recogen en la *tabla III.4*. Estos resultados indican que los grupos funcionales en las posiciones 7, 12, 24 del esteroide en los dos monómeros actúan simultáneamente como donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno. El grupo carboxilo de la amida lo hace lógicamente como aceptor y el grupo carboxílico terminal lo hace como donante y aceptor. El átomo de nitrógeno de la amida no participa en la red de enlaces de hidrógeno en ninguno de los monómeros, así como los carbonilos terminales del sustituyente 28b y 30b.

**Tabla III.4.-** Enlaces de hidrógeno, ángulos y longitudes en los dos monómeros.

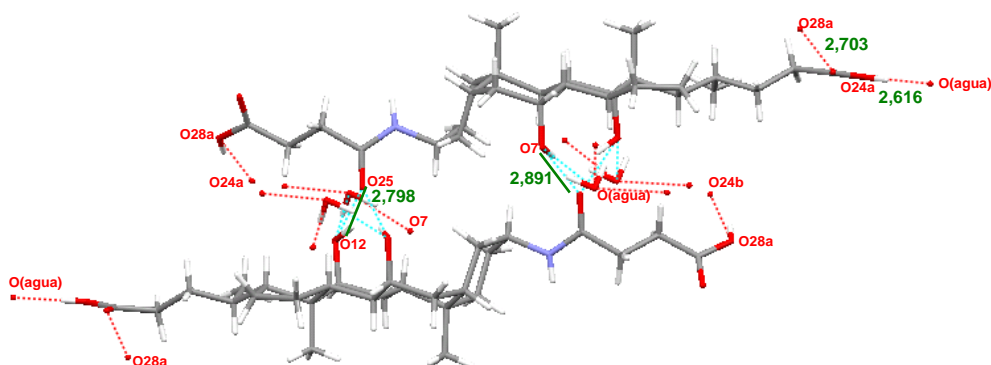
colato-3-amino succínico			colato-3-amino bencílico		
D-H...A	d(D...A)/Å	<DHA (°)	D-H...A	d(D...A)/Å	<DHA (°)
O(agua)-H <sub>A</sub> ...O12 <sup>i</sup>	2,721	71,99	O(24a)-H...O(7) <sup>v</sup>	2,631	166,62
O(agua)-H <sub>B</sub> ...O7 <sup>ii</sup>	2,710	32,14	O(metanol)-H...O(24b) <sup>vi</sup>	2,743	173,20
O(12)...H...O25	2,798	153,68	O(12)-H...O(metanol) <sup>vii</sup>	2,718	165,91
O(7)...H...O25 <sup>i</sup>	2,891	161,88	O(metanol)-H...O(12) <sup>viii</sup>	2,689	162,26
O(24a)-H...O(agua) <sup>iii</sup>	2,616	179,04	O(7)-H...O(25) <sup>ix</sup>	2,673	176,26
O(28a)-H...O(24b) <sup>iv</sup>	2,703	163,96	O(30)-H...O(metanol) <sup>x</sup>	2,551	171,36

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes para el monómero colato-3-amino succínico y el monómero colato-3-amino bencílico: <sup>i</sup>x+1/2,+y-1/2,-z+1; <sup>ii</sup>x,y,z; <sup>iii</sup>-x+1/2,+y+1/2,-z+1; <sup>iv</sup>x-1/2,+y+1/2,+z-1; <sup>v</sup>x-1,+y,+z; <sup>vi</sup>x+1/2,-y+1/2,-z+1; <sup>vii</sup>x,+y+1,+z; <sup>viii</sup>x,+y-1,+z; <sup>ix</sup>-x+1,+y-1/2,-z+1/2; <sup>x</sup>-x+1/2+1,-y+1,+z-1/2.

La estructura del cristal del derivado alifático presenta una estructura base de bicapas con las caras  $\alpha$  de las moléculas de esteroide enfrentadas y estabilizadas por enlaces de hidrógeno. En la parte hidrófila se genera una red cíclica en la que participan (i) los dos grupos hidroxilo de las posiciones 7 y 12, (ii) el carboxilo de la amida (posición 25), (iii) el grupo carboxílico de la cadena de succinilo (posición



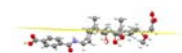
28) y (iv) el ácido carboxílico de la cadena lateral (posición 24) de tres moléculas de esteroide diferentes dispuestas de forma antiparalela, sin huecos entre las partes lipófilas. El disolvente (agua) se incluye de manera desordenada en la parte hidrófila entre las cadenas laterales (*figura III.19*). El átomo de oxígeno de la amida de una molécula actúa como aceptor de los grupos hidroxilo 7 y 12 de otra, la cual se dispone de forma antiparalela. Este esquema se repite por toda la estructura del cristal a lo largo del plano *ac* (*figura III.14.b*).



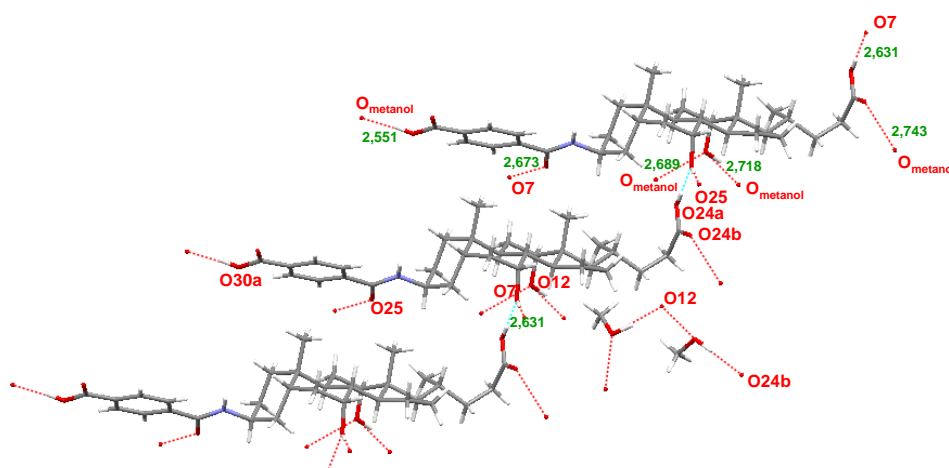
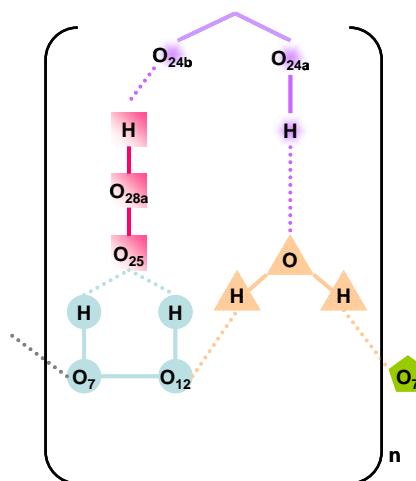
**Figura III.19.-** Red de enlaces de hidrógeno que engloba dos moléculas de colato-3-amino succínico (distancias en Å).

En definitiva, el grupo carboxílico de la posición 24 del esteroide y el de la posición 25 participan en un ciclo de enlaces de hidrógeno a través de una molécula de agua que implica a tres núcleos esteroide tal y como se esquematiza en la *figura III.20*.

Para el cristal del derivado aromático, la red de enlaces de hidrógeno tiene una estructura en zig-zag. Existe entonces un proceso de autorreconocimiento que conduce al autoensamblaje en bicapas. Las moléculas contiguas no se disponen de forma que se favorezcan interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los grupos aromáticos (*figura III.21*).

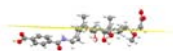


**Figura III.20.-** Esquema de los enlaces de hidrógeno observados en el cristal del monómero colato-3-amino succínico. Cada color representa una molécula que forma parte de la estructura del cristal.

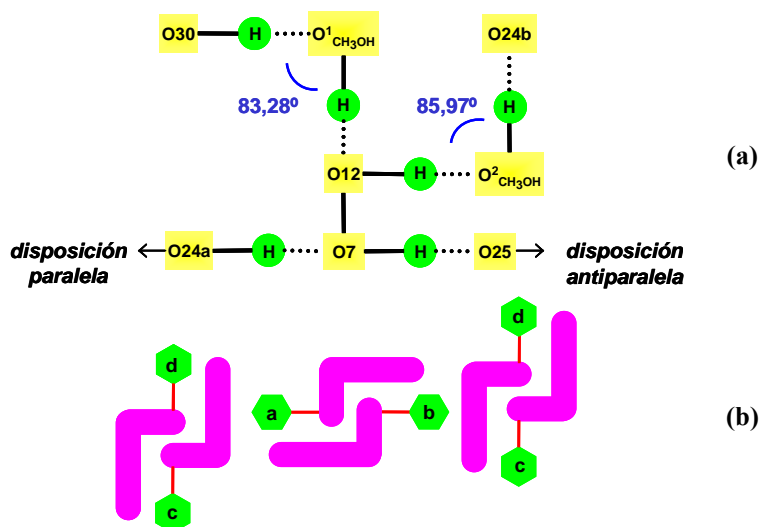


**Figura III.21.-** Red de enlaces de hidrógeno que engloba tres moléculas de colato-3-amino bencílico (distancias en Å).

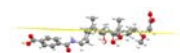
Dentro de la estructura cristalina de este derivado podemos observar una disposición en capas en zig-zag. En cada capa la cara hidrófoba del derivado biliar aparece enfrentada al grupo aromático de otra molécula, mientras que la cara  $\alpha$  se encuentra enfrentada al grupo polar de la cadena lateral en la posición 17 del esteroide. En esta disposición se establece una red de enlaces de hidrógeno que



engloba: (i) los dos grupos hidroxilo de las posiciones 7 y 12; (ii) el grupo carboxílico de la cadena lateral (el O24a como dador y el O24b como receptor); (iii) el grupo carboxílico del anillo aromático (posición 30) y el (iv) el carboxilo de la amida (posición 25). De modo que, el átomo O7 es aceptor desde un O24a y dador hacia un O25. Si bien por medio del enlace de hidrógeno O24a-H...O7 se pasa a una conformación idéntica (es decir, los esteroides que actúan en este enlace de hidrógeno se disponen paralelamente), no obstante, con el enlace de hidrógeno O7-H...O25 se pasa a una conformación invertida y de sentido inverso de las unidades esteroide, lo que se denomina como disposición antiparalela. Por otro lado, a través de los grupos carboxílicos terminales O30 y O24b que participan en la formación de enlaces de hidrógeno a través de moléculas de metanol, se pasa a una disposición contigua en zig-zag. Finalmente, si la unión se realiza mediante O12-metanol-O24b el ángulo que forman los planos de los anillos aromáticos es de  $85,97^\circ$ . Si la unión se realiza mediante O30-metanol-O12 el ángulo es inferior y vale  $83,28^\circ$ . La *figura III.22* muestra el esquema de los enlaces de hidrógeno observados en la estructura del cristal del derivado aromático.



**Figura III.22.-** (a) Esquema de los enlaces de hidrógeno observados en el cristal del monómero colato-3-amino bencílico. (b) Croquis de la disposición de las moléculas de colato-3-amino bencílico en el cristal. El ángulo que forma la unidad *a* con la unidad *b* es igual al que forman la unidad *c* con la *d* y vale  $35,64^\circ$ . El ángulo entre la *a* y la *c* vale  $85,97^\circ$  y el que forma la unidad *a* con la *d* (o la *b* con la *c*) vale  $83,28^\circ$ .

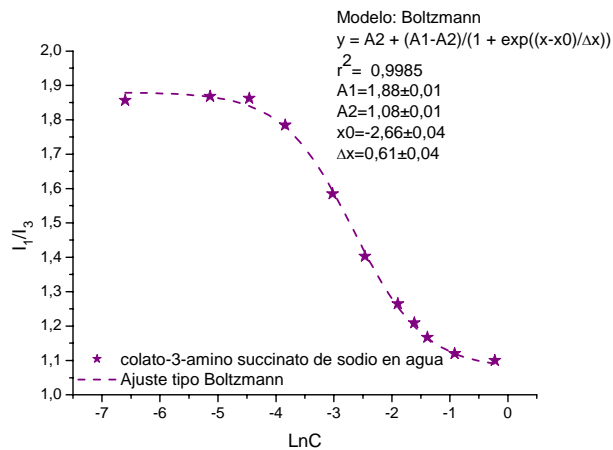
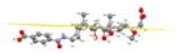


### III.7.- DETERMINACIÓN DE LA *cmc*

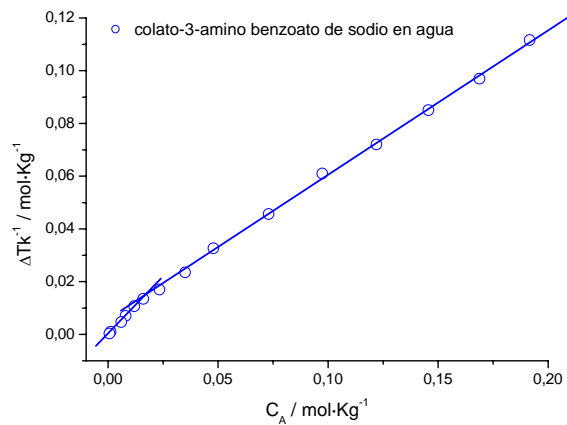
Al observar su estructura molecular, es de esperar que el valor de la *cmc* de estos nuevos derivados fuera aproximadamente similar a los de la sal biliar de partida, como finalmente demostraron los diferentes ensayos realizados. En este caso, para la medida de la *cmc*, se ha recurrido a medidas de fluorescencia (método invasivo) y osmometría de punto de congelación (método no invasivo) para la determinación de la *cmc* de ambos monómeros.

Es bien conocido que la relación de las intensidades de las bandas de vibración 1 y 3 del pireno,  $I_1/I_3$  (a 371 y 381 nm respectivamente siendo la  $\lambda_{ex}=336$  nm), solubilizado en una disolución micelar es un reflejo claro de la polaridad del micro-entorno que rodea al pireno. Por ejemplo,  $I_1/I_3$  toma un valor de 0,54 para el ciclohexano y de 1,70 para el agua. Para el desoxicolato sódico y colato sódico, se han publicado valores de  $I_1/I_3$  iguales a 0,68<sup>47</sup> y 0,79,<sup>48</sup> respectivamente. El obtenido para el derivado colato-3-amino succinato de sodio es 1,08 (*figura III.23*). Esta diferencia en los valores podría ser debida a que el nuevo sustituyente succinilo en la posición 3 de la sal biliar origina una modificación en la estructura interna hidrófoba de los agregados que engloban el pireno. El aumento del valor de la relación  $I_1/I_3$  con respecto al valor del colato indica una ligera disminución del carácter hidrófobo del núcleo interno del agregado dando a entender una estructura más abierta del mismo o un menor número de agregación. Es importante hacer notar que la curva experimental  $I_1/I_3$  vs LnC es una curva sigmoideal. El valor de *cmc* obtenido a partir del punto de inflexión del ajuste de la curva  $I_1/I_3$  vs LnC para el monómero colato-3-amino succinato de sodio es de 69,90 mM, valor cinco veces superior al encontrado en la bibliografía<sup>47</sup> para el colato sódico (13,5 mM) utilizando la misma técnica experimental. Este comportamiento está en concordancia con la disminución del carácter hidrófobo del interior del agregado.

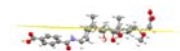
En la *figura III.24* se puede ver una representación de  $\Delta T k^{-1}$  frente a la concentración en  $\text{mol}\cdot\text{Kg}^{-1}$  para el derivado aromático del colato (colato-3-amino benzoato de sodio). El valor de *cmc* viene dado por un cambio en la pendiente de los puntos experimentales. El punto de corte de las dos rectas extrapoladas a partir de los datos experimentales, en este caso, tiene un valor de 11,30 mM comparable al valor de 19,7 mM obtenido para el colato sódico con medidas en disolución acuosa llevadas a cabo con la misma técnica experimental.<sup>49</sup>



**Figura III.23.-** Monómero colato-3-amino succinato de sodio ( $cmc=69,90$  mM). El modelo Boltzmann recogido en la figura, se discute en el capítulo V.



**Figura III.24.-** Monómero colato-3-amino benzoato de sodio ( $cmc=0,0113$  mol/kg (11,30 mM)).

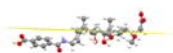


### III.8.- CARACTERIZACIÓN EN DISOLUCIÓN DE LOS AGREGADOS MEDIANTE *LIGHT SCATTERING*

Como ya se ha visto en la introducción de este capítulo, las sales biliares son moléculas anfífilas con una alta importancia biológica ya que pueden solubilizar compuestos mediante la formación de agregados micelares en disolución, tales como: colesterol, bilirrubina, fosfolípidos y ácidos grasos. La determinación de parámetros tales como tamaño y forma de los agregados y su capacidad de respuesta a diferentes variables termodinámicas, como pueden ser la temperatura y fuerza iónica, presentan un alto interés para su comprensión fisicoquímica y biológica.

Para estos dos nuevos derivados se han realizado medidas de *Light Scattering* en modo estático (SLS) y dinámico (DLS). Del mismo modo que para las sales biliares naturales, se asume que la disolución es isótropa y que las dimensiones de los agregados hacen que el factor de estructura del agregado sea  $S(q)=1$ . En los diferentes ensayos realizados se prepararon muestras de diferente concentración de cada uno de los monómeros en distintas condiciones de fuerza iónica con cloruro sódico y a fuerza iónica constante. Cada una de las muestras fue filtrada y medida inmediatamente después de su preparación. Los filtros utilizados fueron de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,1 \mu\text{m}$  para evitar la presencia de partículas ajenas a la muestra y que pudieran distorsionar la medida. Las medidas de *Light Scattering* se realizaron en el menor tiempo posible desde su preparación, aunque también fueron seguidas con el tiempo obteniéndose resultados idénticos. El resultado de las medidas puede verse en la *tabla III.5*.

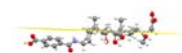
Para ambos monómeros, colato-3-amino succinato de sodio y colato-3-amino benzoato de sodio, la relación  $I_{90}$  disminuye proporcionalmente al disminuir la concentración de las muestras a fuerza iónica constante. Sin embargo, el tamaño hidrodinámico del agregado en disolución no varía sustancialmente (*tabla III.5*). Se puede considerar entonces que, en este caso, el tamaño del agregado permanece constante con la concentración. El diámetro hidrodinámico de la partícula (2,7-3 nm) es bastante menor que  $\lambda/10$  ( $\lambda=532 \text{ nm}$ ) por lo que se realiza la aproximación de considerar despreciables los valores a partir del segundo coeficiente del virial. Así, teniendo en cuenta los valores de *cmc* obtenidos experimentalmente (*vide supra*) para cada monómero, se puede calcular la concentración de monómeros que se encuentran formando agregados en disolución,  $C_{MA}$ , a partir de la cual se calculará la masa molecular aparente y el número de agregación. Se considera que el valor de la *cmc* no cambia significativamente con la fuerza iónica.



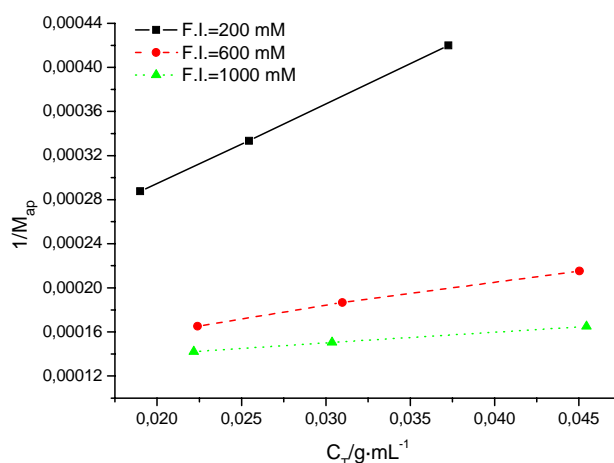
**Tabla III.5.-** Resultados experimentales de las medidas QELS y SLS realizadas para los monómeros colato-3-amino succinato de sodio y colato-3-amino benzoato de sodio a  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  y diferente fuerza iónica. <sup>a</sup>NaCl; <sup>b</sup>C<sub>T</sub>=concentración total, <sup>c</sup>C<sub>MA</sub>=concentración de monómeros que forman agregados=C<sub>T</sub>-cmc; <sup>d</sup>D<sub>h,90</sub>=diámetro hidrodinámico medido a un ángulo de dispersión (θ) de 90°; <sup>e</sup>I<sub>90</sub>=I\*Sen(θ=90°)<sub>muestra</sub>/I\*Sen(θ=90°)<sub>decalina</sub>; <sup>f</sup>σ=polidispersidad; <sup>g</sup>M<sub>ap</sub>=ΔR/KC<sub>MA</sub> (ΔR=[(I<sub>90,muestra</sub>-I<sub>90,disolvente</sub>)/I<sub>90,tolueno</sub>]\*R<sub>tolueno</sub>; K=[(4π<sup>2</sup>n<sub>0</sub><sup>2</sup>)/(N<sub>A</sub>λ<sup>4</sup>)]\*(dn/dc)<sup>2</sup>; (dn/dc)<sub>derivado alifático</sub>=0,1649 mL·g<sup>-1</sup>, (dn/dc)<sub>derivado aromático</sub>=0,1747 mL·g<sup>-1</sup>; C<sub>MA</sub>=C<sub>T</sub>-cmc); <sup>h</sup>n=M<sub>ap</sub>/PM (n=número de agregación).

colato-3-amino succinato de sodio							
<sup>a</sup> F.I./mM	<sup>b</sup> C <sub>T</sub> /mM	<sup>c</sup> C <sub>A</sub> /mM	<sup>d</sup> D <sub>h,90</sub> /nm	<sup>e</sup> I <sub>90</sub>	<sup>f</sup> σ	<sup>g</sup> M <sub>ap</sub> /g·mol <sup>-1</sup>	<sup>h</sup> n
1000	206,8	136,9	2,9	7,17	0,30	2021	4
1000	114,3	44,4	2,7	5,74	0,25	4897	9
600	115,7	45,8	2,9	4,66	0,24	3776	7
1500	115,8	45,9	2,8	6,81	0,26	5705	10
colato-3-amino benzoato de sodio							
200	62,1	50,8	2,8	3,45	0,22	2381	4,0
	42,4	31,1	2,9	2,69	0,27	2999	5,0
	31,7	20,4	2,7	2,04	0,25	3476	5,8
600	75,1	63,8	2,5	7,84	0,22	4645	7,7
	51,7	40,4	2,9	5,68	0,26	5359	8,9
	37,3	26,0	2,8	4,10	0,22	6055	10,1
1000	75,8	64,5	2,7	10,19	0,25	6163	10,1
	50,6	39,3	2,9	6,74	0,23	6641	11,1
	37,0	25,7	2,9	4,59	0,21	7031	11,7

Tal y como se refleja en la *tabla III.5*, si se diluyen las muestras, la masa molecular aparente del colato-3-amino benzoato de sodio aumenta ligeramente y como consecuencia el número de agregación calculado a partir de esta masa aumenta desde 4 a 6; 8 a 10 y 10 a 12 a las fuerzas iónicas 200, 600 y 1000 mM, respectivamente. Sin embargo, no se observa un cambio sustancial en el tamaño del

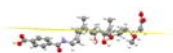


agregado que se forma en disolución. Este hecho podría ser debido a que a bajas concentraciones la intensidad de luz dispersada (valor a partir del cual se calcula la masa aparente) es directamente proporcional a la concentración, pero en ocasiones disminuye debido a las interacciones repulsivas, lo que reduce la compresibilidad osmótica a medida que se aumenta la concentración. Se explicaría así un “falso” aumento del número de agregación calculado a partir del aumento de intensidad, manteniéndose el valor de  $D_h$  en torno a 2,7 nm independientemente de la concentración. A baja fuerza iónica, se presentan los efectos de volumen excluido y las repulsiones electrostáticas, mientras que al aumentar la fuerza iónica se produce un descenso del potencial de interacción coulombico. Así se podría explicar también el aumento en la masa aparente con la fuerza iónica sin que varíe apenas el diámetro hidrodinámico de los agregados. En la gráfica de la *figura III.25* se representa  $1/M_{ap}$  vs  $C_T$  de tensioactivo a diferentes fuerzas iónicas y se ilustra el comportamiento descrito.



**Figura III.25.-** Dependencia del inverso de la masa molecular aparente (determinado por difusión de luz estática) con la concentración de colato-3-amino benzoato de sodio a diferentes concentraciones de NaCl a  $T=25,0\pm 0,2^\circ\text{C}$ .

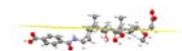
Este comportamiento no es extraño en sistemas micelares, como por ejemplo, las micelas que forma el SDS en disolución acuosa<sup>39</sup> donde se asume la



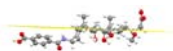
formación de micelas como un modelo paso a paso en el que el número de agregación crece en función de la concentración. Este aumento da lugar a dos efectos: las interacciones intermicelares y, un cambio en el tamaño micelar. Corti y Degiorgio<sup>50</sup> desprecian el segundo efecto considerando que son las interacciones intermicelares las que contribuyen al segundo coeficiente del virial.<sup>39</sup>

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 9-15.
2. Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, *84*, 31-52.
3. Ponnusamy, B.; Chopra, D.; Guru, R. T. N.; Maitra, U. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3695-700.
4. Leggio, C.; Galantini, L.; Zaccarelli, E.; Pavel, N. V. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23857-69.
5. Kratochvil, J. P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, *26*, 131.
6. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5267-75.
7. Simonovic, B. R.; Momirovic, M. *Mikrochim. Acta* **1997**, *127*, 101-4.
8. Gyimesi, J.; Barcza, L. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1993**, *15*, 153.
9. Cacace, F.; De Petris, G.; Giglio, E.; Punzo, F.; Troiani, A. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1925-33.
10. Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids Surfaces* **1988**, *30*, 145-73.
11. Hofmann, A. F.; Roda, A. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 1477-89.
12. Maitra, U.; Vijay Kumar, P.; Chandra, N.; D'Souza, L. J.; Prasanna, M. D.; Raju, A. R. *Chem. Commun.* **1999**, 595-6.
13. Willemsen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2329-35.
14. Donovan, J. M.; Timofeyeva, N.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1501-12.
15. Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5633-44.



16. Aldo Roda; Enrico Roda; Alan Hofmann, E. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**.
17. Rajagopalan, N.; Lindenbaum, S. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 135-47.
18. Nagadome, S.; Yamauchi, A.; Miyashita, K.; Igimi, H.; Sugihara, G. *Colloid Polymer Sci.* **1998**, *276*, 59-65.
19. Wang, C. S. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 10198-202.
20. Terzyan, S.; Wang, C.-S.; Downs, D.; Hunter, B.; Zhang, X. C. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1783-90.
21. Wang, X.; Wang, C.-S.; Tang, J.; Dyda, F.; Zhang, X. C. *Structure* **1997**, *5*, 1209-18.
22. Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Sarkar, A.; Rao, P.; Indi, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2281-3.
23. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U.; Ira; Krishnamoorthy, G.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15905-15914.
24. Kumar D; Tandon R K *J. Gastroenterology Hepatology* **2001**, *16*, 3-14.
25. Kowdley, K. V. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 481-486.
26. Beuers, U.; Boyer, J. L.; Paumgartner, G. *Hepatology* **1998**, *28*, 1449-53.
27. Carey, M. C.; Small, D. M. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506-27.
28. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Cavazzini, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, *18*, 185-90.
29. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726-30.
30. Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Minutello, A.; Fini, A.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 237-40.
31. Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhsen, A., *et al. J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18598-604.
32. Enhsen, A.; Kramer, W.; Wess, G. *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 409-418.
33. Virtanen, E.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *16*, 3385-99.
34. Wess G; Kramer W; Han X B; Bock K; Enhsen A; Glombik H; Baringhaus K

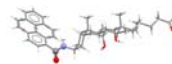


- H; Boger G; Urmann M; Hoffmann A *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3240-6.
35. Kramer, W.; Wess, G.; Bewersdorf, U.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Weyland, C.; Stengelin, S.; Enhsen, A.; Bock, K.; Kleine, H.; Le Dreau, M.-A.; Schafer, H.-L. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 456-64.
36. Campanelli, A. R.; Candeloro de Sanctis, S.; Chiessi, E.; D'Alagni, M.; Scaramuzza, L. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1536.
37. Spek, A. L. *A Program for Data Reduction of CAD4 Data.* **1997**, University of Utrecht.
38. SADABS *Area-Detector Absorption Correction.* Siemens Industrial Automation, Inc.: Madison, WI. **1996**.
39. Altomare A.; Burla M.C.; Camalli M.; Cascarano G.L.; Giacovazzo C.; Guagliardi A.; Moliterni A.G.G.; Polidori G.; Spagna R. *J. Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 115-9.
40. Sheldrick, G. M. *SHELXL97. Programs for Crystal Structure Analysis (Release 97-2)* **1997**, University of Göttingen, Germany.
41. Altona, C.; Geise, H. J.; Romers, C. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 13-32.
42. Johnson, P. L.; Schaefer, J. P. *Acta Crystal.* **1972**, *28*, 3083-8.
43. Jones, E. L.; Nassimbeni, L. R. *Acta Crystal.* **1990**, *B46*, 399-405.
44. Jover, A.; Mejjide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J.; Rodríguez Núñez, E.; Ton-Nu, H.-T.; Hofmann, A. F. *Steroids* **2004**, *69*, 379.
45. Volkov, A.; Zhu, H.; Liu, S.; White, M. A.; Coppens, P. *Acta Crystal.* **1998**, *C54*, i, IUC9800026.
46. Volkov, A.; Zhu, H.; Liu, S.; White, M. A.; Coppens, P. *Acta Crystal.* **1998**, *C54*, i, IUC9800026.
47. Gouin, S.; Zhu, X. X. *Langmuir* **1998**, *14*, 4025-9.
48. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*, 1789-93.
49. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10186-91.
50. Corti, M.; Degiorgio, V. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 711-7.

*CAPÍTULO IV.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS SONDAS  
FLUORESCENTES DERIVADAS DE ÁCIDOS BILIARES*

---





## Capítulo IV

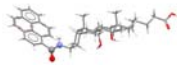
---

La fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en análisis bioquímicos y clínicos debido a que muchas sustancias de interés bioquímico pueden analizarse directamente sin necesidad de someter a la muestra a tediosos procedimientos de aislamiento. De hecho, esta técnica se ha utilizado en análisis cualitativo y cuantitativo de enzimas y coenzimas, esteroides, vitaminas (ácido ascórbico, nicotinamida, piridoxal, riboflavina, tiamina, vitaminas A y B<sub>12</sub>...). Entre los medicamentos se encuentran tranquilizantes tales como reserpina; alucinógenos, como LSD; antibióticos, como penicilinas; barbitúricos; analgésicos; sedantes; relajantes musculares, etc. Asimismo, una de las aplicaciones más importantes es su utilización en análisis de edulcorantes, agentes contaminantes del aire y agua, pesticidas y sus residuos, productos vegetales, como clorofila, flavonoides y alcaloides del centeno. Existen *indicadores de fluorescencia* que son usados en análisis de la misma manera que se utilizan los indicadores coloreados para encontrar el punto final de una valoración. En este caso la propiedad observada es la variación de la intensidad de fluorescencia como consecuencia del cambio que se produce en el medio.

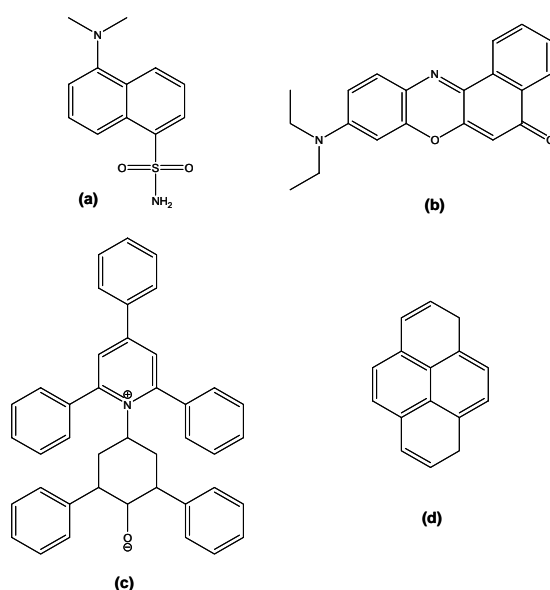
Entre las aplicaciones a sistemas biológicos, cabe citar la utilización de estas técnicas en el estudio de la unión de sustancias (por ejemplo, medicamentos) a macromoléculas (proteínas, enzimas, etc.), y la determinación de lugares activos, así como en enzimología, inmunología, alteraciones de membranas, etc.<sup>1</sup>

Las sondas fluorescentes son una importante herramienta en el estudio de diversos aspectos relacionados con la estructura y dinámica de micelas. En la *figura IV.1* se pueden ver diferentes estructuras moleculares de sondas fluorescentes típicas, como la Dansilamida, el Rojo Nilo, el Colorante de Reichardt y el pireno.<sup>2</sup> Este último y sus derivados son probablemente las sondas fluorescentes usadas con mayor frecuencia,<sup>3</sup> incluyendo las sales biliares entre los sistemas en los que han sido utilizados.<sup>4,5</sup>

El espectro electrónico del pireno ha sido ampliamente estudiado y sus propiedades fotofísicas lo convierten en una herramienta útil como sonda fluorescente (véanse la *tabla IV.1* y la *figura IV.2*). Entre ellas, cabe destacar un alto rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_f=0,6$ ) y un estado *S1* con un tiempo de vida relativamente largo ( $\tau=450$ ns en ciclohexano desoxigenado), características fácilmente determinables mediante simples técnicas de fluorescencia. Además, las intensidades relativas de las bandas de la estructura vibracional del espectro de fluorescencia del pireno, *bandas de Ham*, son sensibles a la polaridad del medio en



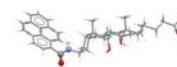
el que se encuentra.<sup>#</sup> Esta polaridad transforma al pireno en un compuesto espectroscópicamente diferente. Los derivados del pireno también son ampliamente utilizados en la investigación de agregados multimoleculares, como micelas o membranas, en el estudio de las posiciones activas de enzimas...<sup>6</sup>



**Figura IV.1.-** Estructuras moleculares de sondas fluorescentes típicas: **(a)** Dansilamida; **(b)** Rojo Nilo; **(c)** Colorante de Reichardt; **(d)** Pireno.

Las membranas biológicas sufren transformaciones de fase como un requerimiento de sus funciones fisiológicas. Se han aplicado diversas técnicas con objeto de estudiar estas transiciones de fase que incluyen: Rayos-X, Microscopía Electrónica, Análisis Térmico, Sondas moleculares de Spin y Sondas fluorescentes. Siendo estas últimas un campo prometedor para la detección de estos cambios

<sup>#</sup>Los espectros UV-Visible e IR cercano de algunos compuestos están influenciados por el medio que los rodea. Éste provoca un cambio en la intensidad y la posición de las bandas, efecto solvocrómico, que en el caso de la espectroscopia de fluorescencia se llama solvatofluorocrómico o fluorosolvocrómico.<sup>21</sup>

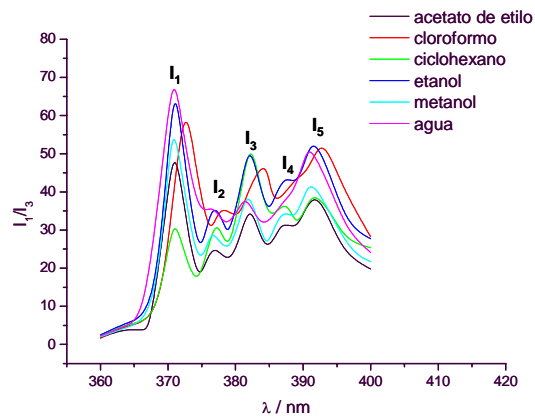
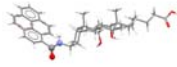


## Capítulo IV

teniendo en cuenta lo bien establecido que se encuentra el cambio energético de las sondas en función del medio que las rodea.

**Tabla IV.1.-** Relación de intensidad de las bandas de vibración 1 y 3 para el pireno ( $I_1/I_3$ ).<sup>2</sup> Valores del índice de polaridad de Snyder según el tipo de disolvente. <sup>a</sup>Datos bibliográficos. Todas las disoluciones tienen una concentración de pireno aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , excepto la disolución en agua, que es 0,1  $\mu\text{M}$ . Cada muestra fue excitada a 337 nm con una anchura de rejilla de excitación y emisión de 2 y 1 nm respectivamente. <sup>b</sup>Datos experimentales. Todas las disoluciones tienen una concentración de pireno aproximadamente 6  $\mu\text{M}$ , excepto la disolución en agua, que es 0,1  $\mu\text{M}$ . Cada muestra fue excitada a 336 nm con una anchura de rejilla de excitación y emisión de 5 y 1,5 nm, respectivamente.

disolvente	$\epsilon$	Índice de polaridad <sup>7</sup>	$I_1/I_3^a$	$I_1/I_3^b$
ciclohexano	2,0	0,0	0,64 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,02
diclorometano			1,45 $\pm$ 0,01	
etanol		5,2	1,37 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,02
metanol	32,6	6,6	1,50 $\pm$ 0,01	1,43 $\pm$ 0,02
acetonitrilo		6,2	1,88 $\pm$ 0,01	
dimetilsulfóxido			1,90 $\pm$ 0,01	
etilenglicol			1,55 $\pm$ 0,02	
agua	80,2	9,0	1,96 $\pm$ 0,05	1,88 $\pm$ 0,02
90% de glicerol en agua			1,66 $\pm$ 0,02	
bmimPF <sub>6</sub> <sup>c</sup>			1,84 $\pm$ 0,02	
cloroformo	4,8	3,4		1,38 $\pm$ 0,02
acetato de etilo		4,3		1,50 $\pm$ 0,02

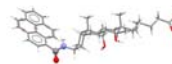


**Figura IV.2.-** Espectro de emisión fluorescente del pireno en disolventes de diferente polaridad: acetato de etilo, cloroformo, ciclohexano, etanol, metanol y agua a pH básico en condiciones ambiente. Sólo la disolución acuosa fue preparada 0,1  $\mu$ M, el resto fueron preparadas a mayor concentración, 6  $\mu$ M.

Los derivados fluorescentes lipídicos disfrutan de un amplio uso en el estudio de la bioquímica de membranas que atañe a la bioquímica de lípidos. Sus aplicaciones se han ajustado a dos clases principales:<sup>8</sup>

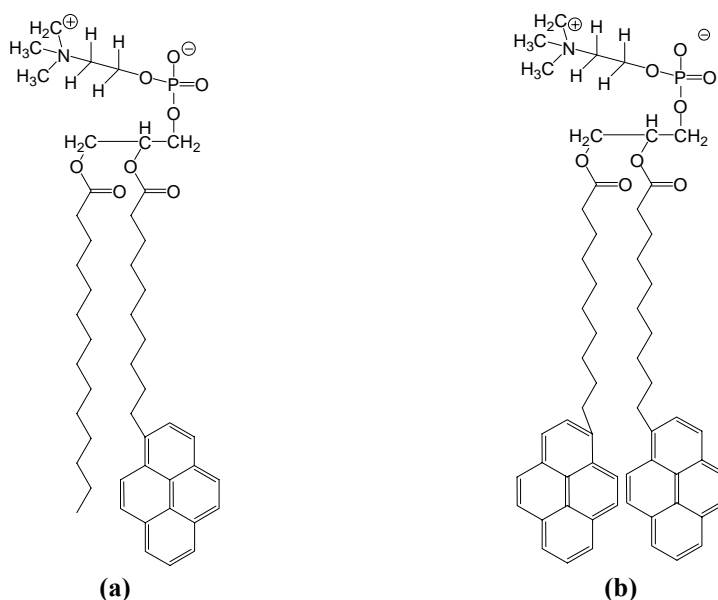
- Como sonda para obtener información del sistema en general, como por ejemplo, la fluidez de la membrana. En este caso se denominan “*sondas de sistema*”.
- Obtención de información de una única molécula lipídica en lo que se refiere a su conformación a su movimiento transmembrana.

Se suelen elegir estos derivados lipídicos ya que con frecuencia presentan una orientación y profundidad dentro de la membrana mucho mejor definida que si se tratara del fluoróforo libre. Además es posible la presencia de fluoróforos en lugares, como proteínas transportadoras de lípidos, a los cuales las sondas originales no tendrían fácil acceso. Pero las ventajas de estos derivados no se quedan aquí, ya que presentan una configuración estructural estéricamente más compatible cuando la sonda forma parte íntegra de la molécula lipídica, siempre asumiendo que una perturbación de este tipo es siempre inevitable,



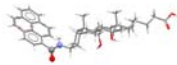
independientemente de la estructura del fluoróforo. Además de esta perturbación estérica, un fluoróforo polar puede producir un cambio en la conformación de los lípidos vecinos.

Si sumamos las propiedades mencionadas de los derivados lipídicos a las del pireno, tenemos como resultado los derivados lipídicos del pireno que son importantes en el estudio de la biología celular, debido fundamentalmente a su facilidad para dar lugar a excímeros dependiendo de su concentración local. En la *figura IV.3* se representan fluoróforos que derivan de la fosfatidilcolina.



**Figura IV.3.-** Estructuras típicas de mono (a) y dipireno-fosfolípidos (b). Una característica especial de la estructura de la derecha es la habilidad que presentan estos compuestos para dar lugar a excímeros.

Los excímeros son una herramienta importante en el estudio de diversos fenómenos como es la difusión lateral, la fluidez de membranas, transiciones de fase, traslocación de lípidos así como del metabolismo lipídico y el transporte en las células vivas. Otra ventaja importante de estos derivados lipídicos del pireno es que la característica hidrófoba del grupo aromático no modifica el alto carácter hidrofóbico de las cadenas alquílicas.



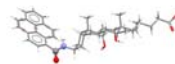
### **Derivados fluorescentes de sales biliares**

Las sales biliares también permiten este tipo de sustitución. Se han desarrollado diversos tipos de sales biliares acopladas a diferentes grupos fluoróforos. Estos ácidos biliares “*etiquetados*” han mostrado ser una herramienta útil en la caracterización del transporte hepático.<sup>9</sup> El transporte de las sales biliares requiere de un estudio muy laborioso debido a la propia complejidad morfológica del hígado, así como de la bioquímica del transporte transcelular y la fisicoquímica intrínseca de las sales biliares. La unión de un agente fluoróforo a las sales biliares permite a los investigadores la posibilidad de vencer alguna de estas dificultades al mismo tiempo que ofrece nuevas posibilidades para el estudio del transporte de las sales biliares con la ayuda de la Microscopía de Fluorescencia. Estos derivados fluorescentes suelen ser usados como sustitutos de los ácidos biliares naturales u otros aniones orgánicos hepatofílicos, lo que permite la caracterización hepática. Es útil conocer si estas moléculas se transportan activa o pasivamente por el intestino delgado, y por lo tanto pueden ser absorbidos y entrar en el ciclo enterohepático.

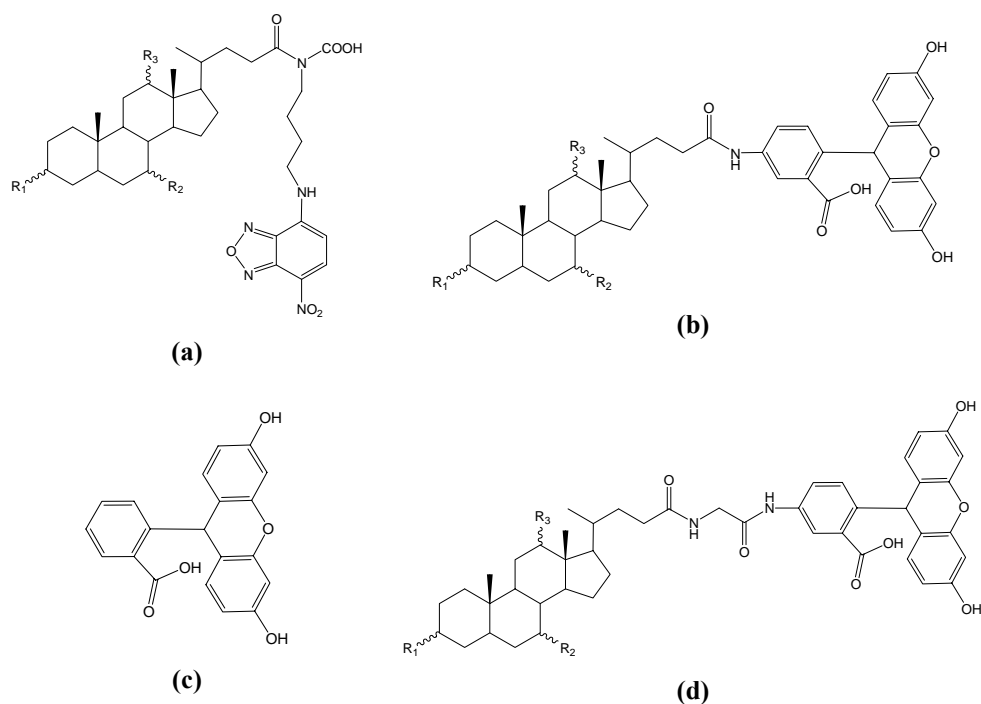
Los grupos fluoróforos se pueden conjugar con el ácido biliar a través de su cadena lateral o bien, a través de los grupos hidroxilos del cuerpo esteroide. En la *figura IV.4* se muestran derivados fluorescentes con el grupo fluoróforo colgado de la cadena lateral. Estos ácidos biliares fluorescentes se han sometido a ensayos de transporte hepático en ratas, presentando una capacidad de transporte de 1/6 del reportado para el taurocólico. Los mejores resultados se han encontrado para los derivados del glicocolato, además estos derivados sufren una escasa biotransformación (<5%) durante el transporte hepático (ver *tabla IV.2*).

Kurz *et al*<sup>10</sup> han sintetizado diversos derivados de sales biliares fluorescentes por sustitución de uno de los grupos hidroxilo de la posición 3, 7 y 12 por 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD), un fluoróforo destacado y de amplio uso. El uso del grupo amino-NBD unido al esqueleto esteroide ofrece dos ventajas:

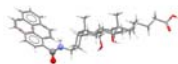
- a) Se mantiene el carácter monoaniónico de la sal biliar.
- b) Hay una alta accesibilidad dirigida a la obtención sintética de diferentes estereoisómeros; *Ácido 3 $\alpha$ -NBD-amino-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*; *Ácido 3 $\beta$ -NBD-amino-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*; *Ácido 7 $\alpha$ -NBD-amino-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*; *Ácido 7 $\beta$ -NBD-amino-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*; *Ácido 12 $\alpha$ -NBD-amino-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*; *Ácido 12 $\beta$ -NBD-amino-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanoico*, así como los derivados análogos conjugados de la taurina.



Sin embargo, nos encontramos con el problema de que incluso la conjugación de este fluoróforo pequeño provoca una expansión del sistema electrónico de la sal biliar, lo que puede provocar alteraciones en su actuación a nivel fisiológico. Un hecho a tener en cuenta para que el estudio del transporte de la sal biliar pueda ser seguido por Microscopía de Fluorescencia es que el derivado debe ser lo más análogo posible a la molécula fisiológica y, además, debe comportarse como tal a nivel del metabolismo, transporte y toxicidad. Por lo tanto, estos derivados fluorescentes deben ser cualitativamente metabolizados y transportados por los mismos mecanismos por los que se rigen las sales biliares fisiológicas y la tolerancia debe ser similar.



**Figura IV.4.-** Ejemplos de sondas fluorescentes derivadas de ácidos biliares. **(a)** C-L-NBD ó UDC-L-NBD; **(b)** CamF ó UDCamF; **(c)** Fluoresceína; **(d)** CGamF. Abreviaturas: NBD, nitrobenzoxadiazolil; amF, aminofluoresceína; C, ácido cólico; UDC, ursodesoxicólico; CG, glicocólico.



**Tabla IV.2.-** Propiedades de transporte hepático de derivados de ácidos biliares y de la fluoresceína en ratas. \*Velocidad máxima de transporte. #Relación entre el flujo biliar y la recuperación biliar. †Este es el valor correspondiente al flujo de sal biliar típico para sales biliares en ratas sanas. ‡Los animales murieron durante el tratamiento.

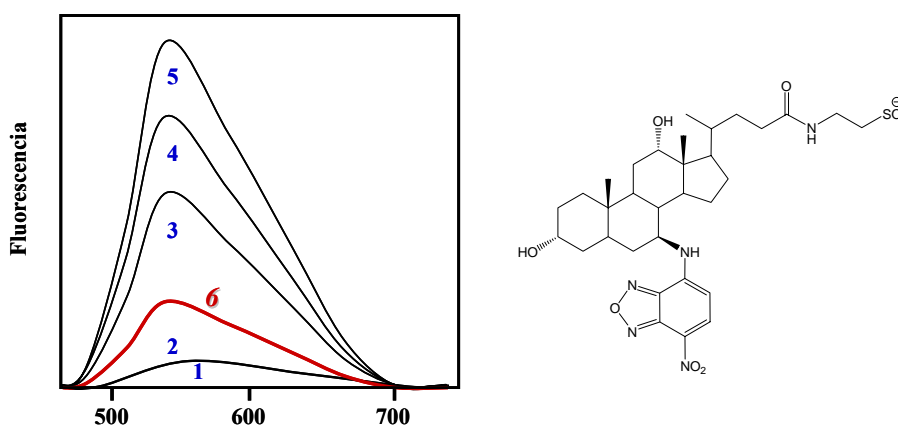
	CGamF	CamF	UDCamF	C-L-NBD	UDC-L-NBD	Fluoresceína
<b>N° animales</b>	8	8	8	7	8	11
<b>T<sub>max</sub> *</b> ( $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$ )	3,73 $\pm$ 0,79	2,79 $\pm$ 0,79	3,43 $\pm$ 0,67	3,68 $\pm$ 0,98	1,52 $\pm$ 0,19	2,80 $\pm$ 0,33
<b>Dosis Letal#</b> ( $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$ )	8,0 <sup>†</sup>	6,0	8,0	8,0	5,0 <sup>‡</sup>	>14
<b>Biotransformación</b>	98,8%	99,3%	96,8%	99,7%	96,1%	45,7%
<b>Recuperación</b>	Bilis	Bilis	Bilis	Bilis	Bilis	Bilis/Orina

Las propiedades ópticas de estos compuestos se basan en un máximo de absorción sobre 490 nm y de emisión a 550 nm, lo que las hace útiles para el estudio mediante Microscopía de Fluorescencia. Los espectros de estos compuestos son fuertemente dependientes de la polaridad del medio (*figura IV.5*) y de la concentración de sales biliares, y sólo ligeramente de la temperatura.<sup>11</sup> Tal y como puede verse en la *figura IV.5*, en su interacción con la albúmina se produce un pequeño desplazamiento del máximo de emisión así como un aumento en el rendimiento cuántico, lo que sugiere la unión de estos derivados a regiones hidrofóbicas.

Los diferentes derivados fluorescentes de ácidos biliares no conjugados son metabolizados en el hígado de ratas de diferentes maneras. El *3 $\beta$ -NBD-amino* derivado no conjugado es completamente transformado al derivado de la taurina y secretado como tal, mientras que el *3 $\alpha$ -NBD-amino* derivado es completamente metabolizado a un compuesto polar no derivado de la taurina. Los no conjugados *7 $\alpha$ -* y *7 $\beta$ -NBD-amino* derivados son parcialmente conjugados con taurina y secretados, principalmente en su forma no metabolizada, mientras que los no conjugados *12 $\alpha$ -* y *12 $\beta$ -NBD-amino* derivados no son transformados en el

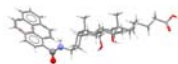


conjugado con taurina a ningún nivel, pero si metabolizados a compuestos sin identificar. Los derivados fluorescentes conjugados son secretados tal cual sin sufrir ningún proceso metabólico. El derivado  $7\beta$ -NBD-NCT es el derivado cuyas propiedades satisfacen en mayor medida los requerimientos como análogo del taurocolato en el transporte hepático, es decir, no es metabolizado, interactúa intracelularmente con las mismas proteínas que el taurocolato y es secretado de la misma forma.<sup>12</sup> Este compuesto es útil a la hora de estudiar el transporte de sales biliares mediante Microscopía de Fluorescencia. En la *figura IV.6* se puede ver la respuesta de células frescas y aisladas de hepatocitos en su presencia. Lo más relevante es la heterogeneidad de la fluorescencia que indica la distinta velocidad de interacción para los hepatocitos.

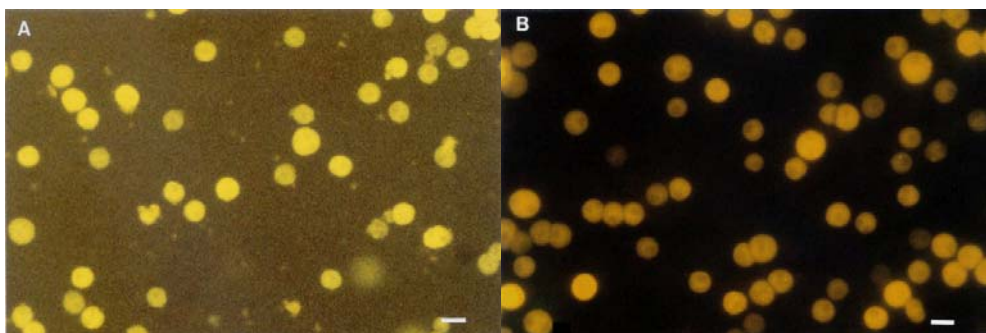


**Figura IV.5.-** Espectro de emisión del *Ácido 7β-NBD-amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colanoico* 5μM en diferentes medios: (1) Agua; (2) Tampón fosfato, pH=7,4; (3) Etanol; (4) n-butanol; (5) n-octanol; (6) Tampón fosfato, pH=7,4, +5% de albúmina. La banda correspondiente a la disolución de albúmina sólo se puede relacionar con la banda (2), la relación con las intensidades del resto de disolventes no es real.

También se han sintetizado derivados de sales biliares con pireno, véase la *figura IV.7*. Más bien, estos derivados se han usado como sustancias gelificantes en disolventes orgánicos y no en aplicaciones fluorescentes como las ya mencionadas.

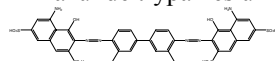


Estos derivados gelifican en disolventes orgánicos en presencia de trinitrofluorenona que actúa como aceptor. La localización del pireno en el ácido biliar es importante, de hecho, los compuestos (b) y (d) de la figura IV.7 no forman geles en presencia de trinitrofluorenona, mientras que el derivado (a) forma geles altamente estables incluso con menos del 1% de la sustancia que gelifica. Como curiosidad, el componente (e) en presencia de 1-metil-pireno-carboxilato no gelifica en butanol ni en cloroformo.

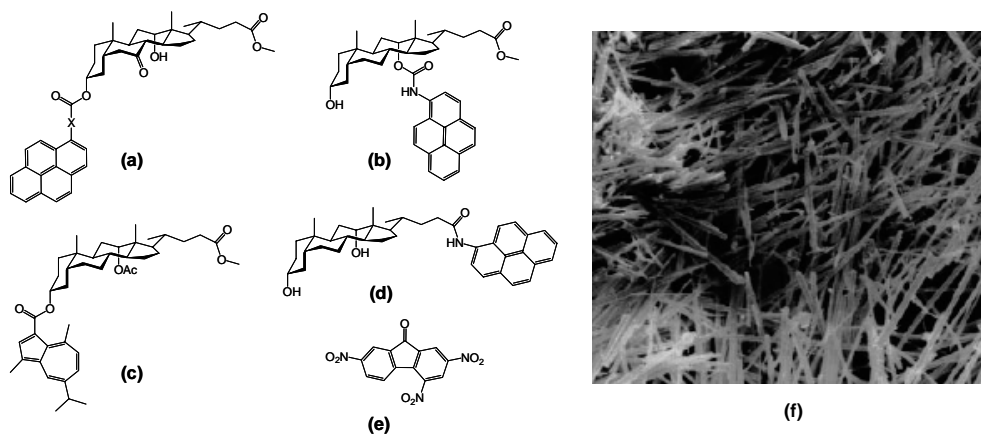
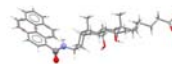


**Figura IV.6.-** Distribución de fluorescencia después de someter hepatocitos con  $7\beta$ -NBD-NCT. (a) Imagen de fluorescencia después de la incubación de  $10^6$  hepatocitos con  $5 \mu\text{M}$  de  $7\beta$ -NBD-NCT y 0,08 % de azul de trypan<sup>§</sup> durante 45 segundos. (b) Incubación durante 2 minutos. Las células fueron separadas del medio de incubación por centrifugación y suspendidas en disolución tampón. La barra que aparece en la esquina inferior derecha de las dos fotografías indica  $20 \mu\text{m}$ .

<sup>§</sup> El azul de trypan es un tinte que se suele utilizar para colorear tejidos o células muertas,

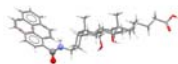


por tanto, las células vivas o tejidos con las membranas celulares intactas no estarán coloreadas. Puesto que las células son muy selectivas en los compuestos que atraviesan su membrana, el azul de trypan celular sólo cruza la membrana en una célula muerta y aparecen con un color azul distintivo bajo un microscopio.



**Figura IV.7.-** Estructuras moleculares de derivados de pireno con sales biliares. En el compuesto (a) X=-NH (carbamato) o un éster.<sup>13</sup> La estructura (e) se trata del agente co-gelificante, trinitrofluorenona. (f) Fotografía SEM de un organogel secado de c/e obtenido en n-octanol con un 3% en peso de cada. Se observa claramente una estructura fibrilar.

En el presente capítulo, presentamos la síntesis de dos derivados de pireno con el ácido cólico y litocólico, y el estudio de sus características fluoróforas. Con ello, perseguimos una doble finalidad. En primer lugar, estudios desarrollados en este grupo de investigación con derivados del ácido cólico en los que se incorporó en la posición 3 del mismo un grupo hidrófobo, mostraron que pueden obtenerse estructuras supramoleculares novedosas. Así, la incorporación de un grupo adamantilo da origen a la formación de estructuras laminares<sup>14</sup> mientras que la introducción de un grupo *tert*-butilfenilo origina tubos moleculares<sup>15</sup> después de un proceso en el que las vesículas originadas inicialmente se transforman hasta la mencionada estructura final. En segundo lugar, como ya se ha indicado, el pireno es ampliamente utilizado en el estudio de membranas. Sin embargo, para justificar el decaimiento temporal de la intensidad de fluorescencia es necesario considerar una componente de difusión lateral que complica el análisis de los datos experimentales.<sup>16,17</sup> La formación de un derivado con un ácido biliar presenta *a priori* dos características esenciales. Por una parte, al aumentar la masa del compuesto la componente de difusión debe disminuir considerablemente, y por



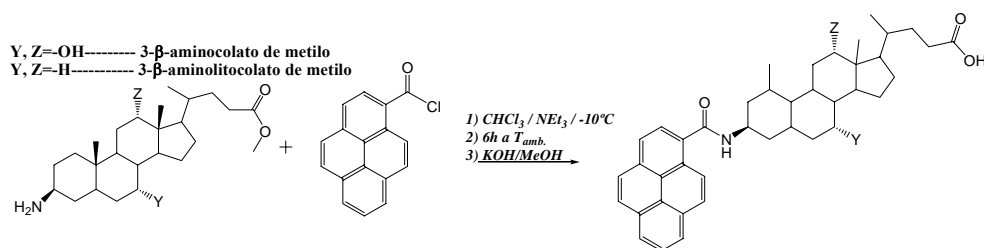
otra parte, el residuo biliar del nuevo derivado permitirá que éste pueda ser utilizado en estudios de circulación enterohepática como los ya comentados, o bien en estudios de autoagregación de los ácidos biliares. Con el fin de obtener grados de solubilidad en agua muy diferentes se han utilizado como residuos biliares el ácido cólico y el ácido litocólico, ya que la solubilidad de las sales sódicas respectivas es muy diferente, siendo la de este último muy inferior.

En el *apéndice B* se explica el fundamento teórico básico de la espectroscopia de fluorescencia.

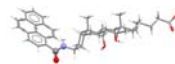
### Parte experimental

Las dos nuevas sondas se sintetizan a partir de la reacción del cloruro del ácido pirenocarboxílico con las aminas derivadas en la posición 3 del ácido cólico y litocólico. El procedimiento sintético puede consultarse en el *apéndice A*, y en la *figura IV.8* puede verse un esquema resumen del acoplamiento entre la amina y el cloruro de ácido del pirenocarboxílico.

Una ventaja elemental de cualquier sonda fluorescente es que la concentración requerida de la misma sea mucho menor que la utilizada para sondas de absorción, lo que minimiza la posibilidad de interacciones sonda-sonda y la cantidad de sonda necesaria para realizar los ensayos, aspecto significativo debido al coste que conlleva su síntesis.



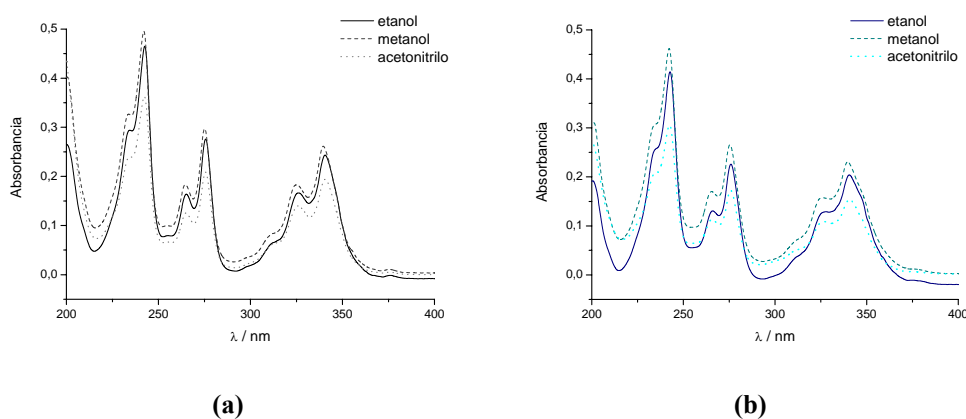
**Figura IV.8.-** Ruta sintética del ácido 3-pirenocólico y del ácido 3-pirenolitocólico.



## Capítulo IV

### Caracterización de nuevos derivados de sales biliares fluorescentes en algunos disolventes

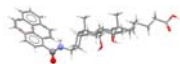
La caracterización de una sonda fluorescente requiere en primer lugar, la determinación de la longitud de onda de excitación a partir de su espectro de absorción, lo que permitirá fijar la longitud de onda de excitación. La *figura IV.9* muestra los espectros de absorción de las dos sondas fluorescentes que se quieren caracterizar. Los espectros de absorción en metanol, etanol y acetonitrilo, no difieren considerablemente del espectro del pireno o análogos, como se puede deducir de la comparación de los espectros de absorción experimentales de la *figura IV.9* y los datos bibliográficos que aparecen en la *tabla IV.3*.<sup>6</sup>



**Figura IV.9.-** Espectros de absorción de las dos sondas sintetizadas en diferentes disolventes en concentración aproximada 8  $\mu\text{M}$ ; **(a)** ácido 3-pirenocólico y **(b)** ácido 3-pirenolítico. Se observa un máximo en torno a 342 nm, longitud de onda seleccionada para la excitación de las sondas.  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Los espectros de la *figura IV.9* evidencian que la longitud de onda a la que se debe excitar las muestras debe ser de 342 nm.

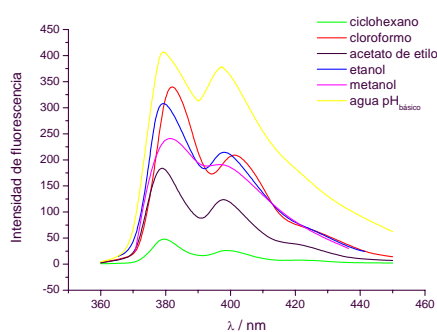
La *figura IV.10* muestra los espectros de emisión de fluorescencia de las dos sondas sintetizadas, esto es, el ácido 3-pirenocólico y el ácido 3-pirenolítico. La principal diferencia con los espectros de emisión del pireno es que en las nuevas sondas sólo se observan dos bandas de emisión claramente



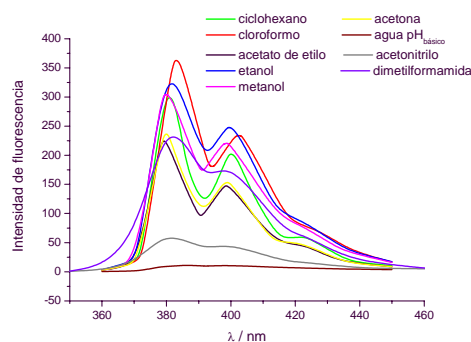
definidas ya que la tercera banda suele manifestarse como un hombro. Tales espectros de emisión son similares al espectro del ácido 1-pirenocarboxílico del que derivan tal y como puede deducirse a partir de la comparación de los mismos con los datos recogidos en la *tabla IV.4*.

**Tabla IV.3.-** Parámetros de absorción UV-Visible del pireno y otros derivados en diclorometano. \*Error en la longitud de onda:  $\pm 0,5\text{nm}$ ;  $^{\S}$  desde el ajuste de la curva.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}^*$		
	$S_1-S_0^{\S}$	$S_2-S_0$	$S_3-S_0$
Py	372,5	337,0	274,5
Py-COOH	386,0	355,0	283,0
Py-CO-NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	377,0	344,0	278,0
Py-CO-NH-Leu-OMe	378,0	344,0	277,5

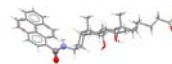


(a)



(b)

**Figura IV.10.-** Espectros de emisión fluorescente en disolventes de diferente polaridad de los ácidos (a) 3-pirenocórico y (b) 3-pirenolítico en disolventes de diferente polaridad (concentración de la sonda 6  $\mu\text{M}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=342 \text{ nm}$ .



## Capítulo IV

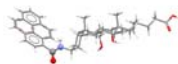
**Tabla IV.4.-** Banda vibracional máxima y desplazamientos Stokes en los espectros de emisión del pireno y de algunos derivados en diclorometano. <sup>a</sup>Longitudes de onda en nm [números de onda] de la banda vibracional máxima (hombros) grabada en el espectro de emisión de fluorescencia. <sup>b</sup>Longitudes de onda en nm [números de onda] de las bandas originarias de las transiciones  $S_1-S_0$  en los espectros de excitación. <sup>c</sup>Desplazamientos Stokes, se calculan a partir de la diferencia en  $\text{cm}^{-1}$  de las bandas originarias  $S_1-S_0$  en los espectros de emisión y excitación. La incertidumbre es  $ca. \pm 50 \text{cm}^{-1}$ .

Compuesto	$\lambda / \text{nm}$		
	$S_1 \rightarrow S_0^a$	$S_1 \leftrightarrow S_0^b$	Desplazamiento Stokes, $\Delta\nu/\text{cm}^{-1c}$
Py	371,5; 377,5; 382,5; (413,0) [26918, 26490, 26414, 25478]	371,5 [26918]	0
Py-COOH	392,0; 413,0; (431,0) [25510, 24213]	385,5 [25940]	430
Py-CO-NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	381,0; 400,0; (419,0) [26247, 25000]	376,0 [26596]	350
Py-CO-NH-Leu-OMe	383,0; 402,5; (420,5) [26110, 24845]	377,0 [26525]	420

Una primera inspección de los espectros de emisión de ambas sondas permite deducir que no se observan cambios apreciables en las longitudes de emisión. Esto era de esperar ya que el esqueleto de unión al pirenocarboxílico es común a las dos y no se añade ningún elemento resonante que influya significativamente en el espectro.

Dado que en la estructura de estas sondas se encuentra el grupo cromóforo pirenilo, se comprobó si la relación de intensidades de sus bandas presentaba algún cambio en función de la polaridad del microentorno circundante. Las bandas a estudiar son las de la transición vibrónica 0,0 ( $I_1$ ) y la 0,1 ( $I_2$ ) ya que la tercera banda aparece como hombro en la mayoría de los disolventes lo que hace difícil su selección (*tabla IV.5*).

En las *tablas IV.6* y *IV.7* se pueden ver los valores para la relación de las intensidades de las bandas de vibración 1 y 2, es decir,  $I_1/I_2$ , los tiempos de vida medio,  $\tau$ , y el porcentaje de cada uno, así como la relación  $\chi^2$  que juzga la bondad del ajuste para cada una de las experiencias realizadas. Hay que resaltar que en los



disolventes, ciclohexano y agua a pH básico, es donde menos se disuelven las nuevas sondas, lo que teniendo en cuenta su polaridad, era de esperar.

**Tabla IV.5.-** Parámetros de emisión de fluorescencia del ácido 3-pirenocólico y del ácido 3-pirenolítico en diferentes disolventes. En verde se indica que la transición vibrónica aparece como un hombro en el espectro de emisión. En gris, bandas no obtenidas experimentalmente. †Medidas experimentales.

		$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}^\dagger$			$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}^\dagger$			
	Disolvente	Transición vibrónica 0,0	Transición vibrónica 0,1	Transición vibrónica 0,2		Transición vibrónica 0,0	Transición vibrónica 0,1	Transición vibrónica 0,2
		Ácido 3-pirenocólico	ciclohexano	379,8		398,0	-	Ácido 3-pirenolítico
cloroformo	382,2		401,6	-	383,0	402,2	-	
acetato de etilo	378,4		397,8	420,4	379,6	399,0	421,2	
acetonitrilo					379,4	398,8	-	
acetona					380,0	398,8	420,8	
dimetilformamida					380,2	398,8	-	
metanol	378,8		397,8	-	380,0	398,8	-	
etanol	379,0		398,4	-	380,4	399,6	-	
NaOH, 1mM	379,0		397,2	-	386,2	398,2	-	

Se puede observar que hay un cambio claro en los valores de la relación  $I_1/I_2$  con el disolvente para ambas sondas. Este es un resultado interesante ya que en principio le puede otorgar aplicaciones similares a las del pireno. En la *figura IV.11* se representa la relación del ácido 3-pirenolítico *vs* la relación  $I_1/I_2$  del ácido 3-pirenocólico. La no influencia del residuo biliar sobre el espectro de fluorescencia del residuo pirenilo, debiera manifestarse en una dependencia lineal entre ambas variables con una pendiente igual a la unidad. La mencionada figura muestra esta relación, siendo la pendiente calculada igual a  $0,96 \pm 0,05$ , es decir, muy próxima a lo esperado. De los nueve disolventes estudiados, sólo el ciclohexano muestra una desviación apreciable respecto a la linealidad de los demás disolventes.



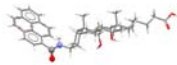
Capítulo IV

**Tabla IV.6.-** Relación de intensidades de las bandas de vibración 1 y 2 del espectro del ácido 3-pirenocólico, así como los tiempos de vida medidos en cada uno de los disolventes que se han utilizado para su caracterización. T=25,0±0,5°C.

disolvente	I <sub>1</sub> /I <sub>2</sub>	τ <sub>1</sub> /ns	τ <sub>2</sub> /ns	Rel.%	Rel.%	χ <sup>2</sup>
ciclohexano	1,8227	47,79±0,55	9,36±0,18	55,35	39,87	1,269
cloroformo	1,6208	25,18±0,08	8,77±0,76	96,17	3,83	1,004
acetato de etilo	1,5659	62,68±0,13	15,95±1,35	96,08	3,92	1,016
acetonitrilo	1,5372	64,13±0,41	20,02±3,78	98,33	1,67	1,061
acetona	1,5508	61,29±0,17	8,86±0,85	98,73	1,27	1,049
dimetilformamida	1,5085	48,63±0,12	8,88±0,99	98,64	1,36	1,008
metanol	1,4015	54,94±0,15	9,96±2,09	99,24	0,76	1,072
		53,55±0,42	18,13±3,46	98,01	1,99	1,029
etanol	1,4492	48,76±0,25	16,50±2,76	97,95	2,05	0,934
agua pH <sub>básico</sub>	1,0784	35,10±0,07	8,29±1,09	98,42	1,58	1,083

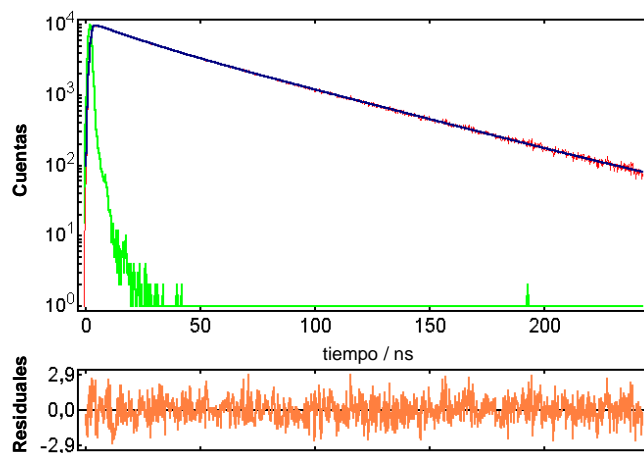
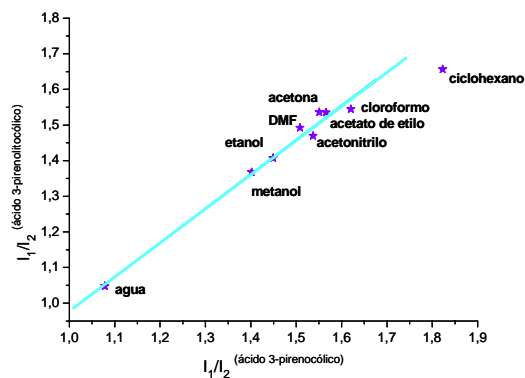
**Tabla IV.7.-** Ídem *tabla IV.6* para el ácido 3-pirenolítico.

disolvente	I <sub>1</sub> /I <sub>2</sub>	τ <sub>1</sub> /ns	τ <sub>2</sub> /ns	Rel.%	Rel.%	χ <sup>2</sup>
ciclohexano	1,6561	45,43±0,28	14,02±0,76	92,07	7,93	1,166
cloroformo	1,5446	26,63±0,10	10,59±0,40	88,64	11,36	1,114
		26,46±0,09	10,08±0,37	89,30	10,70	1,037
acetato de etilo	1,5350	64,24±0,34	14,76±0,43	92,66	7,34	1,092
		64,19±0,51	19,50±0,73	90,70	9,30	1,042
acetonitrilo	1,4695	67,57±0,48	18,43±0,67	92,15	7,85	1,044
		61,94±0,50	19,84±0,84	91,22	8,78	0,995
acetona	1,5361	59,27±0,43	18,44±0,76	91,61	8,39	1,110
		59,60±0,33	15,71±0,51	92,04	7,96	1,096
dimetilformamida	1,4925	56,50±0,27	14,43±0,39	90,91	9,09	1,158
		55,30±0,26	13,92±0,40	91,45	8,55	1,157
metanol	1,3673	53,61±0,37	18,05±0,56	87,83	12,17	0,985
		54,95±0,38	17,98±0,53	87,43	12,57	1,038
etanol	1,4074	50,67±0,37	18,42±0,65	87,90	12,10	0,984
		51,50±0,35	17,92±0,62	88,51	11,49	1,022
agua pH <sub>básico</sub>	1,0480	34,30±0,53	13,33±0,18	33,53	62,68	0,958
		34,74±0,53	13,30±0,15	29,74	65,96	1,194

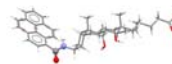


La caracterización de una nueva sonda fluorescente implica también la determinación del tiempo de vida media. A modo de ejemplo, en la *figura IV.12* se representa un decaimiento de la sonda fluorescente ácido 3-pirenilotocólico solubilizada en etanol. A partir del análisis de la curva de decaimiento se obtiene el tiempo (o tiempos, si hay más de uno) de vida media. El decaimiento de fluorescencia fue medido excitando a una longitud de onda de 342 nm y se empleó una técnica por mínimos cuadrados no lineal para extraer los tiempos de vida media de las especies fluorescentes. Los resultados se resumen en las *tablas IV.6* y *IV.7*.

**Figura IV.11.-** Representación de la relación  $I_1/I_2$  del ácido 3-pirenilotocólico vs la relación  $I_1/I_2$  del ácido 3-pirenocólico en los nueve disolventes estudiados.

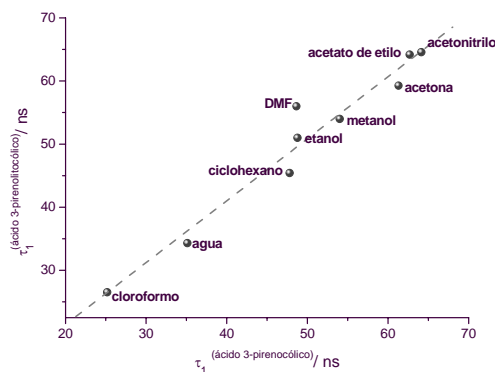


**Figura IV.12.-** Decaimiento de fluorescencia de la sonda ácido 3-pirenilotocólico solubilizada en etanol.  $\lambda_{exc.}=342$  nm.  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

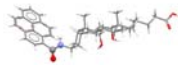


De un modo análogo al de la *figura IV.11*, en la *figura IV.13* se representa  $\tau_1$  del ácido 3-pirenolítico (datos de la *tabla IV.7*) vs  $\tau_1$  del ácido 3-pirenocólico (datos de la *tabla IV.6*). En este caso, el valor de la pendiente es  $0,98 \pm 0,08$ , concordante con lo esperado. Las gráficas de las *figuras IV.11* y *IV.13*, junto con la cercanía del valor experimental de la pendiente a la unidad, constituyen un muy poderoso aval sobre la autoconsistencia de los datos obtenidos para ambas sondas. Asimismo, vienen a representar que en posteriores estudios de aplicación de las sondas, los datos a obtener por cualquiera de ellas, deben ser prácticamente idénticos. Por ello, la elección entre una u otra debe estar basada en aspectos ajenos a su papel de fluoróforo, y atender a otras razones como, por ejemplo, su mayor o menor solubilidad.

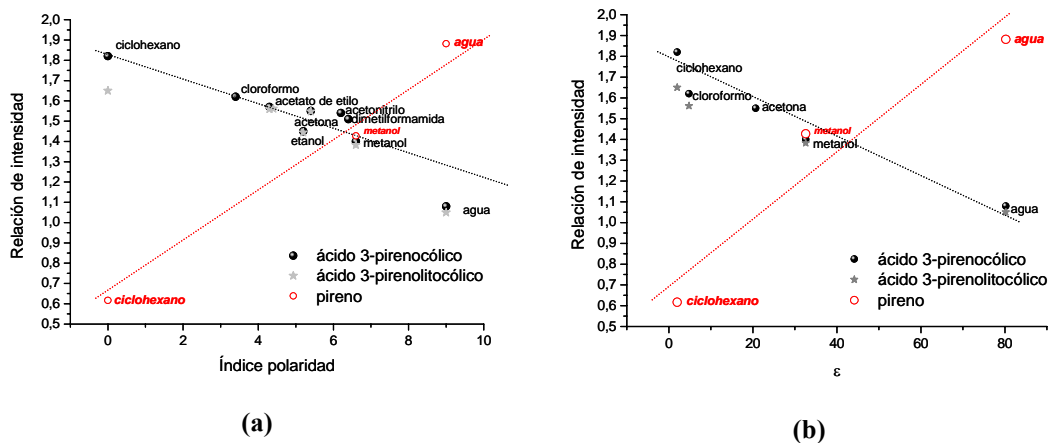
**Figura IV.13.-** Representación de  $\tau_1$  del ácido 3-pirenolítico vs  $\tau_1$  del 3-pirenocólico obtenidos en los disolventes indicados.



En la *figura IV.14* se representa gráficamente la relación de las intensidades  $I_1/I_2$  para ambas sondas fluorescentes y la relación de las señales  $I_1/I_3$  del pireno frente a los índices de polaridad (según Snyder) y las constantes dieléctricas de los disolventes en los que se han caracterizado. La figura evidencia una relación invertida para estas sondas en relación con la tendencia observada para el pireno. Efectivamente, la relación  $I_1/I_3$  para el pireno es máxima para el agua y mínima para el ciclohexano, mientras que la relación  $I_1/I_2$  de estas sondas es máxima para el ciclohexano y mínima para el agua. También debemos hacer notar que el intervalo  $|\Delta I_1/I_3|$  es mayor que el  $|\Delta I_1/I_2|$ . En cualquier caso, al tener en cuenta cómo se ve afectada la relación  $I_1/I_2$  de las nuevas sondas por la polaridad del disolvente, se puede concluir que las mismas pueden ser utilizadas para obtener una idea acerca de la polaridad del microambiente en donde se aloje la sonda y



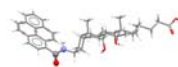
también para otras aplicaciones similares a las del pireno como, por ejemplo, determinación de la *cmc* de un agregado micelar.



**Figura IV.14.-** Relación de las intensidades de las bandas de vibración de las sondas: ácido 3-pirenocólico; ácido 3-pirenilotocólico y pireno vs (a) los índices de polaridad (b) o las constantes dieléctricas.<sup>7</sup>

Por otra parte, dado que la relación  $I_1/I_3$  del pireno ha sido propuesta como una escala de polaridad de los disolventes,<sup>18</sup> en la *figura IV.15* se representa la relación  $I_1/I_2$  de las sondas sintetizadas frente a la relación  $I_1/I_3$  del pireno. Sin embargo, una vez comentadas las gráficas anteriores, esta nueva gráfica no aporta conclusiones adicionales. Análogamente a la *figura IV.14*, en la *figura IV.16* se representan los tiempos de vida de la sonda ácido 3-pirenocólico frente a los índices de polaridad.<sup>7</sup>

Las *tablas IV.6* y *IV.7* evidencian que estos derivados exhiben un decaimiento bien representado por una doble exponencial. En estas tablas se recoge también el peso relativo de ambos componentes. En estos casos, el porcentaje mayor, que corresponde al mayor tiempo de vida (proceso más lento) podría ser atribuido a la fluorescencia del confórmero del fluoróforo en mayor proporción, mientras que el tiempo de vida más rápido sería atribuido al confórmero en menor población fraccional.<sup>6</sup> Esto mismo sucede para derivados del 1-pirencarboxílico con enlace amida con la misma direccionalidad (*tabla IV.8*), siendo el ángulo formado entre el enlace amida y el pireno el responsable de los diferentes tiempos de vida. Cabe recordar que en el caso del pireno, los valores de los tiempos de vida



Capítulo IV

medio son mayores en los disolventes apolares (450 ns en ciclohexano, 200 ns en DMSO), mientras que en estas sondas no se observa una tendencia en la misma dirección, ya que en el agua, por ejemplo, exhibe un tiempo de vida menor que en los disolventes considerados de menor polaridad, tales como, acetona, acetonitrilo, metanol o etanol (figura IV.16).

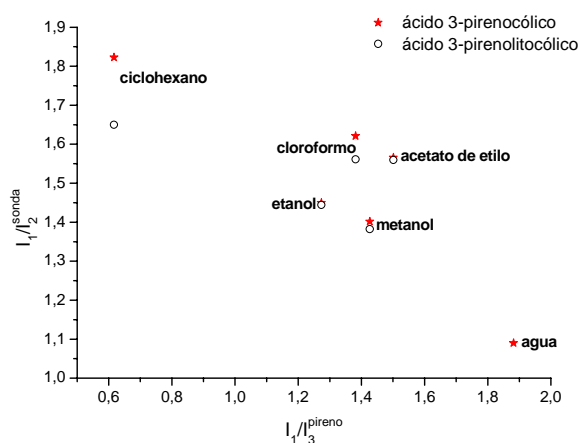


Figura IV.15.- Representación de la relación  $I_1/I_2$  para las nuevas sondas vs la relación  $I_1/I_3$  del pireno para diversos disolventes.

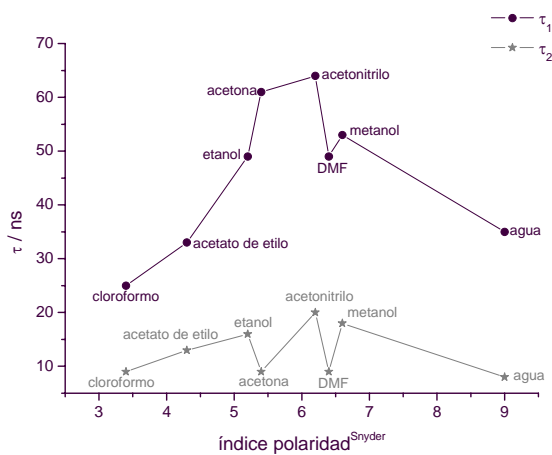
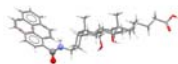


Figura IV.16.- Representación de los dos tiempos de vida del ácido 3-pirenocólico vs los índices de polaridad.<sup>7</sup>



**Tabla IV.8.-** Rendimiento cuántico y tiempos de vida del componente fluorescente mayoritario del pireno y de algunos derivados en diclorometano desoxigenado a temperatura ambiente.<sup>6</sup> †Los errores máximos estimados en los rendimientos cuánticos son ±10% del valor citado. ††Excitado a 361nm y observado a 400 nm. Los errores son ±1 ns para los tiempos de vida mayores que 100 ns, y ±0,2 ns para los tiempos de vida menores que 100 ns.

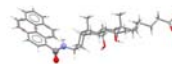
Compuesto	$\Phi_f^\dagger$	$\tau/ \text{ns}^{\dagger\dagger}$
Py	0,41	167
Py-COOH	0,75	5,3
Py-CO-NH-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,64	<b>32,4</b>
Py-CO-NH-Leu-OMe	0,70	20,3

A partir de la relación de energía de la minimización de las estructuras de los dos conformeros del ácido 3-pirenocólico se realizó un cálculo aproximado del porcentaje de ambos a partir de la ecuación de distribución de Boltzmann (ecuación IV.1). Para ello se empleó el programa Gaussian 03<sup>N</sup> utilizando como base de cálculo el modelo PM3 (Parametric Method 3) semi-empírico.

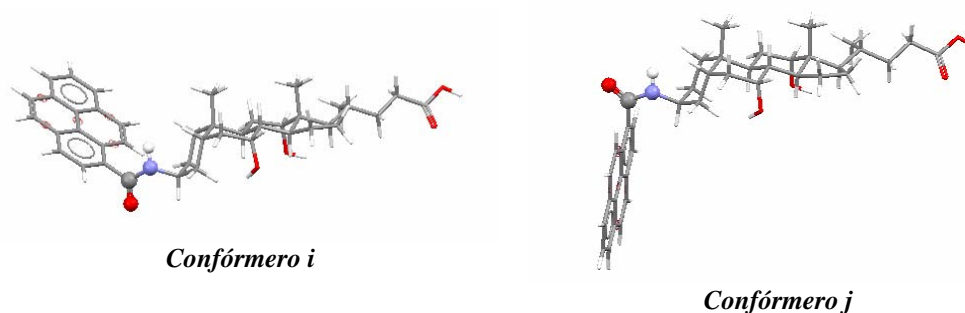
$$\frac{N_i}{N_j} = e^{-(E_i - E_j)/kT} \quad \text{[IV.1]}$$

La figura IV.17 muestra las estructuras minimizadas de los conformeros del ácido 3-pirenocólico. Los cálculos condujeron a un mayor porcentaje (=88%)

<sup>N</sup>Gaussian 03, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.



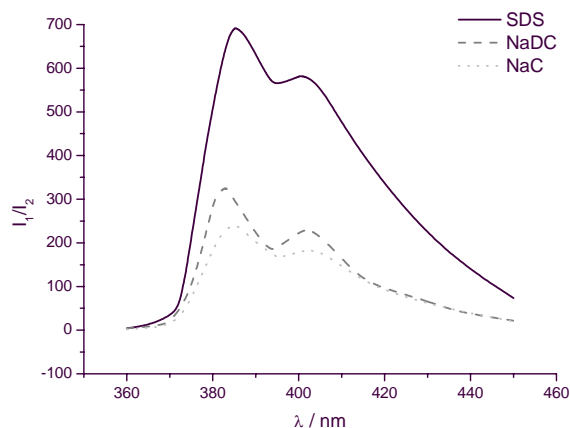
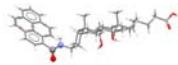
del conformero “i”, mientras que el conformero “j” se encuentra en un 12%. Aunque este cálculo representa un dato simbólico, esta relación presenta bastante concordancia con el porcentaje de los tiempos de vida de cada uno de ellos.



**Figura IV.17.-** Estructuras minimizadas de los conformeros de la estructura ácido 3-pirenocólico.

#### ***Caracterización de la sonda fluorescente ácido 3-pirenolitoicólico en algunos sistemas micelares convencionales***

También se ha investigado el comportamiento de las nuevas sondas fluorescentes en tensioactivos convencionales como el dodecilsulfato sódico (SDS) y el bromuro de cetilpiridinio (CTAB), así como en ácidos biliares de características bien conocidas como el colato sódico (NaC) y el desoxicolato sódico (NaDC). Nos hemos centrado en el ácido 3-pirenolitoicólico debido a que no existe ningún grupo hidroxilo en la unidad esteroide, por lo que debe ser una sonda más hidrófoba que la del ácido 3-pirenocólico, y por lo tanto tendrá mayor tendencia a incorporarse en la región más hidrófoba de las micelas, esto es, en su corazón. La *figura IV.18* muestra los espectros de emisión fluorescente del ácido 3-pirenolitoicólico solubilizado en estos sistemas. La solubilización de la sonda en la disolución micelar fue llevada a cabo como sigue: en primer lugar, se prepara una disolución patrón de la sonda en etanol (disolvente con bajo punto de ebullición y en el que es muy soluble); a continuación, se añade un volumen exactamente conocido de la disolución patrón en el vial en el que se va a preparar la suspensión micelar previa evaporación del disolvente, de modo que la concentración final de la sonda sea aproximadamente 8  $\mu\text{M}$ .



**Figura IV.18.-** Espectros de emisión de fluorescencia del ácido 3-pirenolítico 7,835  $\mu\text{M}$  solubilizado en disoluciones de SDS, NaDC, NaC.  $\lambda_{\text{exc.}}=342$  nm.  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Relación sonda: tensioactivo 1:22000.

Los valores de la relación de intensidades de las bandas de vibración 1 y 3 para el monómero del pireno ( $I_1/I_3$ ) y la relación  $I_1/I_2$  del ácido 3-pirenolítico en diferentes sistemas micelares (*tabla IV.9*), muestran claramente que estos tensioactivos proporcionan un microambiente apolar a la sonda, apantallándola del agua.<sup>19</sup> De los datos recogidos en la *tabla IV.9* y el gráfico de la *figura IV.14*, se puede apreciar que la nueva sonda indica la existencia de un microentorno más polar del que se deduce a partir de la fluorescencia del pireno, pero se mantiene la misma pauta de polaridad en los tensioactivos en los que se ha caracterizado. Para el pireno solubilizado en micelas de NaDC, la relación  $I_1/I_3$ , aproximadamente 0,7, es similar a la del ciclohexano. Sin embargo, el ácido 3-pirenolítico acerca la polaridad del entorno de la sonda hacia el valor del cloroformo. La misma pauta se observa para el NaC, que cambia de 2 a 6 (valores del índice de polaridad de Snyder), respectivamente cuando se solubiliza pireno o ácido 3-pirenolítico. Para el SDS hay un cambio de 5 a 8, respectivamente; y para el CTAB, aunque existe un menor cambio, también varía de 6 a 7. En la sonda derivada del ácido pirenocarboxílico, el residuo pirenilo se encuentra unido a una molécula con requerimientos estéricos propios lo que puede hacer que la molécula de pireno no penetre en el interior de la micela, o bien, que ésta sufra una ruptura parcial haciendo que el pireno presente cierto contacto con moléculas de agua.



## Capítulo IV

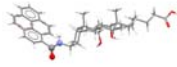
**Tabla IV.9.-** Datos para la relación de intensidades de las bandas de vibración más afectadas por el entorno de la sonda,  $I_1/I_3$ <sup>†</sup> para el pireno y  $I_1/I_2$ <sup>\*</sup> para el ácido 3-pirenohitocólico. <sup>‡</sup>Medidas experimentales a 25°C; <sup>§</sup>referencia bibliográfica<sup>5</sup> a 25°C; <sup>+</sup>referencia bibliográfica<sup>3</sup> a 25°C. Los datos recogidos en la tabla resumen las experiencias realizadas excitando a una longitud de onda de 336 nm cuando la sonda utilizada era pireno, y 342 nm cuando se trataba del ácido 3-pirenohitocólico.

Tensioactivo	$I_1/I_3$ <sup>†</sup>	$I_1/I_2$ <sup>*</sup>
SDS	1,24 <sup>‡</sup>	1,199 <sup>‡</sup>
CTAB	1,41 <sup>+</sup>	1,325 <sup>‡</sup>
NaDC	0,66-0,80 <sup>§</sup>	1,590 <sup>‡</sup>
NaC	0,72-0,86 <sup>§</sup>	1,327 <sup>‡</sup>

Los valores de  $I_1/I_2$  también muestran que el carácter polar del microambiente de la sonda es mayor en el NaC que en el NaDC, lo que puede estar relacionado con el mayor carácter hidrófilo del cuerpo esteroide que contiene tres grupos OH en el caso del colato sódico y sólo dos en el desoxicolato. La naturaleza del grupo iónico también parece jugar un papel importante, ya que el SDS es el que muestra una relación más pequeña.

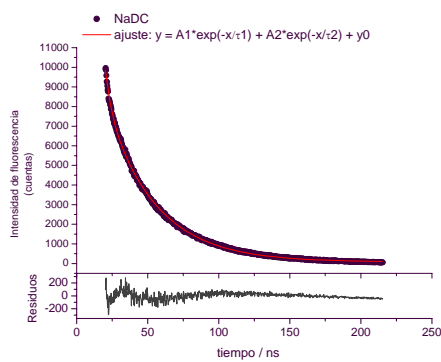
En la *tabla IV.10* se resumen los valores de la relación  $I_1/I_2$  y los tiempos de vida del ácido 3-pirenohitocólico en disoluciones micelares de SDS, CTAB, NaC y NaDC obtenidos a partir de un ajuste multiexponencial de los decaimientos de fluorescencia experimentales, así como el porcentaje en peso de cada uno. En la *tabla IV.8* recogíamos que el tiempo de vida medio de la sonda Py-CO-NH-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> en diclorometano es de 32,4 ns, valor muy próximo al del ácido 3-pirenohitocólico solubilizado en NaC.

En la *figura IV.19* se representan gráficamente los decaimientos de fluorescencia del ácido 3-pirenohitocólico para una relación sonda/SDS (CTAB, NaDC o NaC) de 1:22000, junto con el ajuste calculado por deconvolución con el perfil de la lámpara experimental. Se puede comprobar que una simple exponencial ajusta los datos experimentales del SDS, mientras para el NaDC, NaC y el bromuro de cetilpiridinio es necesario introducir una segunda exponencial que asegure un valor de  $\chi^2$  aceptable.

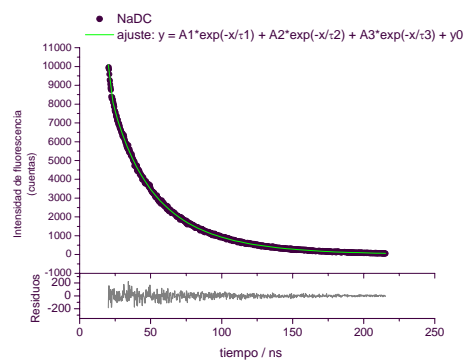


**Tabla IV.10.-** Tiempos de vida,  $\tau$ , y relación  $I_1/I_2$  del ácido 3-pirenilotocólico en diferentes sistemas. Valores obtenidos a partir del análisis multiexponencial de los decaimientos experimentales realizados a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$  y excitando a 342 nm.  $\dagger$ Sonda utilizada: ácido 3-pirenilotocólico;  $\dagger\dagger$ relación sonda/tensioactivo convencional 1:22000.

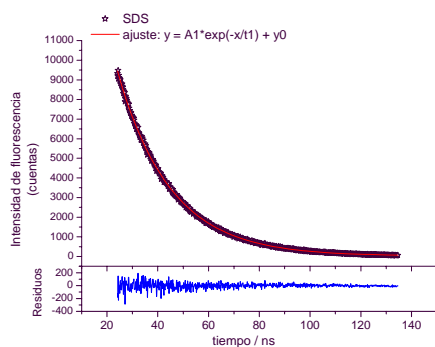
Tensioactivo	$I_1/I_2^\dagger$	$\tau_1/\text{ns}$	$\tau_2/\text{ns}$	$\tau_3/\text{ns}$	Rel.%	Rel.%	Rel.%	$\chi^2$
$\dagger\dagger$ SDS	1,199	<b>20,79</b>			100,00			1,102
$\dagger\dagger$ CTAB	1,325	<b>8,99</b>	<b>5,70</b>		19,22	80,78		1,147
$\dagger\dagger$ NaC	1,327	<b>30,62</b>	<b>16,27</b>	2,69	39,84	50,41	9,76	0,983
$\dagger\dagger$ NaDC	1,590	<b>42,61</b>	<b>16,96</b>	0,91	78,77	18,85	2,39	1,015



(a)



(b)



(c)

**Figura IV.19.-** Decaimiento de fluorescencia y porcentaje de residuos del ácido 3-pirenilotocólico en desoxicolato sódico (a) y (b) y en dodecilsulfato sódico (c). Datos experimentales recogidos a 342 nm y a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Relación sonda/esteroide 1:22000.



## Capítulo IV

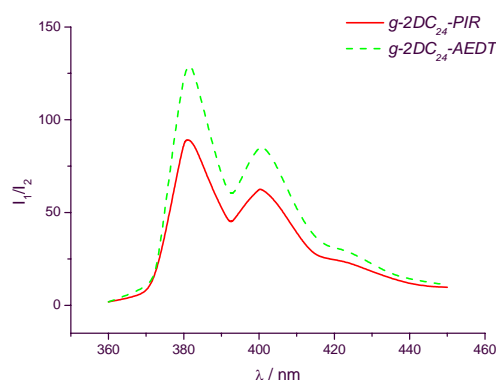
Para el NaDC, y aun más notoriamente para el NaC, los tiempos de vida media de la sonda son muy similares a los obtenidos en agua, lo que sugiere un contacto sonda-agua. Para el caso del SDS, no se observa el segundo tiempo de vida medio, que como ya se ha comentado anteriormente, aparece por la existencia de dos conformeros. De algún modo, en este caso, uno de los conformeros debe verse muy estabilizado frente al otro. También se puede apreciar que los valores obtenidos para el CTAB no se corresponden con los obtenidos para los diferentes disolventes, pues son valores inferiores. En este caso puede ser debido al ion  $\text{Br}^-$  que actúa de quencher.<sup>3,20</sup>

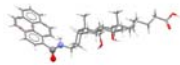
Gracias al estudio previo realizado en diferentes disolventes se puede descartar que la presencia de dos tiempos de vida media sea consecuencia de múltiples situaciones de la sonda en la micela, ya que se podría suponer, por ejemplo, que la sonda se acomodara en el interior de la micela o bien fuera de la misma. También se descarta la presencia de impurezas en los surfactantes de partida que pudieran actuar como quencher (excepto el propio ion  $\text{Br}^-$  en el caso del CTAB). El tercer tiempo de vida media se puede asimilar como luz difusa por su bajo valor y por el pequeño porcentaje que representa.

### Nuevas sondas fluorescentes en sales biliares modificadas

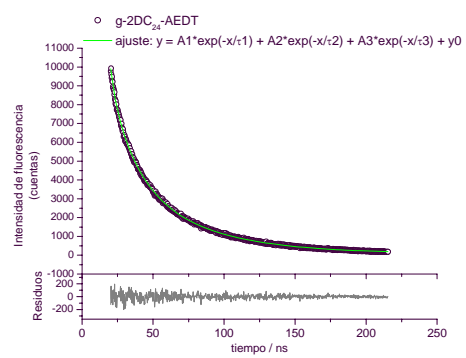
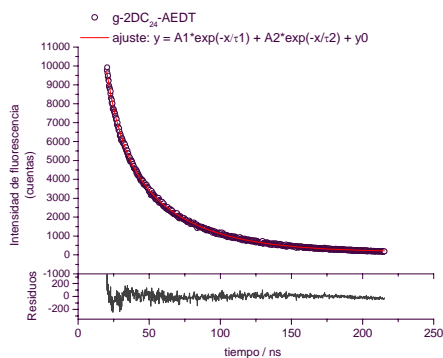
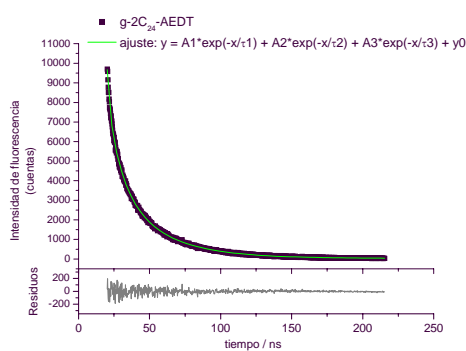
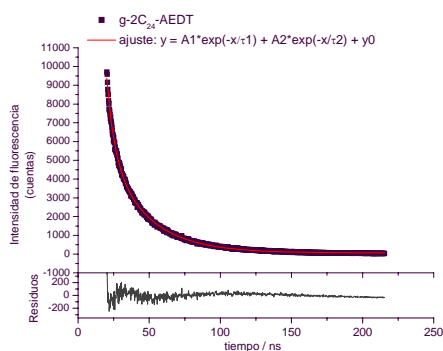
El siguiente paso fue la caracterización de las nuevas sondas fluorescentes en derivados de sales biliares, los *gémmini* derivados del 24-aminocólico y desoxicólico (los *gémmini*  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-AEDT}$  y  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$ , y los  $g\text{-}2\text{C}_{24}\text{-AEDT}$  y  $g\text{-}2\text{C}_{24}\text{-PIR}$ , *vide infra*). En la *figura IV.20* aparecen representados los espectros de emisión del ácido 3-pirenilitocólico solubilizado en dos de estos sistemas.

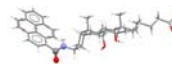
**Figura IV.20.-** Espectros de emisión de fluorescencia del ácido 3-pirenilitocólico solubilizado en disoluciones de  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-AEDT}$  y  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$ .  $\lambda_{\text{exc.}}=342$  nm.  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .



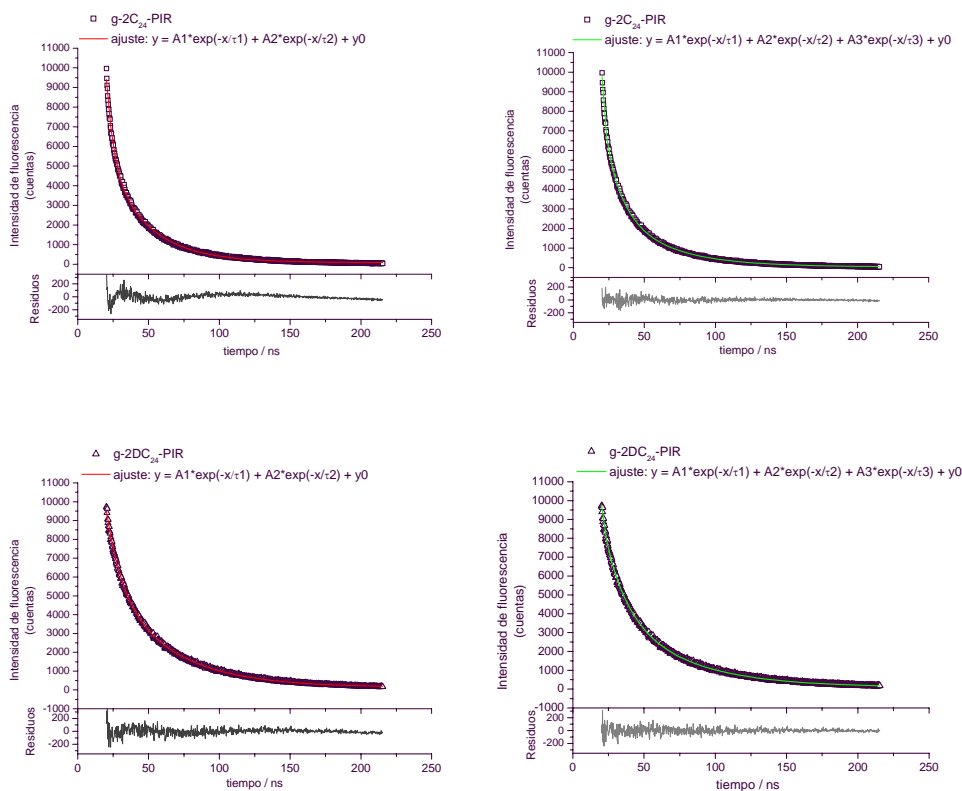


La *figura IV.21* muestra algunos ejemplos de los decaimientos de fluorescencia del ácido 3-pirenilotrocólico para una relación sonda/*gemini* de 1:5000 a 25°C junto con el ajuste calculado por deconvolución con el perfil de la lámpara experimental. La *tabla IV.12* muestra los valores de la relación  $I_1/I_2$ , así como los tiempos de vida obtenidos a partir del ajuste multiexponencial y el porcentaje en peso de cada uno de ellos.



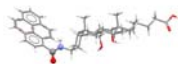


## Capítulo IV



**Figura IV.21.-** Decaimiento de fluorescencia y porcentaje de residuos del ácido 3-pirenolítico en diferentes sistemas. Datos experimentales recogidos a 342 nm y a  $T=25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Relación sonda/ *gemini* 1:5000.

Al representar los valores promedio de  $I_1/I_2$  obtenidos con ambas sondas en los cuatro *gemini* (que serían respectivamente 1,23 cuando la sonda empleada fue el ácido 3-pirenocólico y  $1,37 \pm 0,10$  cuando se utilizó el ácido 3-pirenolítico) en la gráfica de la *figura IV.11*, se observa que estas coordenadas se desvían considerablemente de la línea recta obtenida a partir de los puntos experimentales en los distintos disolventes. Anteriormente se dijo que el residuo biliar no parecía tener influencia en el comportamiento del grupo pirenilo, sin embargo, esta aparente



anomalía parece indicar que las sondas se ubican en entornos diferentes debido a la naturaleza del residuo biliar. De un modo cualitativo se observó que la solubilidad del ácido 3-pirenocólico en agua es mayor que la del ácido 3-pirenolitocólico, lo que repercutiría en una mayor afinidad del primero hacia el medio acuoso, y la del segundo hacia disolventes menos polares. Por lo tanto, es posible que, comparativamente, la sonda ácido 3-pirenocólico tenga menos tendencia a incluirse en el seno de los agregados que el ácido 3-pirenolitocólico. Además, como veremos en el capítulo siguiente, la naturaleza de los agregados formados por los distintos *gemi* es también diferente. Por este motivo, sería prematuro proponer conclusiones definitivas a la luz de la disparidad de los valores de los tiempos de vida. En definitiva, consideraremos que las nuevas sondas sintetizadas pueden ser utilizadas para la determinación correcta de la polaridad microambiental donde se encuentran ubicadas pero su utilización en sistemas más complejos requiere de investigaciones en un mayor número de sistemas de referencia básicos.

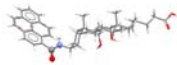
**Tabla IV.12.-** Tiempos de vida,  $\tau$ , y relación  $I_1/I_2$  para las dos sondas fluorescentes a bajas concentraciones en diferentes sistemas surfactantes obtenidos a partir del análisis multiexponencial de los decaimientos experimentales.  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{exc.}}=342\text{ nm}$ . †relación sonda /*gemi* 1:5000.

	$I_1/I_2$	$\tau_1/\text{ns}$	$\tau_2/\text{ns}$	$\tau_3/\text{ns}$	Rel.%	Rel.%	Rel.%	$\chi^2$
<b>Ácido 3-pirenocólico</b>								
† <i>g-2C<sub>24</sub>-AEDT</i>		45,05	13,55	3,56	40,00	34,69	24,29	1,009
† <i>g-2DC<sub>24</sub>-AEDT</i>	1,2062	80,63	24,13	6,41	39,68	45,53	14,78	1,074
† <i>g-2DC<sub>24</sub>-PIR</i>	1,2352	80,99	24,84	7,09	55,42	39,49	5,09	1,038
<b>Ácido 3-pirenolitocólico</b>								
† <i>g-2C<sub>24</sub>-AEDT</i>	1,3983	44,15	16,14	2,06	48,76	43,95	7,29	1,328
† <i>g-2DC<sub>24</sub>-AEDT</i>	1,4629	56,31	18,29	1,81	70,22	27,57	2,21	1,058
† <i>g-2DC<sub>24</sub>-PIR</i>	1,3882	66,81	20,72	2,09	59,81	37,36	2,83	1,289
† <i>g-2C<sub>24</sub>-PIR</i>	1,2323	52,97	16,55	2,08	48,10	44,21	7,68	1,268



## BIBLIOGRAFÍA

1. Sanz Pedrero, P. *Fisicoquímica Para Farmacia y Biología* **1992**, Ed. Masson-Salvat Medicina, Barcelona, 168.
2. Fletcher, K. A.; Storey, I. A.; Hendricks, A. E.; Pandey, S.; Pandey, S. *Green Chemistry* **2001**, *3*, 210-215.
3. Lianos, P.; Viriot, M. L.; Zana, R. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 1098-101.
4. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 161-164.
5. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*, 1789-93.
6. Yao, C.; Kraatz, H.-B.; Steer, R. P. *Photochemical & Photobiological Sci.* **2005**, *4*, 191-199.
7. Reichardt, C. *Solvent Effects in Organic Chemistry* **1979**, Verlag Chemie, Weinheim.
8. Somerharju, P. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116*, 57-74.
9. Holzinger, F.; Schteingart, C. D.; Ton-Nu, H.-T.; Eming, S. A.; Monte, M. J.; Hagey, L. R.; Hofmann, A. F. *Hepatology* **1997**, *26*, 1263-1271.
10. Schneider, S.; Schramm, U.; Schreyer, A.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1755-67.
11. Schramm, U.; Dietrich, A.; Schneider, S.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1769-79.
12. Schramm, U.; Fricker, G.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 741-57.
13. Maitra, U.; Vijay Kumar, P.; Chandra, N.; D'Souza, L. J.; Prasanna, M. D.; Raju, A. R. *Chem. Commun.* **1999**, 595-596.
14. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13679-13681.
15. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J.; Galantini, Luciano; Pavel, N. V. *Adv. Mater. En imprenta*.
16. Martins, J.; Vaz, W. L. C.; Melo, E. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1889-95.



17. Martins, J.; Melo, E. *Biophysical Journal* **2001**, *80*, 832-840.
18. Karpovich, D. S.; Blanchard, G. J. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3951-8.
19. Zana, R.; Güveli, D. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1687-90.
20. Vethamuthu, M. S.; Almgren, M.; Mukhtar, E.; Bahadur, P. *Langmuir* **1992**, *8*, 2396.
21. Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-5.

*CAPÍTULO V.- NUEVOS SURFACTANTES GEMINI  
DE SALES BILIARES*

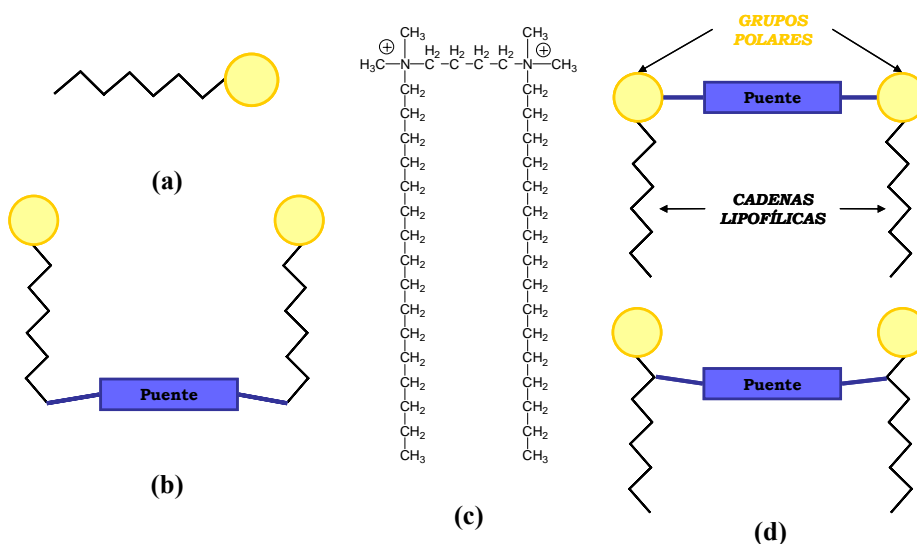
---





## V.1.-INTRODUCCIÓN

A diferencia de los tensioactivos convencionales, que contienen una o dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un mismo grupo polar, los tensioactivos *gemini* constituyen una familia caracterizada por presentar por lo menos dos cadenas hidrocarbonadas y dos grupos hidrófilos o polares (*figura V.1*). La primera síntesis de tensioactivos gemelos convencionales fue anunciada en 1971 por Bunton *et al*<sup>1</sup> quienes los bautizaron como *detergentes dicatiónicos* y los utilizaron como catalizadores de ciertas reacciones de sustitución nucleófila. Estas sustancias fueron renombradas sucesivamente como tensioactivos bis-amonio cuaternarios,<sup>2</sup> tensioactivos diméricos,<sup>3</sup> tensioactivos *gemini*<sup>1</sup> y tensioactivos siameses.<sup>4</sup>



**Figura V.1.-** (a) Estructura básica de un surfactante típico. (b) Estructura de un surfactante dimérico no *gemini*. (c) Fórmula del catión de amonio cuaternario de uno de los primeros tensioactivos *gemini* sintetizados. (d) Dos esquemas de la estructura de un surfactante *gemini*.

Más concretamente, la definición de un *gemini* abarca:

- a) Todos los *gemini* poseen al menos dos cadenas hidrófobas y dos grupos iónicos o polares (véase la *figura V.1*).

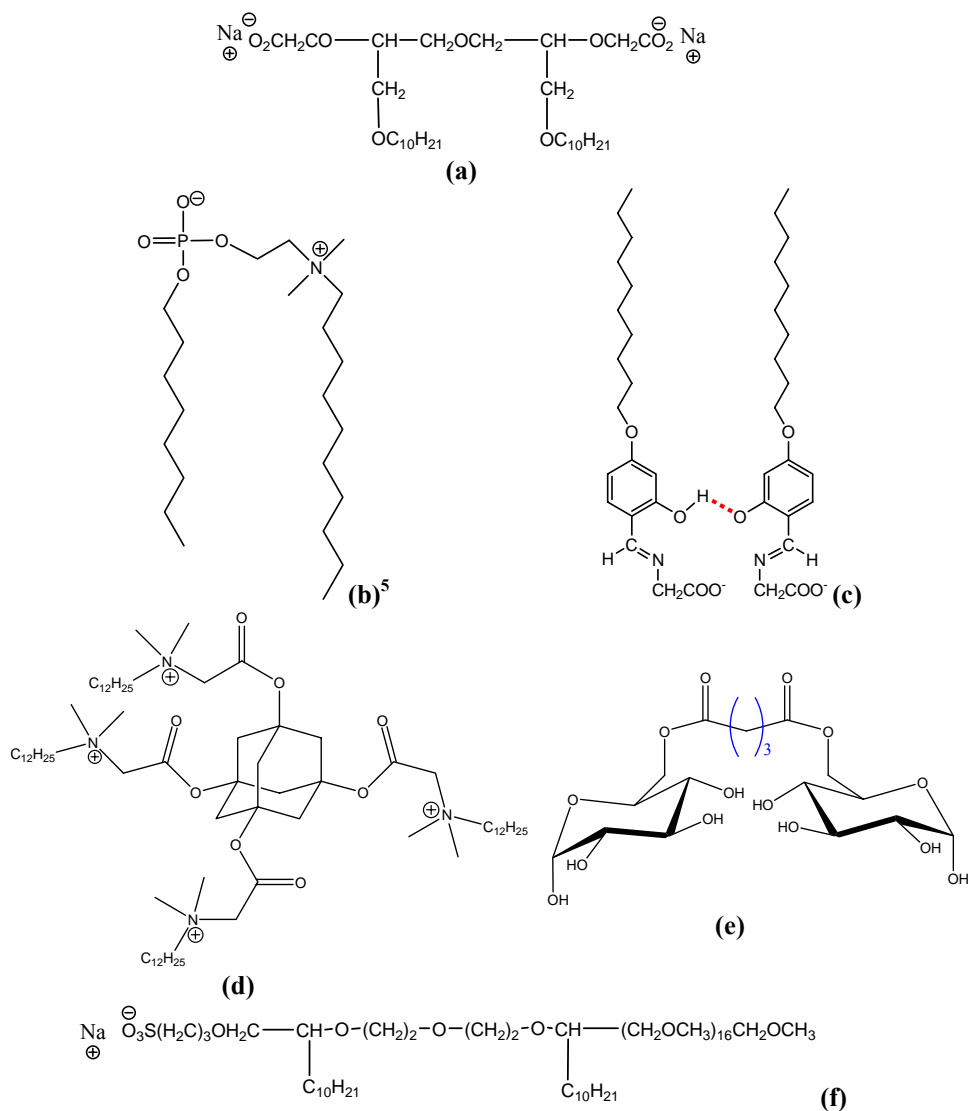


- b) El puente\* puede ser corto (dos grupos metileno) o largo (12 grupos metileno); rígido (benceno) o flexible (cadena de metilenos); polar (poliéter) o no polar (alifático, aromático) y une las cabezas polares o átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada próximos a ellas (véase la *figura V.1.d*). El puente puede estar situado al mismo nivel de los grupos polares o muy próximo a ellos.
- c) El grupo polar puede ser positivo (amonio), negativo (fosfato, sulfato, carboxilato), no iónico (poliéter, azúcar) o zwitteriónico.<sup>5</sup> La mayor parte de los tensioactivos gemelos poseen moléculas simétricas, es decir, con los grupos polares iguales y los mismos grupos no polares. Sin embargo, también se han sintetizado tensioactivos gemelos con distintos grupos polares<sup>6</sup> y con cadenas hidrocarbonadas diferentes.<sup>7</sup>

A los tensioactivos *gemini* que poseen moléculas simétricas se los suele simbolizar como *m-s-m*, donde *m* es el número de átomos de carbono de cada cadena hidrocarbonada (grupo no polar) y *s* es el número de átomos de carbono del grupo puente; mientras que a los asimétricos se los representa como *m-s-n*. También se clasifican como *gemini*, los surfactantes trímeros, que poseen tres cadenas lipófilas y tres grupos polares<sup>8</sup> (se representan como *m-n-m-n-m*), y los tetrámeros (*m-n-m-n-m-n-m*), con cuatro grupos de cada tipo.<sup>9</sup>

---

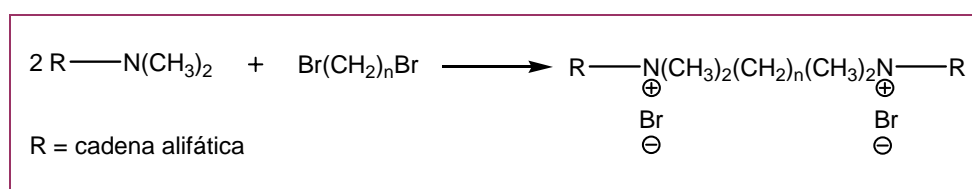
\*En el trabajo pionero de Bunton *et al*<sup>1</sup>, a la cadena hidrocarbonada corta que actúa como puente se la nombra, en inglés, como *bridging group*, ya que une a las dos partes del tensioactivo, cada una de las cuales está constituida por un grupo polar, en este caso un catión, y una cadena lipofílica. Sin embargo, en publicaciones posteriores y hasta la actualidad, al grupo que actúa como puente se le llama *spacer*, que en inglés significa separador o espaciador. La traducción como separador no parece la más adecuada debido a que esta cadena une, y no separa, dos partes de una misma molécula. En cuanto a la otra acepción, espaciador, en nuestro idioma está confinada a la tecla de las máquinas de escribir y de los ordenadores y se utiliza para los espacios en blanco. Por esta razón, sería más adecuado denominarlo como “puente” o “grupo puente”.



**Figura V.2.-** Algunos ejemplos de surfactantes *gemini* sintetizados hasta la actualidad: **(a)** *gemini* aniónico;<sup>10</sup> **(b)** *gemini* Zwitterionico; **(c)** “Pseudo-*gemini*” obtenido en disolución utilizando puentes de hidrógeno entre dos grupos hidroxilo;<sup>11</sup> **(d)** *gemini* catiónico tetramérico<sup>12</sup>; **(e)** *gemini* no iónico<sup>13</sup>; y **(f)** *gemini* asimétrico.<sup>14</sup> En definitiva pueden ser tan complejos como un investigador sea capaz de diseñar o su ambición (y los medios) se lo permitan.



La síntesis de estos nuevos surfactantes se basa, a grandes rasgos, en acoplamiento teóricamente sencillos mediante enlaces amina, amida, éster, éter, fosfato... entre los grupos funcionales del puente y los surfactantes convencionales tal y como se muestra en el esquema de la *figura V.3*. En algunos casos, la parte polar del surfactante (cabeza) debe ser modificada para poder ser acoplado a un determinado puente. En el proceso de síntesis del nuevo compuesto, debe prestarse especial atención a la *purificación* del mismo, siendo éste un paso crítico ya que la presencia de impurezas puede cambiar la actividad superficial del nuevo surfactante.



**Figura V.3.-** Esquema de síntesis de un *gemini* catiónico simple.<sup>10</sup>

La *cmc* de los tensioactivos *gemini* es menor que la de los tensioactivos ordinarios en uno o dos órdenes de magnitud.<sup>15</sup> Así, por ejemplo, mientras que la *cmc* del bromuro de dodeciltrimetilamonio a temperatura ambiente es igual a 16 mM, la del *gemini* constituido por dos unidades de bromuro de dodecildimetilamonio unidas por un puente formado por 16 grupos metileno es de sólo 0,12 mM, es decir, 130 veces menor. Una de las posibles razones de esta disminución en el valor de la *cmc* es que se ha encontrado que hay un mayor empaquetamiento de los grupos hidrófobos de los *gemini* en la interfase aire-agua con respecto a los surfactantes convencionales. La elevada actividad superficial que presentan estos tensioactivos se traduce en que se necesita menos cantidad de los mismos para mejorar las funciones del original. Debido a su baja *cmc*, los *gemini* producen menos irritación en la piel, ya que esta característica depende de la concentración del tensioactivo no asociado en micelas.<sup>9</sup> En general, también podemos decir que los surfactantes aniónicos suelen presentar valores de *cmc* algo inferiores a sus homólogos catiónicos.<sup>15</sup>

El valor de la *cmc* decrece a medida que se incrementa la longitud de la cadena no polar debido a que en ese sentido se ve incrementado lo que se conoce como efecto hidrófobo.<sup>16,17</sup> Además, los valores de *cmc* no son sensibles a la



polaridad de los puentes cortos, entre 2 y 8 átomos, pero si se ven afectados por un puente largo de, por ejemplo, 16 grupos metileno. Un puente largo contribuye a la hidrofobia del *gemini*, reduciendo la solubilidad del monómero y mejorando su tendencia a autoensamblarse.

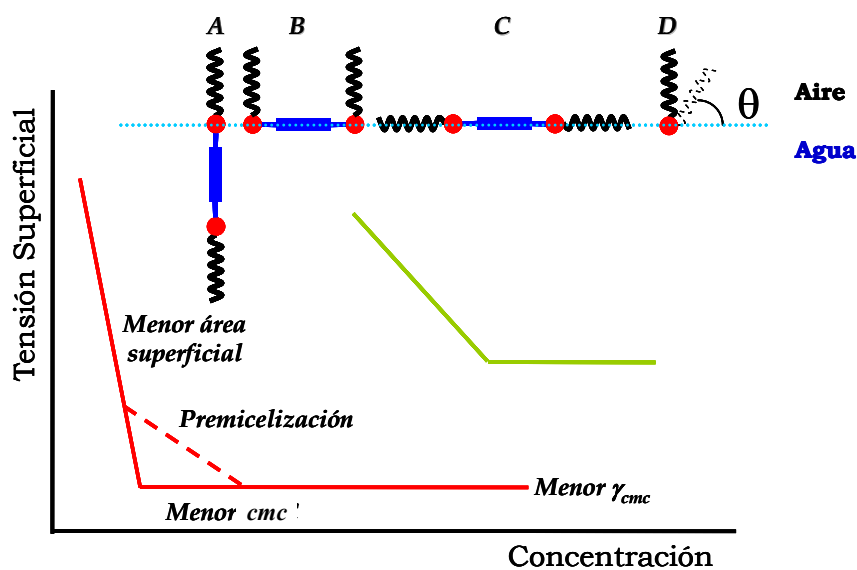
Debido al alto coste que representa su síntesis, para muchas aplicaciones, los surfactantes *gemini* se usan en sistemas mixtos con surfactantes convencionales. Los surfactantes *gemini* interactúan preferentemente con surfactantes neutros o de carga opuesta. La posible existencia de efectos sinérgicos entre el surfactante convencional y el *gemini* pueden hacer incluso más atractivo su uso. Hay estudios que se centran en la búsqueda de esos efectos sinérgicos respecto a la micelización,<sup>18</sup> la formación de la monocapa en la interfase aire-agua,<sup>19</sup> o bien en su forma de agregación. Así, por ejemplo, el 12-2-12 2Br<sup>-</sup> da lugar a micelas alargadas mientras que con la adición de una fracción molar de 0,3 de CTAB estas micelas se transforman en esféricas.<sup>20</sup>

La tensión superficial del agua (72 mN/m) se ve reducida a 30-40 mN/m cuando la concentración de surfactante alcanza su valor de *cmc*. Los tensioactivos *gemini* poseen una capacidad para disminuir la tensión superficial del agua que es hasta tres órdenes de magnitud superior a la de los tensioactivos ordinarios. Una forma de cuantificar esta característica consiste en determinar la concentración del tensioactivo que produce una disminución de la tensión superficial del agua igual a 20 mN/m, *C20*. A 25°C, este valor representa un descenso del 28%. Para el dodecilsulfato de sodio, esta concentración es igual a 4,4 mM, mientras que para ciertos tensioactivos *gemini* aniónicos, que poseen dos grupos sulfato está comprendida entre 0,0065 y 0,01 mM. En los tensioactivos *gemini*, cuando el grupo que actúa como puente es pequeño o hidrófilo, el acomodamiento de los grupos lipófilos en la interfase aire-agua es más compacto que en los tensioactivos convencionales y, por lo tanto, la concentración del tensioactivo en esa interfase es mayor, lo que causa una mayor disminución de la tensión superficial. El acomodamiento más compacto de las moléculas o iones de los tensioactivos *gemini* reduce películas interfaciales más estables, lo que se traduce en una mayor estabilidad de emulsiones<sup>21</sup> y de espumas. Por esta razón, para obtener emulsiones estables, se utilizan en concentraciones muy bajas, del orden del 0,1%. Otra consecuencia del mejor acomodamiento molecular o iónico en la interfase es la mayor estabilidad de las vesículas preparadas con tensioactivos *gemini*.<sup>9</sup>

El área superficial, *a*, ocupada por un surfactante en la interfase aire-agua es una característica muy importante en la química de tensioactivos. Para surfactantes convencionales este valor disminuye con la longitud de la cadena hidrocarbonada, manteniendo su cabeza polar inmersa en el agua y su cola



extendida verticalmente hacia el aire en un cierto ángulo dependiendo de la tensión superficial, mientras que un surfactante *gemi*ni podría adoptar una conformación lineal o cerrada, como se muestra en la *figura V.4*. El valor aparente de  $a$  suele ser mucho menor de lo esperado debido a la formación de multicapas en la superficie<sup>22</sup> o bien puede suceder una preagregación produciendo un cambio en la pendiente. Cuando esto sucede no se puede obtener un valor cuantitativo de la pendiente de  $\gamma$ -LnC.

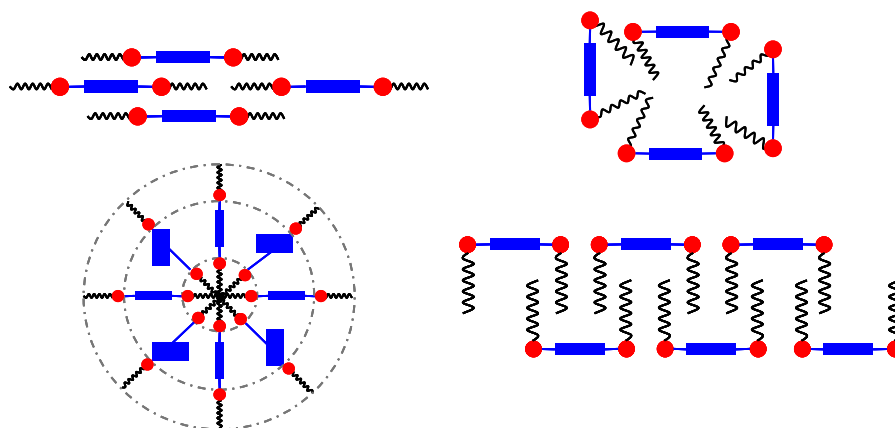


**Figura V.4.-** Comparación del comportamiento superficial de un surfactante *gemi*ni (—) y del surfactante monomérico de partida (---). Así mismo se indican las posibles configuraciones que pueden adoptar en la interfase.

Generalmente, en los tensioactivos ordinarios las formas geométricas que adquieren las micelas son esférica, elipsoidal y cilíndrica, aunque también se pueden producir otro tipo de agregados moleculares, tales como vesículas y bicapas.<sup>23,24</sup> Estas formas, que afectan a las propiedades reológicas de las dispersiones de tensioactivos, dependen tanto de la geometría molecular como de la temperatura, concentración, presencia de impurezas y fuerza iónica.<sup>25-27</sup> En los tensioactivos iónicos, la forma de las micelas también depende de la intensidad de la repulsión eléctrica entre los grupos polares.



La geometría de las micelas de los *gemini* es más complicada. Así, por ejemplo, mediante el ensayo de dispersión de neutrones a bajo ángulo, se demostró que las dispersiones acuosas de un tensioactivo *gemini* catiónico del tipo 16-3-16 estaban formadas por micelas discoidales en el intervalo de concentración comprendido entre 2,5 y 10 mM a 30°C, mientras que al calentarlas entre 45° y 70°C, estas micelas se transformaban en cilíndricas.<sup>26</sup> Empleando la misma técnica de estudio,<sup>27</sup> se demostró que la forma de las micelas también depende del número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada del puente. Así, para algunos *gemini* catiónicos, las micelas son discoidales cuando la cadena consta de tres grupos metileno, son cilíndricas cuando contienen cuatro y casi esféricas cuando poseen diez grupos metileno. Por otra parte, la morfología de los agregados de los *gemini* en medios polares puede ser de cuatro tipos diferentes dependiendo de la estructura de la molécula y su orientación, lo que en general implica un alto nivel de contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas (*figura V.5*).<sup>28</sup>

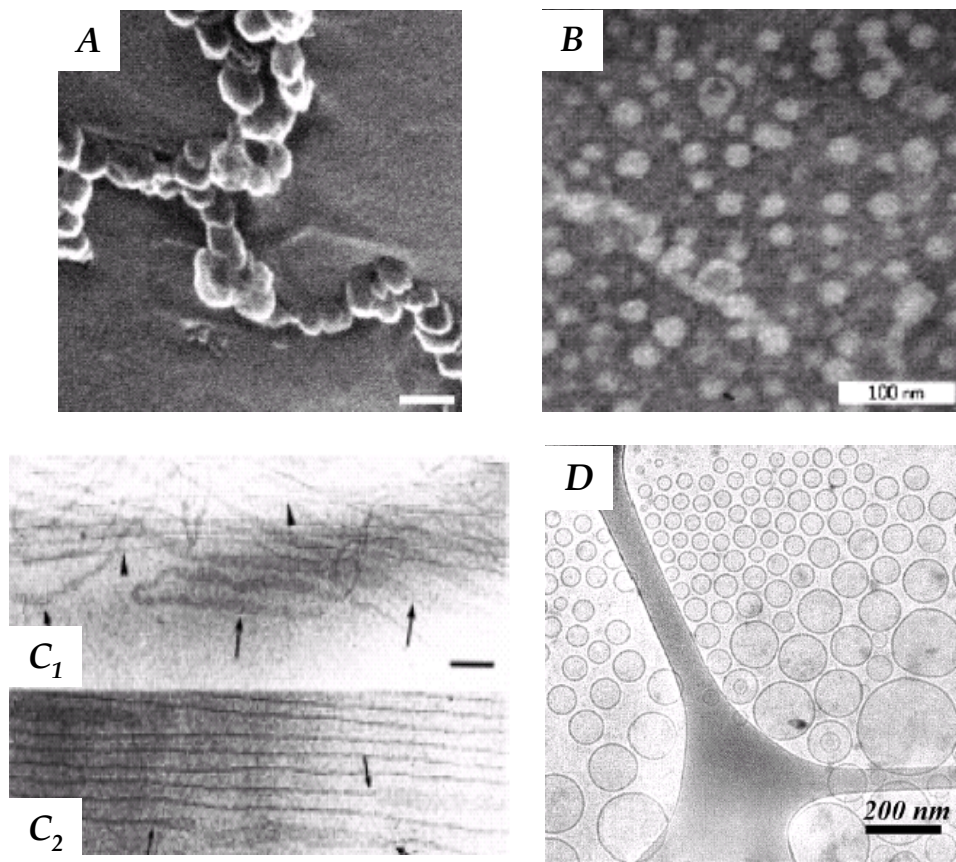


**Figura V.5.-** Posibles disposiciones de los surfactantes *gemini* en un medio polar como el agua.

Las dispersiones acuosas de algunos *gemini* con puentes formados por pocos átomos de carbono tienen viscosidades muy altas a concentraciones relativamente bajas (del orden del 1%). Estas dispersiones pueden ser viscoelásticas y también pueden manifestar viscoelasticidad inducida por un esfuerzo de corte, como el que se logra por simple agitación del recipiente en el cual están contenidas. Este comportamiento particular se debe a la formación de micelas vermiformes. Estas micelas son similares a las cilíndricas pero onduladas, y suelen ser muy largas y flexibles, con longitudes que alcanzan el micrómetro. Las



características viscoelásticas de sus dispersiones se deben a que estas largas micelas se enredan entre sí cuando son sometidas a un esfuerzo de corte.<sup>29</sup> Las micelas con forma de gusano se forman en dispersiones acuosas de *gemini* simétricos o casi simétricos. En definitiva, los agregados a los que estos nuevos compuestos dan lugar pueden resultar diferentes al surfactante monomérico original o pueden ser más complejos, tal y como se puede observar en la *figura V.6*.



**Figura V.6.-** (A) Imagen Crio-SEM de alta resolución de un *gemini* asimétrico 18-8 donde se muestra la conexión de vesículas,<sup>30</sup> barra 66,7 nm. (B) Imagen TEM de vesículas de 20-30 nm de diámetro de un *gemini* 12-12.<sup>5</sup> (C) Imagen Crio-TEM de un *gemini* asimétrico. En la imagen C<sub>1</sub> se puede observar la coexistencia de micelas alargadas (marcadas con la cabeza de flecha) y estructuras laminares (flechas largas), más visibles en la imagen C<sub>2</sub>,<sup>31</sup> barra 100 nm. (D) Imagen Crio-TEM de vesículas unilamelares de una muestra 4 mM de un *gemini* C<sub>8</sub>C<sub>4</sub>-2-C<sub>8</sub>C<sub>4</sub>.<sup>32</sup>



Los tensioactivos *geminis* con puentes hidrófilos se pueden utilizar en agua fría sin llegar a precipitar, debido a que poseen una baja temperatura de Kraft. Empleando tensioactivos *geminis* catiónicos con grupos puente polares se obtuvieron microemulsiones de estireno en agua que pudieron ser polimerizadas mediante radiación gamma. Los tensioactivos *geminis* catiónicos con contraiones quirales, tales como el L-tartrato, forman geles tanto en agua como en disolventes orgánicos. Estos sistemas están constituidos por cintas de bicapas de tensioactivo con forma de hélice.<sup>33</sup> Al igual que los tensioactivos convencionales formados por sales de amonio cuaternario, los *geminis* catiónicos de amonio cuaternario poseen propiedades antimicrobianas.<sup>9,34</sup> Se prepararon tensioactivos *geminis* no iónicos antimicrobianos, derivados de la lisina y de la arginina, que no son irritantes ni hemolíticos, lo que los hace adecuados en formulaciones cosméticas y farmacéuticas.<sup>9,33</sup>

Los surfactantes catiónicos muestran una elevada capacidad de unión a la cadena de ADN. Este complejo puede penetrar las membranas celulares, para después liberar el ADN en el citoplasma celular. En este sentido se ha encontrado, *in vitro*, que los surfactantes *geminis* poseen en muchos casos mejores propiedades, lo que ha abierto líneas de desarrollo de generación de vectores con esta finalidad.<sup>35</sup>

Para concluir esta introducción, mencionaremos algunos tensioactivos *geminis* derivados de sales biliares. Como tales se consideran los dímeros, trímeros, tetrámeros... cuyos grupos esteroide se unen a un grupo puente mediante la cadena alifática, como por ejemplo la posición 24. La unión por cualquiera de las posiciones del anillo, por ejemplo la posición 3, conduciría a los denominados dímeros, trímeros... de sales biliares. La primera síntesis de *geminis* de sales biliares fue realizada en 1977 por McKenna *et al.*,<sup>36,37</sup> (figura V.7.a) aunque no fue identificado como tal. Hay que tener presente que hasta 1991 no surgió el nombre de *geminis* como tal, dos décadas después de la primera síntesis de un *geminis* convencional. En principio, y que se tenga constancia de ello, el nombre de *geminis* de sal biliar surgió por primera vez en 2003,<sup>38</sup> otras dos décadas más tarde desde su síntesis.

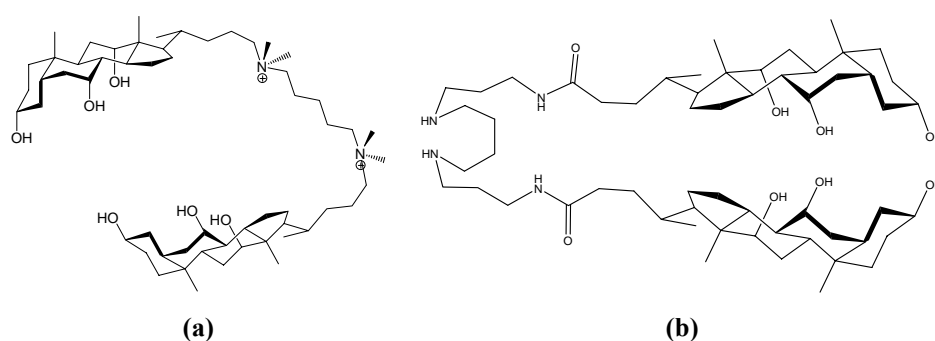
En la bibliografía se encuentran muchas referencias a dímeros con la estructura cabeza-puente-cabeza o cola-puente-cola,<sup>N</sup> siendo los primeros los verdaderos *geminis* de sales biliares. Muchos de los *geminis* de sales biliares son no iónicos, lo que limita su solubilidad en agua y explica la falta de datos

---

<sup>N</sup>Por cabeza se entiende la posición C24 del grupo carboxílico y por cola el anillo A, generalmente su posición C3.



fisicoquímicos, en cuanto a su número de agregación, *cmc*, área superficial, estructura micelar... Muchos han recibido el nombre de moléculas tipo *cleft* o tipo *paraguas*, por su capacidad de complejar moléculas en disolución. Del mismo modo, que ha ocurrido con los *gemini* convencionales, éstos no fueron sintetizados inicialmente con la finalidad de tensioactivo.



**Figura V.7.-** (a) Ejemplo de un dímero catiónico sintetizado en 1977 por McKenna *et al.*<sup>36</sup> Aunque nunca ha recibido el nombre de *gemini* se puede considerar en base a su estructura. (b) Primer derivado de sal biliar que recibe el nombre de *gemini*, pero no hay datos sobre sus propiedades fisicoquímicas, sólo se sabe que es un buen agente antibacteriano.

Es importante tener en cuenta que estos nuevos derivados presentan diferentes aplicaciones y que por lo general mejoran las propiedades que tendrían los monómeros de partida. El compuesto de la *figura V.7.a* es capaz de disolver la molécula aromática de perileno incluso en una región de concentraciones donde no hay agregación.<sup>37</sup> Los monoesteroides correspondientes sólo solubilizan las moléculas de perileno si se encuentran en forma micelar. Los monómeros catiónicos y los correspondientes dímeros abren un camino a una importante línea de investigación en el reconocimiento molecular del ADN.<sup>39</sup> Estos dímeros catiónicos interactúan electrostáticamente con los grupos fosfato del ADN, desplazando al catión sodio y posteriormente entran en juego las interacciones hidrofóbicas, haciendo que las micelas de estos compuestos produzcan una desestabilización de la doble hélice de ADN.<sup>40</sup>



Compuestos como el de la *figura V.7.b* presentan una capacidad antibacteriana mejorada respecto a sus monómeros de partida en al menos un orden de magnitud e incluso por debajo de su *cmc*.

Como ya hemos visto, las sales biliares naturales presentan propiedades tensioactivas y posibles modificaciones estructurales de las mismas pueden dar lugar a una mejora considerable de estas propiedades. La construcción de surfactantes *gemini* a partir de las sales biliares es la opción que se estudiará en este apartado. Aunque las sales biliares no poseen la estructura típica de agentes tensioactivos clásicos, se espera que, al igual que éstos, mejoren sus propiedades detergentes.

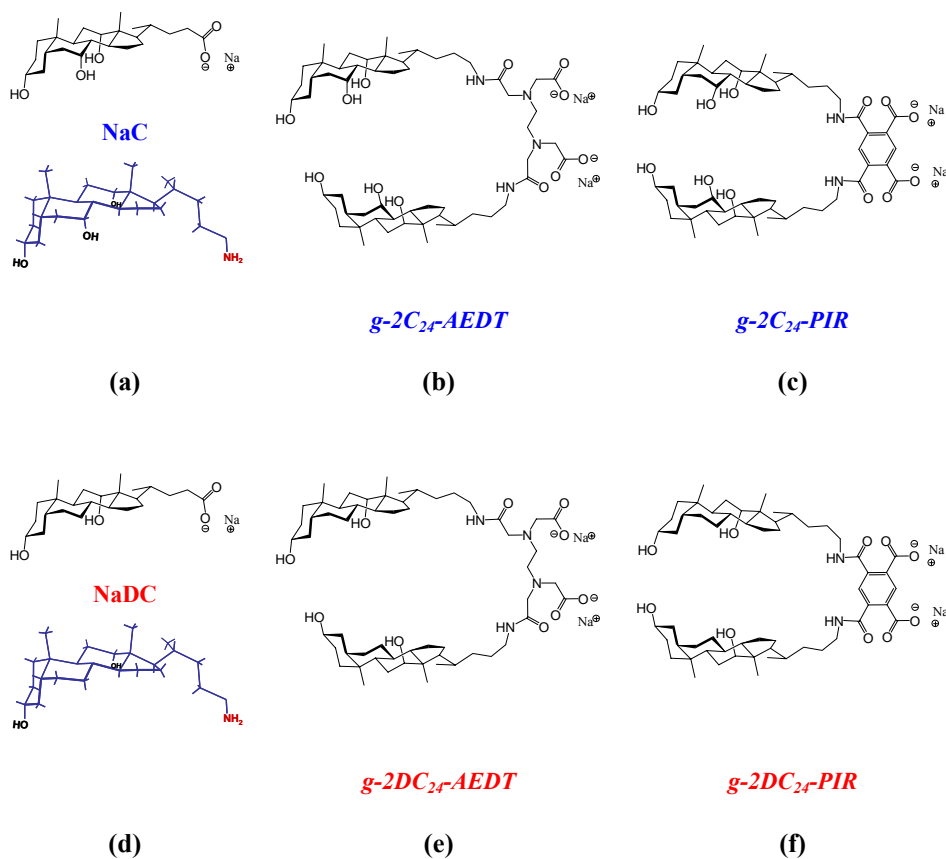
Los *gemini* objeto de estudio se han obtenido por unión, mediante enlaces amida, de las aminas derivadas de los ácidos cólico y desoxicólico, resultado de la sustitución del grupo carboxílico por un grupo amino (a las que abreviadamente denominaremos  $C_{24}$  y  $DC_{24}$ , respectivamente) a los puentes etilendiaminotetraacético (AEDT) o el ácido benceno-1,2,4,5-tetracarboxílico (ácido piromielítico) (*figura V.8*). La necesidad de la utilización de este tipo de puentes se debe a que la formación del enlace amida provoca la pérdida del grupo carboxílico que otorga solubilidad al esteroide. La presencia de cuatro grupos ácidos en el puente garantiza dos grupos remanentes susceptibles de convertirse en sal (*figura V.8*), algo que no sucede en la mayoría de los *gemini* de ácidos biliares presentes en la bibliografía. Por otra parte, además de la diferencia estructural entre el puente aromático rígido, piromielítico, y el puente alifático flexible, AEDT, tenemos que este último presenta dos nitrógenos en posición central hábiles a la protonación, dando lugar a posibles formas zwitteriónicas.

Aunque en la bibliografía se pueden encontrar tensioactivos *gemini* asimétricos con distintos grupos polares y/o con cadenas hidrocarbonadas distintas, la mayor parte de los *gemini* son simétricos, es decir, poseen grupos polares iguales y los mismos grupos no polares, como es el caso de los *gemini* presentados en este apartado.

La primera magnitud a determinar en compuestos tensioactivos es su *cmc* o, de un modo más general si no se conoce la forma en la que se asocian sus moléculas, su concentración de agregación crítica (*cac*). Hay que tener en cuenta que las propiedades detergentes de los ácidos biliares están relacionadas con muchas de sus propiedades fisiológicas. Tal determinación se ha llevado a cabo mediante una balanza de tensión superficial (técnica no invasiva) y a través de medidas de fluorescencia de la sonda fluorescente pireno (técnica invasiva). Como



se verá a continuación, los valores obtenidos para la *cac* de este tipo de compuestos son muy inferiores a los de la sal biliar de partida.



**Figura V.8.-** Comparación de la estructura de los nuevos *gemini* con los ácidos biliares de partida: (a) colato sódico y amina  $C_{24}$  derivada del mismo; (b) *gemini* de  $C_{24}$ -AEDT; (c) *gemini* de  $C_{24}$ -Piromiélítico; (d) desoxicolato sódico; (e) *gemini* de  $DC_{24}$ -AEDT y (f) *gemini* de  $DC_{24}$ -Piromiélítico.

También hay que recordar que las investigaciones sobre sales biliares no modificadas siguen estando sujetas a una fuerte controversia, la cual alcanza aspectos tales como: la existencia o no de una verdadera *cmc* (así, Kratochvil *et al*<sup>41</sup>

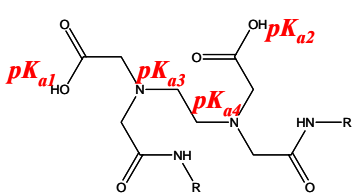


plantean una transición gradual, no crítica, de monómeros a micelas), números de agregación y tamaño de los agregados. Aunque hay consenso en que el número de agregación aumenta con la concentración de sal biliar y/o de fuerza iónica, formándose agregados de mayor número de agregación y tamaño, no está muy claro si los agregados primarios son monodispersos. En la actualidad se está generalizando la acepción de la formación de esa primera etapa, a la que se denomina etapa de premicelización, donde se forman agregados de menor tamaño.<sup>42-44</sup> En parte, esta controversia está originada en factores como utilización de diversas técnicas instrumentales, utilización de muestras impurificadas, estudios llevados a cabo a diferentes valores del pH, etc. Incluso, dentro de una misma técnica, surge el problema de cuál es el verdadero valor de *cmc* que se debe tomar, como se verá a la hora de utilizar la medida de la fluorescencia de una sonda solubilizada en el agregado.

## V.2.- GEMINI *g*-2DC<sub>24</sub>-AEDT

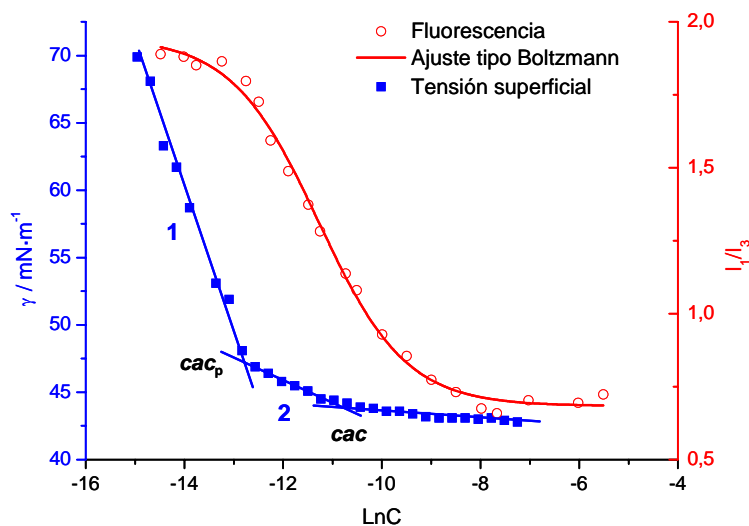
Por orden cronológico de las síntesis realizadas, en este apartado se medirán las propiedades tensioactivas del surfactante *gemini g*-2DC<sub>24</sub>-AEDT (figura V.8.e). Muchas de las características descritas para este *gemini* y los modos de operación serán, en su mayoría, de aplicación para los demás. Las medidas se han llevado a cabo en agua, a diferentes fuerzas iónicas y a diferentes valores del pH. Los valores de pH seleccionados se encuentran por encima de 9, para asegurar que todos los grupos protonables se encuentran en su forma desprotonada. En la tabla V.1 se pueden ver los valores de pK<sub>a</sub> para los diferentes grupos ácidos de una diamida derivada del AEDT.

Tabla V.1.- Valores de pK<sub>a</sub> para los distintos grupos ácido de una diamida derivada del AEDT.<sup>45-47</sup>

	R:				
	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a4</sub>
	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,7 / <1	1,7 / 2,0	3,6 / 4,2	7,1 / 8,1



En la *figura V.9* se muestran conjuntamente las gráficas de tensión superficial vs  $\text{Ln}C$  e  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  para la disolución acuosa del  $g\text{-}2DC_{24}\text{-AEDT}$ . Las disoluciones en agua, sin sales añadidas, son una muestra clara de la presencia o ausencia de impurezas superficialmente activas en la muestra utilizada. La no presencia de un mínimo en la curva de tensión superficial indica la ausencia de impurezas superficialmente activas en la muestra inicial, hecho que se preveía debido al elaborado procedimiento de síntesis y purificación realizado hasta la obtención del producto final, como, por otra parte, lo demostraban las técnicas de caracterización.



**Figura V.9.-** Determinación del valor de  $cac$  del  $g\text{-}2DC_{24}\text{-AEDT}$  por medidas de tensión superficial (técnica no invasiva) y por medidas de fluorescencia del pireno solubilizado en la disolución del *gemini* (técnica invasiva). Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Antes de proceder a una comparación entre los valores obtenidos, hay dos aspectos a tener en cuenta en la obtención del valor de  $cac$  por fluorescencia de las que diferentes publicaciones se hacen eco. En primer lugar, existe una cierta discrepancia a la hora de establecer cuál es la  $cac$  correcta: si el punto de inflexión



del ajuste tipo Boltzmann o el valor que resulta de la intersección de la zona descendente de la curva con el tramo horizontal inferior (véase la *figura V.10*). En segundo lugar, cuando la *cac* corresponde a valores <1 mM, estos suelen estar sobreestimados debido a que a bajas concentraciones se produce un intercambio de la sonda fluorescente entre los agregados (micelas, por ejemplo) y la disolución.<sup>48</sup>

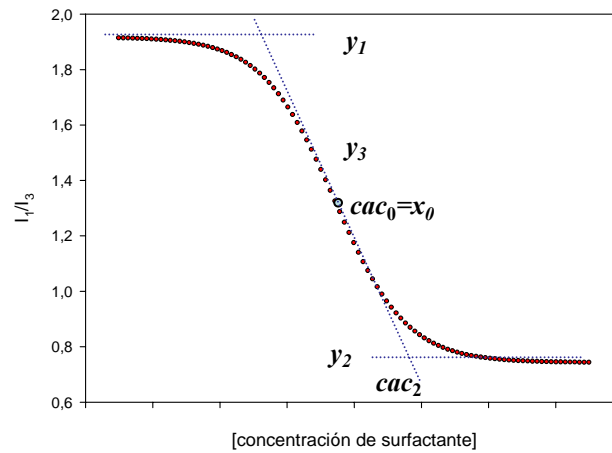
Teniendo en cuenta que el ajuste tipo Boltzmann responde a la ecuación V.1,

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-\frac{x-x_0}{\Delta x}}} \quad [\text{V.1}]$$

donde *y* corresponde a la relación de las bandas de vibración 1 y 3 del pireno, *x* es la concentración de tensioactivo, *A*<sub>1</sub> y *A*<sub>2</sub> son los límites inferior y superior de la curva sigmoideal, *x*<sub>0</sub> es el punto de inflexión y  $\Delta x$  está relacionado con el intervalo de la variable independiente donde tiene lugar el cambio (*figura V.10*). La recta tangente a la zona de cambio, *y*<sub>3</sub>, y los tramos horizontales, *y*<sub>1</sub> e *y*<sub>2</sub>, vienen dados por las ecuaciones V.2-V-4.

En una reciente publicación, Aguiar *et al*<sup>49</sup> han propuesto que el valor de *cac* determinable a partir de la curva sigmoideal, debería obtenerse en función de los parámetros de ajuste de la curva. Así, si  $|x_0/\Delta x| < 10$  se debería considerar como *cac* el valor de *cac*<sub>2</sub>, y si  $|x_0/\Delta x| > 10$ , el valor correcto sería *x*<sub>0</sub>. Para el caso que nos ocupa,  $|x_0/\Delta x| = 12,78$  (*tabla V.2*), por lo que *cac* = *x*<sub>0</sub>, es decir, 12,62 μM. Este valor no se aleja mucho del obtenido por tensión superficial en las mismas condiciones, que resulta ser de 34,8 μM. Aunque los valores de *cac* son inferiores a 1 mM, en este caso no se observa la sobreestimación mencionada más arriba. En definitiva, hay que considerar tales datos en buena concordancia ya que estamos hablando de valores de concentración del orden micromolar.

Por otra parte, es inevitable la comparación de los valores de *cac* para el NaDC y el *gemi* *g-2DC*<sub>24</sub>-AEDT. Así, aunque los valores de *cac* para el desoxicolato son dispares,<sup>50</sup> si se toma como valor de referencia el valor medio de 4,4±2,9 mM (calculado a partir de los valores recopilados por Coello *et al*<sup>50</sup>), el valor de *cac* para el *gemi* se ve reducido en 400-10<sup>3</sup> veces, dependiendo de si se toma el valor obtenido por medidas de tensión superficial o el obtenido mediante la solubilización de la sonda fluorescente. Esto muestra un comportamiento típico de surfactante *gemi*.



$$y_1 = A_1$$

[V.2]

$$y_3 = \frac{A_1 + A_2}{2} + \frac{A_1 - A_2}{4 \cdot \Delta x} x_0 - \frac{A_1 - A_2}{4 \cdot \Delta x} x$$

[V.3]

$$y_2 = A_2$$

[V.4]

**Figura V.10.-** Ejemplo de curva sigmoideal con ajuste tipo Boltzmann y las ecuaciones correspondientes a los tres tramos diferenciados de la curva.

**Tabla V.2.-** Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* (T=25,0±0,5°C).

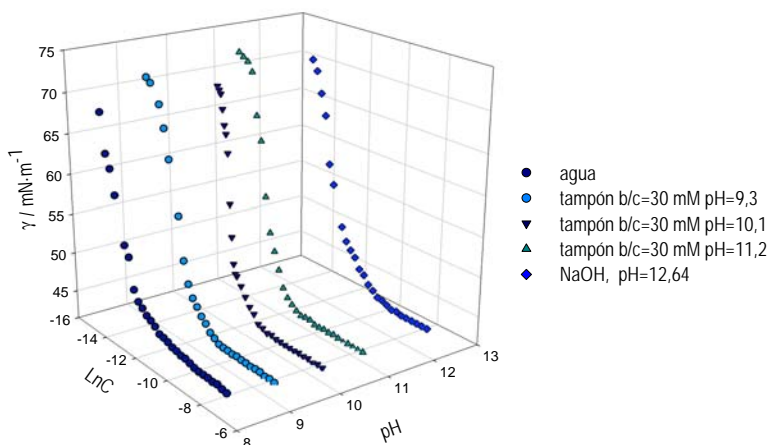
N	$x_0$	$\Delta x$	$r^2$	$cac_0/\mu M$	$cac_2/\mu M$	$A_2$	$A_{2exp}$	$ x_0/\Delta x $
21	-11,28	0,88	0,9963	12,62	73,76	0,68	0,69	12,78



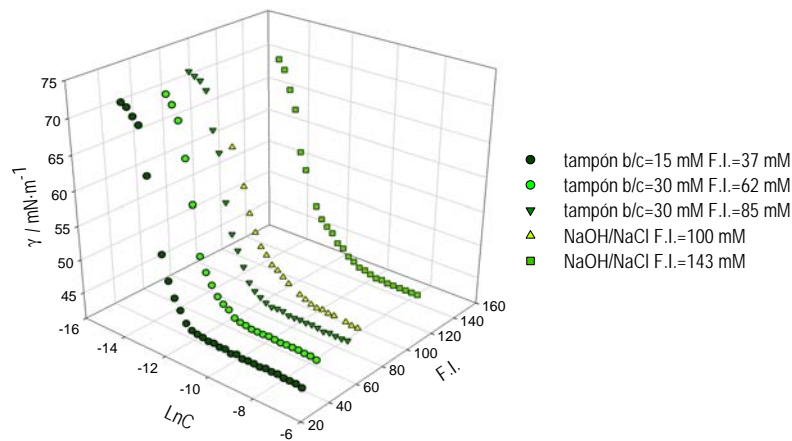
Por otra parte, es bien conocido que la relación  $I_1/I_3$  del pireno solubilizado en una disolución micelar refleja la polaridad del micro-entorno que rodea al pireno. El valor obtenido de esta relación para el  $g-2DC_{24}-AEDT$  ( $=0,69$ ) es muy próximo al determinado para el NaDC ( $= 0,71$ ).<sup>51</sup> Teniendo en cuenta que  $I_1/I_3=0,54$  para el ciclohexano y  $1,70$  para el agua, está claro que la sonda fluorescente se ubica en el  $g-2DC_{24}-AEDT$  en un micro-entorno muy apolar.

Otro hecho a tener en cuenta es que la curva experimental  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  es una curva sigmoideal perfecta. Sin embargo, la curva de tensión superficial muestra dos puntos de rotura de pendiente. La no observancia de ese segundo punto mediante la técnica de fluorescencia estacionaria puede ser debida al intercambio de la sonda fluorescente ya mencionado, o bien que la estructura de los posibles agregados, como se verá en la técnica de dispersión de luz, no debe cambiar la polaridad que rodea a la molécula de pireno.

Las figuras V.11 y V.12 muestran, las medidas de tensión superficial vs  $\text{Ln}C$  a fuerza iónica constante variando el pH, y a pH constante variando la fuerza iónica, respectivamente. Además, la figura V.11 recoge el resultado a pH natural de una disolución del *gemini* en agua que resultó ser de 8,33.



**Figura V.11.-** Gráficas  $\gamma$ - $\text{Ln}C$  para el  $g-2DC_{24}-AEDT$  a diferentes valores de pH. Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .



**Figura V.12.-** Gráficas  $\gamma$ -LnC para el  $g$ - $2DC_{24}$ -AEDT a distinta fuerza iónica y pH en torno a 10. Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^{\circ}C$ .

Antes de analizar los resultados obtenidos, recordemos que la medida de la tensión superficial permite el cálculo de la concentración superficial de exceso<sup>15</sup>,  $\Gamma$ , y del área ocupada por un surfactante en la superficie,  $a$ , a través de la ecuación de Gibbs,

$$\Gamma = -\frac{1}{nRT} \frac{\delta\gamma}{\delta \ln C} \quad [V.5]$$

$$a = \frac{1}{N_A} \Gamma \quad [V.6]$$

Aquí,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  la temperatura absoluta y  $\gamma$  es la tensión superficial en mN/m. El valor de  $n$ , número de especies en la interfase cuya concentración superficial cambia con el cambio de concentración, toma el valor dos para un surfactante iónico (donde el surfactante y el contraión sean univalentes),<sup>52</sup> y el valor tres para surfactantes diméricos constituidos por un surfactante divalente y dos contraiones univalentes, siempre y cuando no haya considerables contribuciones de electrolitos a la fuerza iónica del medio. En el caso de que la concentración de surfactante sea diez veces



menor que la concentración de sal añadida,  $n$  valdrá 1. En definitiva, el valor de  $n$  se puede calcular según la ecuación,<sup>22</sup>

$$n = 1 + \sum \frac{C_i}{C_i + I} \quad [V.7]$$

donde  $I$  es la fuerza iónica del medio y  $C_i$  la concentración de cada especie (surfactante e iones asociados) usada en el cálculo de  $\delta\gamma / \delta \ln C$ . En nuestro caso se ha tomado el valor de  $n=3$  para la experiencia realizada en agua, y  $n=1$  para las experiencias a distintas fuerzas iónicas.<sup>69</sup>

La *tabla V.3* resume los resultados más importantes de estas experiencias, tales como: concentración superficial de exceso ( $\Gamma$ ), área superficial por molécula ( $A$ ) y el valor de  $cac_p$ , concentración de preagregación crítica y la  $cac$  propiamente dicha.

Como era de esperar, al aumentar la fuerza iónica del medio, los valores de  $cac_p$  y  $cac$  disminuyen debido a que una mayor presencia de electrolitos en el medio reduce la repulsión electrostática entre los grupos cargados del puente y/o los agregados formados, favoreciendo su agregación a más baja concentración. Posiblemente, éste sea el efecto mayoritario más que una consecuencia del pH. Esto se cumple muy bien para todas las experiencias realizadas en tampón bicarbonato/carbonato, pero no así para las realizadas en sosa. Estos datos obtenidos “no ajustables” a lo anteriormente expuesto puede ser debido a que la zona de menor pendiente, aunque existe, prácticamente deja de ser un tramo recto más o menos de una longitud asimilable a una recta, para convertirse en un tramo curvo corto, en el cual se tiende a cometer más error a la hora de extrapolar los valores.

---

<sup>69</sup>Intentando resolver el problema del valor de  $n$ , se han realizado estudios de reflexión superficial de neutrones, que permite la determinación directa de  $\Gamma$ , el cual comparándolo con las medidas de tensión superficial permite obtener el valor de  $n$ . Éste resultó ser de dos o tres dependiendo del *gemini* y de la concentración (si la concentración es próxima a la *cmc*, toma un valor de dos, sino de tres). Las medidas conductivimétricas ofrecen una medida directa de la formación de pares iónicos, pero la mayoría de los estudios conductivimétricos no muestran un comportamiento que se salga de lo normal. Efectos como la premicelización se deberían tener en cuenta, por lo que serán necesarios nuevas investigaciones en este sentido.



**Tabla V.3.-** Datos experimentales desde los distintos tramos de las isothermas de tensión superficial del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. Experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica y pH (T=25,0±0,5°C). <sup>a</sup>mol·m<sup>-2</sup>; <sup>b</sup>Å<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>μM; <sup>d</sup>mN·m<sup>-1</sup>. N =número de puntos experimentales; b/c=bicarbonato/carbonato.

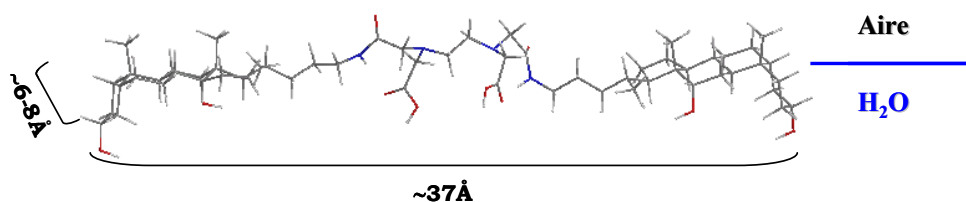
Disolvente	N	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>1</sub> <sup>a</sup>	a <sub>1</sub> <sup>b</sup>	cac <sub>p</sub> <sup>c</sup>	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>2</sub> <sup>a</sup>	a <sub>2</sub> <sup>b</sup>	cac <sup>c</sup>	γ <sub>cac</sub> <sup>d</sup>
agua pH <sub>natural</sub>	29	1,3	126,6	4,6	0,22	765,5	34,8	43,1
tampón b/c 15 mM pH <sub>10,26</sub>	30	8,7	20,0	2,1	0,90	185,1	26,4	42,3
tampón b/c 30 mM pH <sub>10,10</sub>	26	6,0	27,4	3,0	1,4	115,5	15,7	41,7
tampón b/c 30 mM pH <sub>9,33</sub>	27	5,5	30,4	2,9	1,1	154,2	15,9	41,8
tampón b/c 30 mM pH <sub>11,19</sub>	28	2,5	22,1	2,0	1,1	152,0	26,2	41,6
NaOH/NaCl F.I.100mM	24	4,5	37,1	3,0	1,2	136,3	24,2	41,7
NaOH/NaCl F.I.150mM pH <sub>10,5</sub>	20	6,1	27,0	2,9	1,2	136,6	33,8	41,9

Las gráficas  $\gamma$ -LnC con este tipo de comportamiento son típicas en el estudio de surfactantes *geminis* convencionales, pero hay que considerar que las sales biliares son surfactantes bifaciales de naturaleza claramente diferente. Para tratar de entender mejor el comportamiento en disolución de este nuevo surfactante se describirá lo que sucede en cada tramo de las gráficas de tensión superficial. Sin embargo, antes de analizar los resultados obtenidos del área superficial en las condiciones experimentales que se muestran en la *tabla V.3* para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*, vamos a comentar la disposición de las moléculas de NaDC en la interfase aire-agua. Almgren *et al.*,<sup>53</sup> han puesto de manifiesto que las gráficas  $\gamma$ -LnC para esta sal biliar presentan también dos puntos de inflexión, aunque en este caso la curvatura es opuesta a la obtenida para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. En condiciones de pH neutro, antes del primer punto de inflexión, el área por molécula del desoxicolato es  $a=149 \text{ \AA}^2$ , mientras que en medio básico el valor aumenta hasta  $204 \text{ \AA}^2$ . Este valor sugiere que la orientación de la molécula de desoxicolato en la superficie es plana. A concentraciones mayores que la del punto de inflexión, se produce un cambio hacia una distribución más compacta ( $a=41 \text{ \AA}^2$ ), de modo que las



moléculas pasan a tener una disposición vertical. Los valores para la *cmc* obtenidos por Almgren *et al* son 19,9 mM y 7,8 mM ( $I=50$  mM, NaCl) para el NaC y NaDC, respectivamente. Para el cálculo de las áreas estos autores han usado un valor de  $n=2$ , que puede no ser del todo correcto si consideramos que  $\delta\gamma/\delta\ln C$  varía cuando nos encontramos por debajo de la *cmc*, entonces el valor de  $n$  debería ser próximo a 1, con lo que el área observada para el primer tramo de las sales biliares naturales se aproximaría más al área obtenida mediante el estudio clásico de monocapas.<sup>54</sup>

Mediante el modelo gráfico de construcción molecular CHEM3D hemos calculado el área superficial del desoxicolato en una disposición plana, resultando  $90 \text{ \AA}^2$  si ésta yaciera plana. Este resultado es algo inferior al obtenido por Almgren *et al*,<sup>53</sup> Ekwall *et al*,<sup>55</sup> y Small<sup>54</sup>, cuyos valores se encuentran en el intervalo 85-140  $\text{Å}^2$ . Ello sugiere que las moléculas de desoxicolato yacen planas en la superficie pero con bastante espacio entre ellas. Hemos realizado este mismo cálculo para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* en disposición completamente extendida (figura V.13) resultando un área mínima de  $220 \text{ \AA}^2$ . Si tenemos en cuenta que para el desoxicolato el área real es mucho mayor que la teórica, se podría pensar que el área del *gemini* debería ser como mínimo la obtenida teóricamente. Sin embargo, esto no es así ya que, aún en el mejor de los casos (*gemini* disuelto sin electrolito añadido), el valor experimental es  $126 \text{ \AA}^2$ , es decir, casi la mitad del valor teórico. Ello sugiere que la molécula no se encuentra en la posición más extendida en la interfase aire-agua.

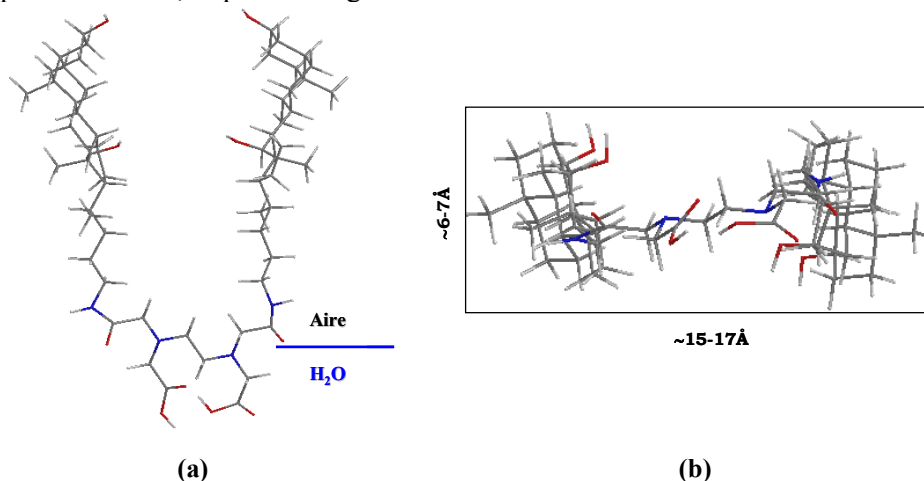


**Figura V.13.-** Molécula *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* totalmente extendida. Se muestra la longitud de la molécula que va desde el grupo -OH de la posición 3 hasta el opuesto. El valor de 37 Å es muy próximo al obtenido para la distancia  $C_{\text{metilo}}-C_{\text{metilo}}$  en el cristal del diéster del dímero del ácido cólico con puente succínico<sup>56</sup> que resultó ser de 34,662 Å. La anchura se ha calculado como la distancia H5-H1 dentro del mismo grupo esteroide. Los grupos carboxílicos (en su forma ácida) del AEDT y los hidroxilos se han dispuesto hacia el medio acuoso.



Almgrem *et al*<sup>53</sup> presentan un segundo valor de área superficial de  $41 \text{ \AA}^2$  mientras que Ekwall *et al*<sup>55</sup> y Small<sup>54</sup> hablan de un valor de  $90 \text{ \AA}^2$ . En ambos casos, se trataría de un empaquetamiento más compacto, asimilado con una posición apical en la superficie acuosa, presentando la molécula una disposición en “V” (véase la *figura V.14*). Con esta orientación, el valor del área dependería del ángulo de la “V”. Para un empaquetamiento máximo, correspondiente a un valor mínimo del ángulo entre las cadenas, el valor sería cercano a  $90\text{-}120 \text{ \AA}^2$ . La elevada proximidad entre los cálculos teóricos y experimentales, sugiere que, en ausencia de electrolito, ésta disposición estructural del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* es más factible que la extendida.

Atendiendo a los modelos propuestos para los agregados de ácidos biliares que pueden resumirse en la idea *espalda contra espalda* (siendo la espalda la cara  $\beta$ ),<sup>50</sup> es posible que en disolución acuosa este *gemini* presente una estructura, que denominaremos *cerrada*, con las caras hidrófobas de los esteroides enfrentadas y la cara hidrófila  $\alpha$ , portando los grupos hidroxilo, hacia el exterior, recordando de este modo las micelas primarias propuestas por Small,<sup>57</sup> por lo que cada monómero de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* podría ser considerado como una *micela unimolecular*. La disposición *espalda contra espalda* sería la contraria de la mostrada en la *figura V.14*. Consecuentemente, el paso del *gemini* del interior de la disolución a la superficie acuosa, implicaría el giro de las unidades esteroide.



**Figura V.14.-** (a) Disposición apical del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. (b) Vista a lo largo de la cadena lateral del esteroide y posible área que ocuparía. Al no estar en un medio polar, se supone que la estructura más estable es aquella que facilita la formación de enlaces de hidrógeno.<sup>58</sup>

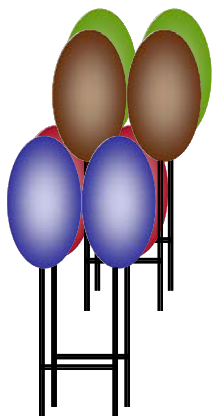


En presencia de electrolito, el área superficial disminuye considerablemente hasta un valor medio de  $27 \pm 6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  (*tabla V.3*), más bajo que el correspondiente a la posición en V de ángulo mínimo ya comentada. Para comprender este valor y proponer la disposición espacial de la molécula en la interfase, debemos recordar los estudios de Ekwall y Ekholm<sup>59</sup> sobre la isoterma de compresión del ácido litocólico a pH 1,5, que han sido recopilados por Small.<sup>54</sup> En torno a  $119 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  la presión crece rápidamente apareciendo un primer colapso en torno a  $81 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . En este intervalo la película es una fase líquida correspondiendo a una monocapa de moléculas acostadas con el  $3\alpha\text{OH}$  y el ácido carboxílico en la superficie acuosa. El descenso del área por molécula significa un grado de empaquetamiento creciente hasta el colapso de la monocapa originando la formación de una segunda fase. Esta fase extra implica isoterma plana. En torno a  $27 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , que es  $1/3$  del valor del área del litocólico plano, el incremento de presión origina una reducción de  $5 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Ekwall y Ekholm aceptan que este hecho corresponde a la formación de una nueva fase formada por tres capas de ácido litocólico. El colapso de esta tricapa origina la formación de una fase multicapa. Este comportamiento es diferente del que presenta el ácido litocólico a 3 M de NaCl y pH 10, ya que aparece un único punto de colapso en torno a  $44 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  y que correspondería a una disposición vertical de la molécula con el grupo carboxilato hacia la fase acuosa.

Siguiendo esta propuesta, nuestros datos sugieren que posiblemente se esté formando alguna estructura multicapa. La longitud de la cadena lateral del esteroide, sumada con la de los grupos del puente de AEDT, puede ser estimada en torno a  $11,7 \text{ \AA}$  que es más del doble del grosor del núcleo esteroide. Ello permite un apilamiento en capas que no impide el máximo contacto de los grupos hidrófilos del puente con el agua. La *figura V.15* muestra un esquema de un posible apilamiento en la multicapa. Además, la presencia de electrolito disminuiría las posibles repulsiones electrostáticas entre los grupos carboxilato presentes en la multicapa. Esta propuesta es similar a la de Rosen *et al*<sup>60</sup> quienes, para moléculas *gemini* catiónicas de cadena alifática, también justificaron valores de área superficial menores de los que corresponderían, mediante la formación de una multicapa en la superficie. Tsubone *et al*<sup>61</sup> aceptan esta interpretación para *gemini* con grupos carboxilato. También es cierto que los *gemini* se empaquetan en la superficie de un modo más compacto que los tensioactivos clásicos como muestran los datos de superficie ocupada por molécula. Como ejemplo, se puede citar los *gemini* con dos grupos sulfonato que presentan un área por molécula de sólo  $26 \text{ \AA}^2$ , mientras que el valor correspondiente a un monoalquilsulfonato es de  $43 \text{ \AA}^2$ .<sup>62</sup> Ello



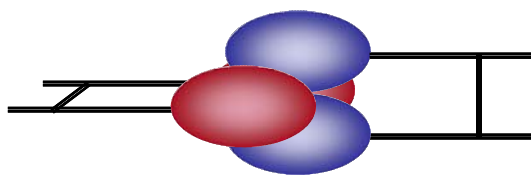
también se traduce en una mayor eficiencia en la reducción de la tensión superficial.



**Figura V.15.-** Esquema de una posible multicapa originada por el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. Cada molécula de *gemi* está representada por un color diferente.

Por último, no debiera descartarse que la molécula se encuentre orientada en una posición totalmente vertical.

Después de este primer tramo de pendiente pronunciada, se observa un tramo de menor pendiente antes de llegar a la horizontalidad definitiva. Estos cambios de pendiente son característicos de compuestos que sufren *premicelización*, en un intervalo de concentraciones en el que se forman agregados pequeños. La estructura del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* sugiere que fácilmente podrían formarse dímeros implicando la interacción de las caras hidrófobas de cuatro esteroides tal y como se recoge esquemáticamente en la *figura V.16*. Esta propuesta es coherente con la estructura de los agregados primarios propuesta por Small<sup>57</sup> y desarrollada por otros autores<sup>50,63,64</sup> para ácidos biliares y también por Song y Rosen para *gemi* catiónicos.<sup>65</sup> Revisaremos esta propuesta cuando analicemos los datos de QELS y SLS.



**Figura V.16.** Esquema de un dímero del *gemi g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*.



Estos agregados serían superficialmente menos activos, como lo indica el hecho de que ahora se produce un descenso de la tensión superficial de sólo  $4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , mientras que en el tramo anterior la disminución alcanzó  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  en un menor intervalo de concentraciones. En este tramo, el área superficial ocupada por molécula aumenta considerablemente lo que se debería a una menor concentración de surfactante en la superficie debido a que los *pre-agregados* incorporan moléculas de la superficie al interior de la disolución, resultando en un aumento del área superficial por molécula y, consecuentemente, en una disminución de la pendiente de la gráfica.

Finalmente, el valor de la tensión superficial a la concentración crítica de agregación,  $\gamma_{cac}$ , en presencia de electrolito es aproximadamente  $5 \text{ mN/m}$  más bajo que su valor en agua. Esta es otra característica de un *gemini* ya que el valor de  $\gamma_{cmc}$  para el desoxicolato es aproximadamente  $6 \text{ mN/m}$  menor en agua que en presencia de NaCl.

#### **Breve reseña sobre las vesículas y los procesos de transición vesícula-micela**

En aras de poder entender mejor el comportamiento estructural observado para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* presentamos un resumen de las características principales de las vesículas metaestables y de los procesos de transición vesícula→micela.

Las vesículas han atraído mucho interés a causa de sus aplicaciones bioquímicas. Varias vesículas catiónicas han sido empleadas con éxito para interactuar con superficies cargadas negativamente o con biomoléculas tales como proteínas antigénicas, con células procariotas o eucariotas, o con virus. Sin embargo, su baja estabilidad limita su aplicación. Las vesículas espontáneas, termodinámicamente más estables, fueron obtenidas en pocos sistemas, principalmente en mezclas acuosas de anfífilos con carga opuesta.<sup>66</sup> Si los surfactantes son fosfolípidos, las vesículas se denominan liposomas.

La formación de vesículas puede entenderse como un proceso de dos etapas. En primer lugar, las moléculas de surfactante forman bicapas, las cuales, en un paso posterior, se cierran sobre sí mismas dando origen a las vesículas ya que las bicapas finitas son energéticamente desfavorables.<sup>67</sup> Recordemos también que el factor que determina la forma de las estructuras resultantes del auto-ensamblaje de las moléculas de surfactantes, viene dada por el parámetro de empaquetamiento que es un balance geométrico entre la zona hidrófila y la zona hidrófoba del surfactante.<sup>68,69</sup>



La formación de muchas de las vesículas descritas en la bibliografía requiere de la aplicación de fuerzas externas. Un ejemplo es la formación de liposomas por medio de ultrasonidos. Las vesículas así generadas se denominan *metaestables*. Recientemente ha crecido el interés por el diseño de moléculas anfífilas que originen vesículas de un modo *espontáneo*. En este contexto, el término espontáneo significa que el proceso es termodinámicamente favorable ( $\Delta G^\circ < 0$ ) y que, además, ocurre rápidamente.<sup>70</sup>

Una bicapa está constituida por dos monocapas unidas mediante sus partes hidrófobas. Cada monocapa se caracteriza por una curvatura espontánea de equilibrio (la inversa del radio de cada monocapa), la cual por lo general no es cero. Las bicapas simétricas poseen la menor energía de Gibbs ya que su curvatura espontánea es cero, al anularse las curvaturas espontáneas de cada monocapa.<sup>71</sup> Eso explica porque, generalmente, la formación de vesículas necesita la aplicación de una energía externa como sonicación, microfluidización o hidratación de una capa fina de moléculas anfífilas.<sup>72</sup> Sin embargo el proceso de formación de las vesículas espontáneas puede ser ambiguo ya que, en todas las circunstancias es necesario aplicar alguna clase de fuerza al sistema para homogeneizarlo lo que lleva a preguntarse si esta acción se puede considerar como una fuerza externa.

Para una vesícula, la energía de curvatura por unidad de área viene dada por<sup>73</sup>

$$E_b = \frac{1}{2} \kappa (C_x + C_y - 2C_0)^2 + \bar{\kappa} C_x C_y \quad [\text{V.8}]$$

donde  $C_x$ ,  $C_y$  y  $C_0$  son las curvaturas principales y espontánea, respectivamente,  $\kappa$  es el módulo de curvatura y  $\bar{\kappa}$  es el módulo de curvatura gaussiano. Ambos presentan valores del orden de  $\sim k_B T$ .<sup>74</sup>

Para vesículas esféricas y simétricas, la ecuación anterior puede simplificarse a:

$$E_b = 2KC_0^2 \quad [\text{V.9}]$$

siendo,

$$2K = 2\kappa + \bar{\kappa} \quad [\text{V.10}]$$

donde  $C_0$  es la curvatura para la vesícula de mínima energía y  $K$  se conoce como constante de curvatura efectiva. El análisis de estas ecuaciones indica que las



vesículas se forman espontáneamente para valores bajos de  $K$ , es decir, para bicapas *blandas*. En estos casos, el exceso de energía adquiere valores comparables a la energía térmica y tales vesículas se encuentran estabilizadas entrópicamente. En el caso de valores de la curvatura espontánea distintos de cero, las vesículas se forman espontáneamente y se encuentran estabilizadas por la ruptura de la simetría.<sup>75</sup>

La transición vesícula-micela envuelve un cambio considerable en la luz dispersada, por lo que ha sido estudiada en varios sistemas mediante medidas de *Light Scattering*. En este breve resumen, prescindiremos de los mecanismos que dan lugar a la formación y destrucción de las vesículas en este tipo de procesos, lo que ya fue objeto de controversia durante las últimas décadas,<sup>76-78</sup> para centrarnos en los resultados más importantes que se pueden obtener por medidas de *Light Scattering*.<sup>79</sup>

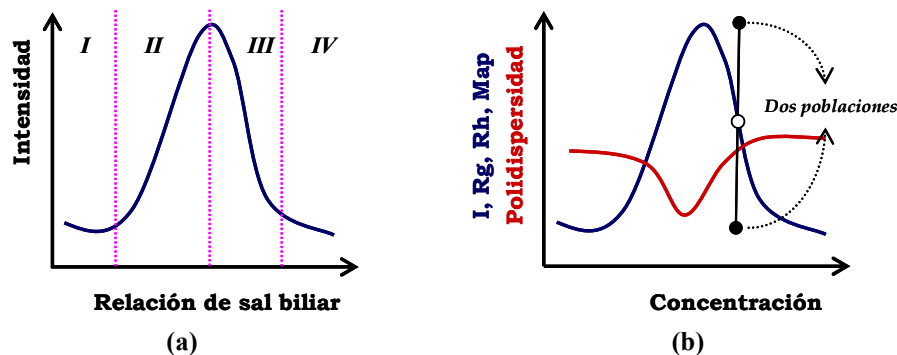
Este fenómeno es típico de las sales biliares en presencia de lecitina, existiendo multitud de estudios realizados sobre este tipo de sistemas, variando el tipo de sales biliares (NaC, NaTC, NaGC, NaTDC, NaTUDC,...), la relación molar lecitina/sal biliar y el efecto de la dilución a partir de una disolución concentrada. El comportamiento de estas mezclas se caracteriza por una fuerte dependencia del tamaño del agregado con la concentración total lipídica y la relación de concentraciones de los dos componentes.

A grandes rasgos, el comportamiento de las disoluciones acuosas de lecitina-sal biliar se puede explicar como sigue: una disolución acuosa de lecitina da lugar a vesículas (agregados de baja curvatura espontánea) mientras que las sales biliares suelen dar lugar a micelas (agregados con alta curvatura). En la *figura V.17.a*, se describe la situación en la que se produce la transición variando la relación de sal biliar:

- (I) En esta región existen vesículas de lecitina. Se está produciendo un intercambio entre los monómeros de sal biliar libre y la membrana lipídica.
- (II) En esta región, se produce un aumento del tamaño de las vesículas por enriquecimiento de sal biliar presente en la membrana.
- (III) En este tramo, aparecen dos poblaciones: una correspondiente a vesículas y otra a micelas mixtas. Se está produciendo la rotura de las vesículas de lecitina ya que las sales biliares son claramente más solubles que la lecitina, disolviendo las vesículas en forma de micelas mixtas. Véase la *figura V.17.b*.



- (IV) A altas concentraciones de sal biliar se observa la dilución de las vesículas dando lugar a micelas mixtas, bien esféricas o alargadas.



**Figura V.17.-** (a) Variación de la intensidad de luz dispersada en función de la relación de sal biliar presente en la muestra. (b) Resumen del efecto de dilución de una disolución mixta en el tamaño, forma y polidispersidad de los datos obtenidos por *Light Scattering*. Mediante medidas DLS se observa un aumento dramático de  $R_h$  a medida que aumenta la dilución y la presencia de una fase donde existen los dos tipos de agregados.

En la *figura V.17.b* se representa la dependencia del índice de polidispersidad con la dilución. Al aumentar la dilución, se produce una disminución indicando la formación de vesículas monodispersas, pasándose de una función de correlación bi-exponencial a una mono-exponencial. A mayores diluciones, la polidispersidad vuelve a aumentar.

Existen casos de transiciones con participación de un único compuesto en disolución, produciéndose el cambio por variación de pH.<sup>80,81</sup> Como ejemplo podemos citar el *gemini* catiónico constituido por dos unidades de glucosa estudiado por Johnsson *et al.*<sup>81</sup> En condiciones diluidas y pH casi neutro, el *gemini* da lugar a vesículas. En condiciones de mayor acidez, se produce una transición vesícula→micela en un estrecho intervalo de pH (5,6-6,0), debido al distinto grado de protonación de las dos aminas terciarias presentes en el puente del *gemini*. Las vesículas se descomponen en micelas cilíndricas que más tarde se transforman en pequeñas micelas globulares. A valores de pH básico también se produce una



destrucción de las vesículas debido a un cambio en la carga superficial de las mismas.

**Caracterización estructural de los agregados del g-2DC<sub>24</sub>-AEDT en disolución acuosa. Medidas de Light Scattering QELS y DLS**

Como técnicas de caracterización de los agregados a los que da lugar este gemelo y los siguientes se han usado técnicas de dispersión de luz (o *Light Scattering*), bien sea la dispersión dinámica (*Quasi-elastic Light Scattering*, QELS ó *Dynamic Light Scattering*, DLS) o dispersión estática (*Static Light Scattering*, SLS) y, la microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electronic Microscopy*, TEM). En el *apéndice B* pueden verse los fundamentos teóricos de ambas técnicas.

En la técnica QELS, se analiza la dependencia temporal de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por los agregados mediante una función de autocorrelación normalizada. Ello permite determinar el coeficiente de difusión traslacional ( $D_C$ ), a partir del cual se calcula el radio hidrodinámico ( $R_h$ ). La técnica SLS mide la intensidad de luz dispersada, lo que permite determinar el radio de giro ( $R_g$ ) y la masa molecular ( $M_w$ ) del agregado, polímero, etc. Además todas las muestras fueron filtradas previamente a ser medidas para eliminar impurezas no deseadas, principalmente polvo, que pudieran provocar una distorsión en la función de correlación.

Las medidas de dispersión de luz se han realizado fundamentalmente en disolución reguladora bicarbonato/carbonato para asegurar un pH básico y la presencia de fuerza iónica en el medio. De este modo, se consigue apantallar las repulsiones *interpartícula* con lo que el factor de estructura  $S(q,c)$ , que tiene en cuenta este tipo de interacciones, adquiere el valor de 1, evitando así introducir correcciones tediosas. En presencia de fuerza iónica en el medio se evita el acoplamiento de los coeficientes de difusión de los agregados con los de los contraiones.

Inicialmente, el intervalo de concentraciones de tensioactivo elegido fue de 0,15-10 mM, es decir, por encima del valor de la  $cac$  obtenido experimentalmente (*vide supra*). Posteriormente, este intervalo se amplió hasta valores de la concentración comprendidos entre 1 y 150  $\mu$ M, en el que se cumple  $cac_p < c < cac$ . La *tabla V.4* resume los resultados experimentales de las medidas QELS y SLS



para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* en diferentes condiciones de fuerza iónica. Las muestras fueron filtradas a través de filtros de diferente tamaño de poro.

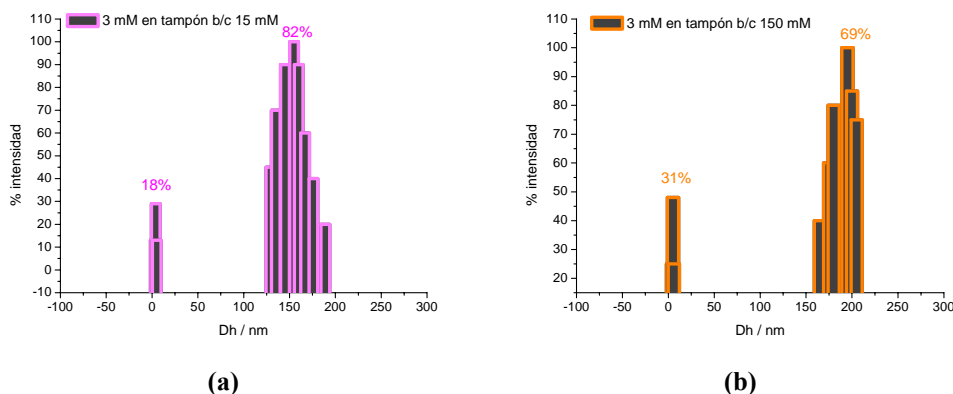
**Tabla V.4.-** Resultados de las medidas QELS y SLS realizadas para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* cambiando la fuerza iónica y el tamaño de poro del filtro utilizado.  $Dh_{90}$ =diámetro hidrodinámico a  $\theta=90^\circ$ ;  $I_{90}=I*\text{Sen}(90^\circ)_{\text{muestra}}/I*\text{Sen}(90^\circ)_{\text{decalina}}$ .  $\sigma$ =polidispersidad. Medidas realizadas a  $25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

C/mM	Filtro $\phi_{\text{poro}}=0,45 \mu\text{m}$								Filtro $\phi_{\text{poro}}=0,20 \mu\text{m}$			
	Tampón b/c 15mM (pH <sub>10</sub> )				Tampón b/c 150mM (pH <sub>10</sub> )				Tampón b/c 150mM (pH <sub>10</sub> )			
	$Dh_{90(1)}$ nm	$Dh_{90(2)}$ nm	$\sigma$	$I_{90}$	$Dh_{90(1)}$ nm	$Dh_{90(2)}$ nm	$\sigma$	$I_{90}$	$Dh_{90(1)}$ nm	$Dh_{90(2)}$ nm	$\sigma$	$I_{90}$
9,000	agua			34,1	5,0	163,0	0,40	47,5				
5,000					6,0	164,0	0,45	21,8	5,6	161,0	0,36	9,6
3,000	4,0	155,0	0,27	15,7	5,0	164,0	0,48	16,4	5,0	141,4	0,41	8,9
2,500	4,0	159,0	0,28	10,1	4,0	159,0	0,41	10,4	5,0	154,0	0,43	6,5
1,500	4,0	150,0	0,28	8,0	5,0	161,0	0,42	8,7				
1,000	4,0	144,0	0,27	5,7	5,0	148,0	0,46	6,2	5,4	143,4	0,38	4,3
0,750	4,0	178,0	0,30	4,2	5,0	150,0	0,39	4,7				
0,650	4,0	145	0,28	3,9								
0,500					5,0	158,6	0,42	3,0	4,4	131,0	0,39	1,7
0,320	4,0	143,4	0,29	3,8								
0,25	4,0	153,2	0,27	3,7	5,0	148,6	0,43	3,0				
0,150	4,0	153,0	0,39	3,3	5,0	152,0	0,47	3,3	5,0	158,6	0,45	0,9
0,100	4,0	178,0	0,39	3,1	5,0	157,0	0,39	2,3				
0,060						116,4	0,25	5,6		125,0	0,15	1,2
0,050	4,0	150,0	0,38	2,0		124,6	0,23	17,9		108,0	0,23	3,3
0,040						121,8	0,17	19,0		84,0	0,20	10,7
0,030						122,2	0,22	18,6		116,0	0,18	15,9
0,020						124,8	0,20	14,5		130,0	0,17	2,3
0,010						126,0	0,30	3,0		126,0	0,25	1,2

Comenzaremos explicando los resultados QELS. Las primeras experiencias fueron realizadas en régimen de baja y alta fuerza iónica. Para ello se utilizaron disoluciones reguladoras de bicarbonato/carbonato de sodio de concentraciones 15 mM (I=30 mM) y 150 mM (I=300 mM) y pH próximo a 10. La concentración del *gemini* en cada experiencia fue superior a su *cac*. Para ambas fuerzas iónicas, en todo el intervalo de concentraciones, del análisis CONTIN de la función de autocorrelación se deduce la presencia de una distribución bimodal de agregados.



En la *figura V.18* se puede ver la distribución de tamaños para un ángulo de dispersión de  $90^\circ$ . El porcentaje de la intensidad de la señal del agregado de menor tamaño es inferior al del agregado mayor. Sin embargo, ello no implica necesariamente que se encuentren en menor concentración, sino que es debido a su pobre capacidad de dispersar la luz. Para una concentración determinada, si se aumenta el tamaño de partícula en un orden de magnitud, la intensidad de luz dispersada debe aumentar  $10^6$  veces. Es decir, si en disolución existen dos poblaciones de agregados presentes en la misma concentración, pero que difieren unas diez veces en tamaño, la intensidad que corresponda al agregado de mayor tamaño debería ser aproximadamente  $10^6$  veces mayor. Esto dificulta observar agregados pequeños (por ejemplo, micelas) en la misma disolución en la que estén presentes otros agregados de mayor tamaño (por ejemplo, vesículas), salvo que las micelas estén presentes en una concentración muy superior. Análogamente, si las dos señales presentan el mismo porcentaje de intensidad, la concentración de los agregados de menor tamaño deberá ser muy superior a la concentración del agregado mayor.



**Figura V.18.-** Distribución de tamaños en nm para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* de concentración 3 mM en: **(a)** tampón bicarbonato/carbonato de sodio 15 mM y pH 10 y **(b)** tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM y pH 10. Medidas realizadas a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Ángulo de dispersión de medida  $90^\circ$ .

Estos resultados de QELS sólo indican el tamaño de los agregados en disolución pero no informan sobre su forma o naturaleza. Atendiendo a los valores de los radios hidrodinámicos determinados por Mazer *et al*<sup>82</sup> para diversas sales



biliares (taurocolato, taurodesoxicolato, tauroursodesoxicolato y tauroquenodesoxicolato), la especie de menor tamaño ( $R_h \sim 2,5$  nm), debería corresponder a un agregado de carácter micelar con un número de agregación relativamente bajo. En ausencia de sales añadidas, el tamaño de este agregado es posiblemente algo inferior al valor anterior ya que experimentos realizados en agua bidestilada a una concentración del *gemini* de 9 mM, en ausencia de electrolitos añadidos, no ha podido detectarse tal agregado. Este hecho se debe a que nos encontramos en el límite de detección del equipo de *Light Scattering* pero no a la inexistencia del agregado. La variación del tamaño de los agregados de sales biliares por aumento de la fuerza iónica es un hecho bien contrastado en la bibliografía.<sup>82,83</sup> Esto es debido a la disminución de las interacciones electrostáticas repulsivas a valores altos de la fuerza iónica.<sup>84</sup> Sin embargo, de acuerdo con el análisis termodinámico desarrollado por Nagarajan,<sup>85</sup> si un agregado es polidisperso, su tamaño debe aumentar al hacerlo tanto su concentración como la fuerza iónica del medio. Por ello, el bajo crecimiento del agregado con la fuerza iónica y su constancia con la concentración del *gemini*, tal y como muestran los valores de la *tabla V.4*, sugieren que el agregado de menor tamaño es relativamente monodisperso. Adelantándonos a las imágenes TEM (*vide infra*), la estructura del agregado mayor es de tipo globular sugiriendo la formación de una vesícula.

Analicemos ahora las experiencias realizadas en el intervalo de concentración 1-150  $\mu$ M, correspondiente al tramo “2” de la isoterma de tensión superficial. Estas muestras también fueron preparadas en distintas condiciones de fuerza iónica. La principal diferencia en los resultados obtenidos a cada fuerza iónica radica en que en aquellas muestras disueltas en una mayor cantidad de electrolito (F.I.=300 mM) aparece una única población de agregados con un valor medio de  $D_n$  de 120 nm (véase la *figura V.19*).

En las muestras de menor fuerza iónica, no existe intensidad de luz dispersada suficiente para obtener un óptimo resultado, aunque también es presumible la presencia de dos poblaciones. En cualquier caso, lo verdaderamente sorprendente es el tamaño que alcanza el agregado, muy superior al obtenido a concentraciones del *gemini* superiores a su *cac*. Sería de esperar una única población de agregados de tamaño no muy superior a unos 5 nm de diámetro.<sup>Y</sup> Aceptando que, por su tamaño, este tipo de agregados son vesículas (*vide supra*), el

---

<sup>Y</sup>“Todo científico tiene cierta idea de cuál va a ser el resultado del experimento. Si no, ni siquiera lo llevaría a cabo. Tiene una expectativa. Pero la expectativa actúa de manera misteriosa... y es totalmente inconsciente”. M. Crichton, *Estado de Miedo*, 2004, Círculo de Lectores.



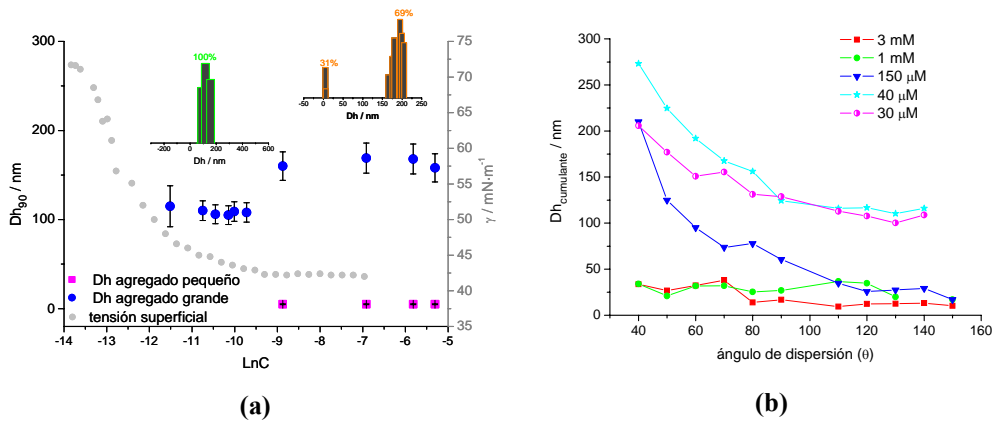
hecho de que se formen a una concentración inferior a la *cac*, sugiere que éstas sean metaestables.

Esta situación de distribución uni-modal a alta dilución del *gemini* en tampón bicarbonato/carbonato 150 mM centró nuestra máxima curiosidad. En los gráficos de la *figura V.19* se representa la distribución de tamaños vs LnC, con la curva de tensión superficial a fuerza iónica elevada, sobreimpresa. También se representa la variación de  $D_h$ , obtenido por el método de cumulantes (que suministra el valor del coeficiente de difusión medio) con el ángulo de dispersión.<sup>86</sup> La *figura V.19.b* evidencia que el  $D_h$  aumenta al disminuir la concentración de *gemini*. Este hecho, conjuntamente con el análisis termodinámico de Nagarajan ya mencionado,<sup>85</sup> sugiere un cambio drástico en la estructura del agregado. Dado que el  $D_h$  es un promedio del tamaño de todos los agregados presentes en disolución, el agregado de menor tamaño adquiere más peso estadístico al aumentar la concentración del *gemini*. La polidispersidad resultante de las medidas de dispersión de luz, apoya esta interpretación. Efectivamente, en aquellas muestras donde hay presentes dos poblaciones, la polidispersidad toma valores elevados (de 0,4-0,5) como cabría esperar para distribuciones de este tipo, pero para aquellas muestras en las que existe una única población la polidispersidad disminuye hasta 0,15-0,25 (*tabla V.4*). En definitiva, los hechos analizados sugieren una transición vesícula→micela al aumentar la concentración de *gemini*.

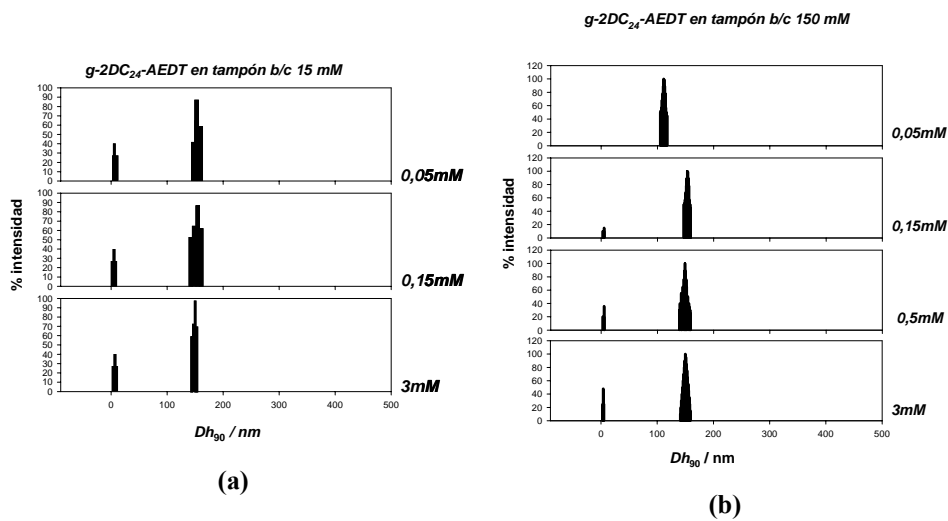
La *figura V.20* manifiesta claramente la diferencia que existe en el tipo de agregados que se forman al cambiar la fuerza iónica. En todo el intervalo de concentraciones estudiado, a fuerza iónica baja, el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* da lugar a la formación de dos poblaciones de agregados de tamaño muy dispar (*figura V.20.a*). En cambio, a fuerza iónica más elevada, existe un tramo de concentraciones donde existe una única población (*figura V.20.b*).

También se realizaron ensayos de envejecimiento a diferentes concentraciones de surfactante, sin que se observara cambio alguno en el tamaño de los agregados (*figura V.21*).

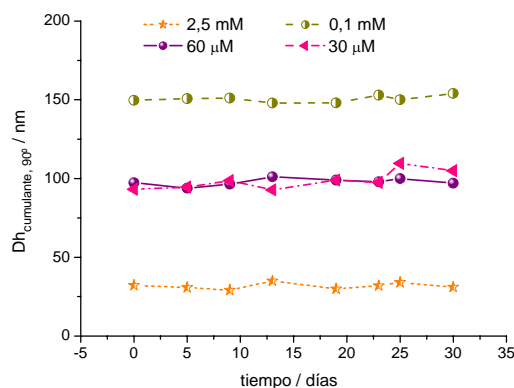
Únicamente para aquellas disoluciones donde existe una distribución de tamaños monomodal, se han representado las gráficas de Zimm Dinámico cuya extrapolación a ángulo cero proporciona el valor del radio hidrodinámico libre del efecto de la disimetría angular sobre la intensidad de luz dispersada (*figura V.22*). El valor medio resultante,  $\langle R_h \rangle = 114 \pm 5$  nm, se correspondería con el de una vesícula.



**Figura V.19.-** (a) Distribución de tamaños con la concentración de  $g\text{-}2DC_{24}\text{-AEDT}$  en bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM y pH 10. Cada muestra fue previamente filtrada a través de filtros de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,2 \mu\text{m}$ . (b) Variación del diámetro hidrodinámico cumulante con el ángulo de dispersión. Las experiencias fueron realizadas a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .



**Figura V.20.-** Distribución de tamaños con la concentración de  $g\text{-}2DC_{24}\text{-AEDT}$  en: (a) tampón bicarbonato/carbonato de sodio 15mM de pH 10; y (b) tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150mM de pH 10. Las muestras fueron previamente filtradas con filtros de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,45 \mu\text{m}$ . Las experiencias fueron realizadas a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  y los datos recogidos a un ángulo de dispersión de  $90^\circ$ .



**Figura V.21.-** Variación del diámetro hidrodinámico de los agregados del g-2DC<sub>24</sub>-AEDT con el tiempo. Las muestras fueron preparadas en una disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM a pH 10 y filtradas en filtros de 0,45 μm. La temperatura se mantuvo constante a 25°C durante todo el ensayo.

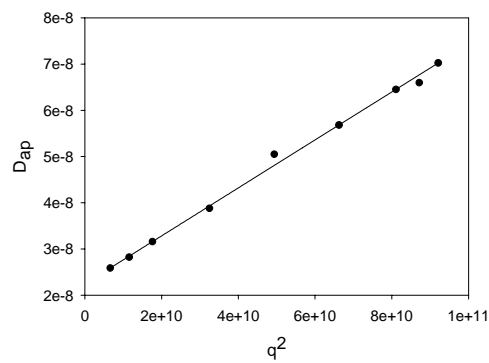
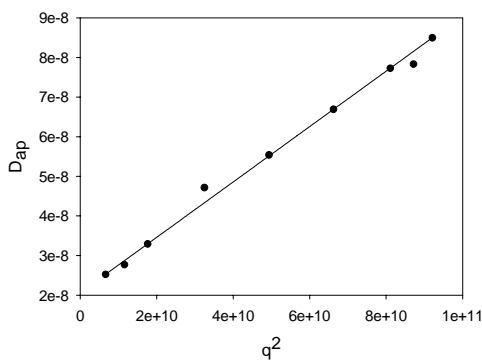
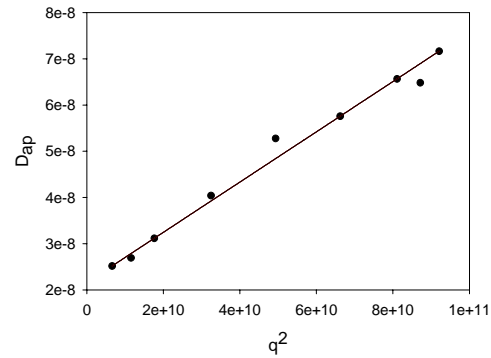
Antes de analizar los resultados SLS es importante comentar las derivaciones del uso de filtros de diferente tamaño de poro. Así, al comparar los datos de intensidad de la luz dispersada por cada muestra en el intervalo de concentraciones 0,05-5 mM (tabla V.4), se observa una pérdida de intensidad clara en las muestras que se pasan a través de filtros de 0,2 μm, que se hace todavía más notable en las disoluciones más diluidas. Teniendo en cuenta que la intensidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de surfactante, en las muestras filtradas en 0,45 μm se obtiene una proporcionalidad casi lineal de la intensidad al aumentar la concentración de *gemini*. Sin embargo, en las filtradas con 0,2 μm, esto no se cumple. Por tanto, el filtro de  $\varnothing_{\text{poro}}$  de 0,2 μm posee un tamaño límite y podría originar distorsión en los resultados debido a la posible pérdida de los agregados de mayor tamaño, al ser éstos retenidos en el filtro. Aunque si puede ser útil en el tratamiento cualitativo de los datos.

La figura V.23 muestra la relación de intensidad de luz dispersada ( $I_{90}$ ) con el LnC. Resalta el hecho de que a concentraciones entre 20 y 100 μM, la intensidad alcanza valores más elevados. Así, por ejemplo, para obtener una relación de intensidad de valor similar a la observada a 30 μM es necesario aumentar la concentración de *gemini* aproximadamente 100 veces, es decir, hasta 3 mM. Con los resultados de QELS en mente, este aumento de intensidad debe ser



consecuencia de la existencia de una única población de  $R_h \sim 114$  nm en ese intervalo de concentraciones.

$$D_{ap} = D_C [1 + C(R_g q)^2]$$



Concentración/ $\mu\text{M}$	$r^2$	$D_C/10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$D_C = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$	$R_h/\text{nm}$
30	0,99	2,16		113,5
45	0,98	2,06		118,8
60	0,99	2,24		109,2

**Figura V.22.-** Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para diferentes muestras de *g*-2DC<sub>24</sub>-AEDT en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM y pH 10: (a) 0,030 mM; (b) 0,045 mM y (c) 0,060 mM.



En definitiva, el perfil de intensidad mostrado en la *figura V.23* refleja el contorno clásico de una transición agregado grande (vesícula) a agregado pequeño (micela). En esta figura también aparece sobreimpresa la isoterma de tensión superficial. Podemos observar que el incremento brusco de la intensidad de la luz dispersada aparece exactamente en el tramo “2” de la curva  $\gamma$ -LnC. A fuerza iónica elevada, de la pendiente de los puntos experimentales de tensión superficial antes del punto donde se alcanza la  $cac_p$  fueron interpretados como la formación de multicapas en la interfase aire-agua. En el segundo tramo (concentraciones entre  $cac_p$  y  $cac$ ), las medidas del área superficial se interpretaron como un transporte hacia el seno de la disolución de porciones de esas multicapas dando lugar a agregados de menor tamaño, aceptando allí que pudiera tratarse de dímeros. Sin embargo, los resultados de *Light Scattering*, sugieren que las multicapas presentes en la interfase aire-agua pueden moverse hacia el seno de la disolución formando vesículas de un modo espontáneo. Por último, a concentraciones mayores de la  $cac$ , tiene lugar un proceso de micelización, de modo que las micelas formadas disuelven parcialmente las vesículas iniciales.

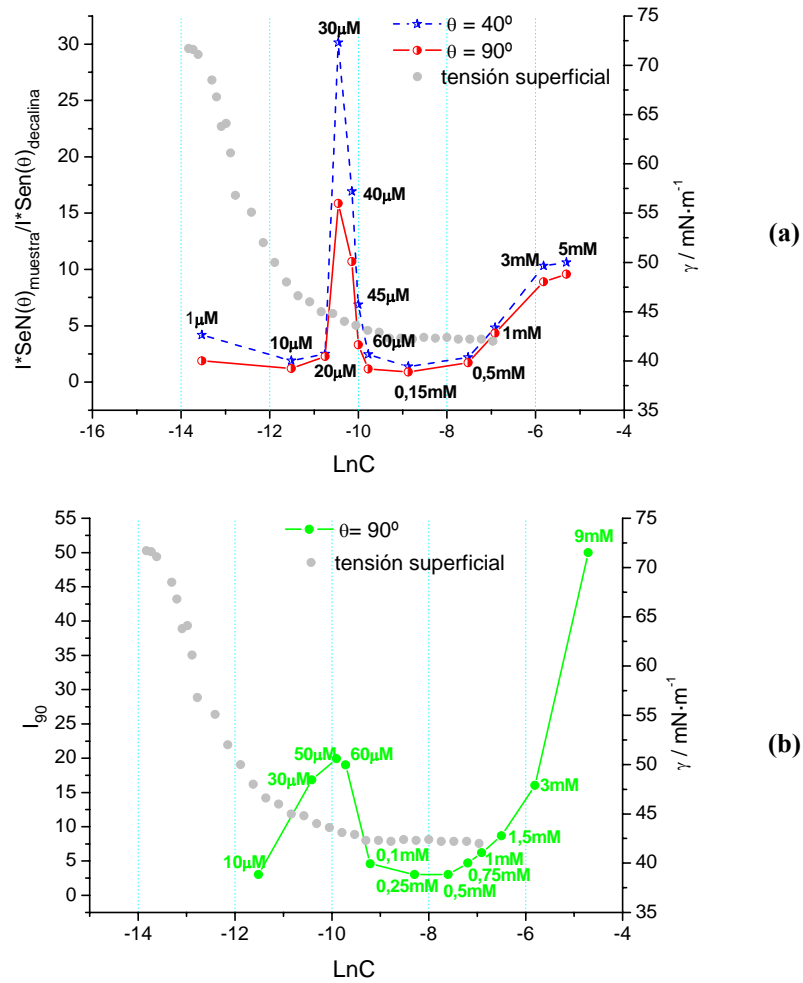
La *figura V.24* muestra otro hecho importante, el resultado obtenido es reproducible independientemente del método utilizado en la preparación de las muestras, bien sea directamente por pesada, o bien por dilución de una más concentrada. Además se descarta la posible pérdida de masa en la fase de filtración de las muestras, ya que ambas curvas se superponen.

En definitiva, las curvas de las *figuras V.23 y V.24* pueden ser analizadas en tres intervalos diferentes. A baja concentración de *gemini*, entre 10 y 50  $\mu\text{m}$ , la relación de intensidad aumenta casi linealmente con la concentración de surfactante, sugiriendo que los agregados aumentan en número cuando la concentración de surfactante aumenta, manteniendo su tamaño constante. En torno a 50-60  $\mu\text{m}$  se alcanza la intensidad máxima y a concentraciones intermedias, 60-150  $\mu\text{m}$ , la relación de intensidad disminuye considerablemente conforme la concentración de surfactante aumenta, lo que sugiere una transformación progresiva de vesículas en micelas. Finalmente, a concentraciones de surfactante elevadas, los únicos agregados presentes son las micelas. En esta región, al aumentar la concentración de surfactante, la intensidad aumenta linealmente debido al aumento de la concentración de micelas. Por todo ello, hemos concluido que el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* sufre un proceso de transición vesícula-micela.

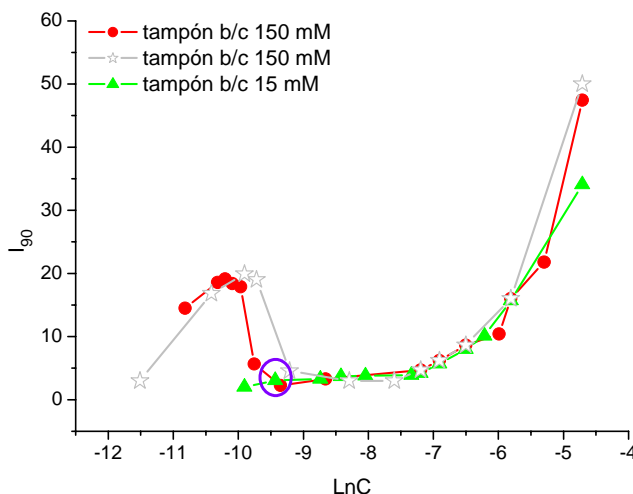
La *figura V.25* muestra el crecimiento de la intensidad de luz dispersada al aumentar la fuerza iónica, modificada mediante la adición de NaCl, aunque, como puede verse en la propia gráfica, la naturaleza de la sal empleada para modificarla



no tiene influencia ya que se obtienen los mismos resultados con NaCl que con una disolución reguladora de bicarbonato/carbonato de sodio.



**Figura V.23.-** (a) Variación de la relación de intensidad a  $\theta=40^\circ$  y  $90^\circ$  con el logaritmo neperiano de la concentración de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. Las muestras se pasaron a través de filtros de  $0,20 \mu\text{m}$ . (b) Variación de la relación  $I_{90}$  para muestras filtradas en  $0,45 \mu\text{m}$ . Todas las muestras fueron preparadas en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM a pH 10 y las medidas fueron realizadas a  $25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ . En las dos gráficas se puede ver sobreimpresa la isoterma de tensión superficial.



**Figura V.24.-** Variación de la relación  $I_{90}$  vs  $\text{Ln}C$  para muestras de  $g\text{-}2DC_{24}\text{-}AEDT$  en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 15mM y 150mM a pH 10. Para el ensayo a mayor fuerza iónica las muestras fueron preparadas por dilución en la propia cubeta de medida (●), e independientemente por pesada (☆). Cada experiencia fue realizada a  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

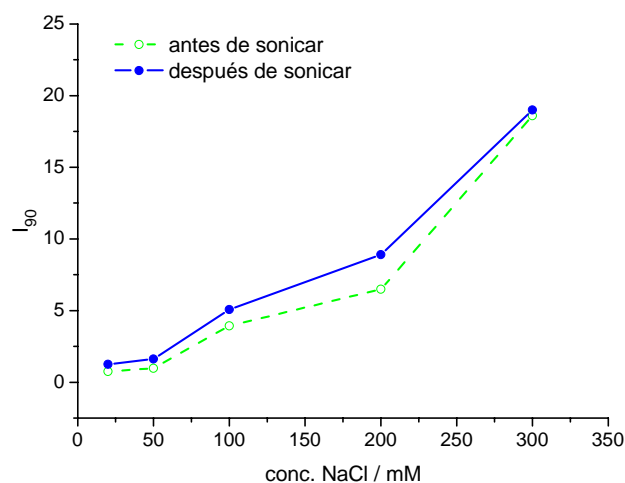
También se estudió la derivación que pudiera tener el hecho de sonicar las muestras. La *figura V.25* muestra el efecto prácticamente nulo que causa la sonicación de las muestras antes de ser medidas. Las muestras se han sonicado durante una hora.

También se estudió la influencia de la temperatura en el proceso de agregación. Así, después de someter una disolución del *gemini* 0,03 mM a un tratamiento térmico a  $37^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  y  $60^\circ\text{C}$  durante una hora, no se observaron cambios apreciables ni en la intensidad ni en el tamaño de los agregados con respecto a la muestra medida a  $25^\circ\text{C}$ .

La determinación de la masa molecular a partir de medidas SLS requiere conocer el incremento del índice de refracción con la concentración,  $dn/dc$ , representándose los datos, usualmente, en forma de diagrama de Zimm. Mediante un refractómetro diferencial, hemos determinado esta variación, resultando un valor de  $dn/dc = 0,168 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ . En el diagrama de Zimm Estático se hace una doble extrapolación a cero (de la concentración y ángulo de medida) pudiendo determinar



la masa molecular del agregado ( $M_w$ ), el radio de giro ( $R_g$ ) y el segundo coeficiente del virial ( $A_2$ ). Con la extrapolación a ángulo de observación cero, el factor de estructura,  $P(\theta)$ , es igual a la unidad. Sin embargo, no ha lugar la extrapolación a concentración nula debido a que tenemos un proceso dinámico de formación y destrucción de vesículas con la concentración.



**Figura V.25.-** Variación de la relación  $I_{90}$  con la fuerza iónica del medio de disolución del  $g-2DC_{24}-AEDT$  para muestras que previamente han sido sonicadas ( $\bullet$ ) o no ( $\circ$ ). La temperatura se mantuvo siempre constante a  $25^\circ\text{C}$  durante.

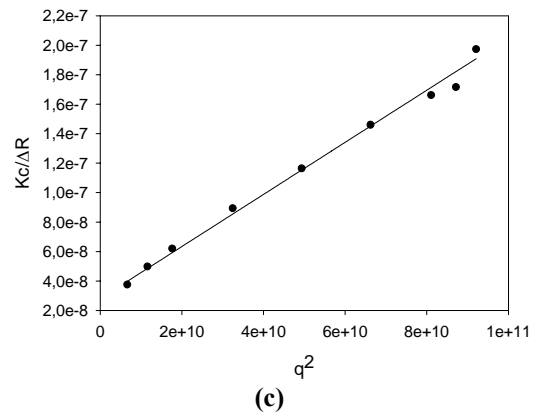
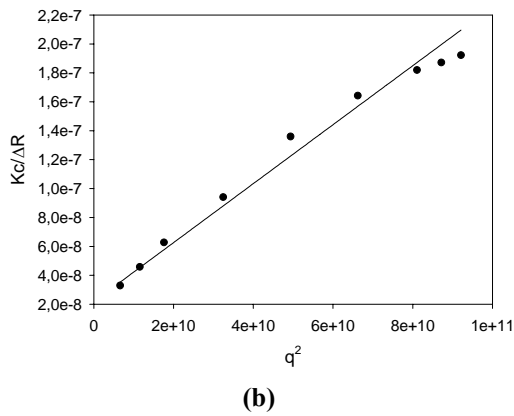
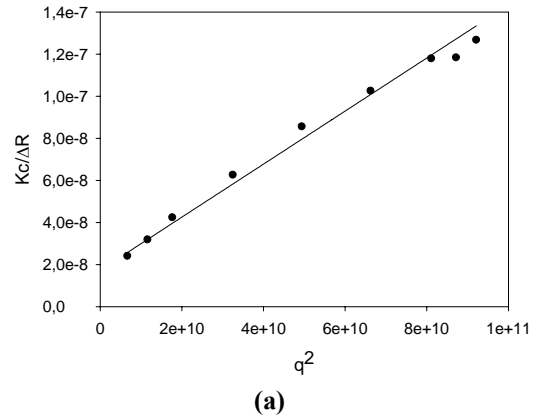
La figura V.26 muestra los resultados obtenidos mediante el método Zimm en el intervalo de concentraciones  $30-60 \mu\text{M}$ , región óptima para la formación de vesículas, en la cual sólo se detectó una población de agregados. En este intervalo se observa una ligera disminución de la masa aparente ( $M_{ap}$ ) a medida que aumenta la concentración del *gemini*, lo que posiblemente sea debido a la destrucción de las vesículas. A partir del radio de giro,  $R_g$ , y del radio hidrodinámico (*vide supra*),  $R_h$ , se obtiene la relación  $\rho = R_g/R_h$ , que toma valores característicos dependiendo de la arquitectura de la partícula.<sup>87</sup> Un valor cercano a la unidad sugiere la formación de capas esféricas<sup>88</sup> como las vesículas.<sup>89-91</sup> A medida que el espesor de la bicapa aumenta, el valor de  $\rho$  se acerca al correspondiente a esferas macizas. El valor medio obtenido para las tres experiencias resultó ser  $\rho=1,3\pm 0,1$ . Debe también tenerse en cuenta que la polidispersidad afecta al valor de  $\rho$ .<sup>87</sup> Además, los valores



Capítulo V

de  $M_{ap}$  de la figura V.26 conducen a un valor medio del número de agregación para la vesícula de  $(4,4 \pm 1,1) \times 10^4$ .

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_{ap}} + \frac{\langle R_g^2 \rangle}{3M_{ap}} q^2$$



Concentración/ $\mu\text{M}$	$r^2$	$M_{ap}/10^7 \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R_g/\text{nm}$	$\rho$
30	0,99	5,8	147,6	1,3
45	0,99	4,6	167,5	1,4
60	0,99	3,6	137,6	1,2

Figura V.26.- Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para diferentes muestras de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM y pH 10: (a) 0,030 mM; (b) 0,045 mM y (c) 0,060 mM.



Una desventaja de la técnica QELS, además de fuerte dependencia de la luz dispersada en función del tamaño de partícula, es su incapacidad para tratar distribuciones polidispersas y multimodales. Un posible examen de los resultados de luz dispersada en presencia de dos o más poblaciones puede ser anómala y dar lugar a una mala interpretación de los resultados, de hecho, la representación formal de una gráfica Zimm puede verse falsificada en un orden de magnitud. Por lo tanto, una correcta determinación de los parámetros estructurales de las especies disueltas requiere el conocimiento de los parámetros individuales. La presunción de que la intensidad es aditiva puede ayudar a la separación de la curva de intensidad siempre que los componentes dominen diferentes secciones de la curva, como es el caso. Entonces, si la curva de intensidad de uno de los componentes es conocida y la masa que lo da también, es posible una estimación cuantitativa.

Con el objetivo de aislar la población más pequeña y definir qué tipo de agregado es, se preparó una muestra de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* 2,6 mM en tampón bicarbonato/carbonato 150 mM y se pasó a través de un filtro de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,03 \mu\text{m}$ . De este modo se consiguió aislar la población de agregados más pequeña, de hecho, los análisis QELS y SLS apuntaron la única existencia de agregados micelares, sin rastro de los agregados de mayor tamaño. Esto nos demuestra una situación de no equilibrio entre las dos poblaciones, pudiendo considerar al agregado de mayor tamaño como vesículas del tipo espontáneas. Aplicaremos a este agregado de menor tamaño la ecuación simplificada V.11, en la que se ha eliminado la dependencia angular.

$$\lim_{c \rightarrow 0} \Delta R_{\theta} = KMc \quad [\text{V.11}]$$

Por razones prácticas, el ángulo de dispersión más frecuentemente recurrido es el de  $90^{\circ}$ . A este ángulo la relación de intensidad fue de 1,98. Teniendo en cuenta que la intensidad de este agregado suponía un 30% de la intensidad total dispersada por la muestra cuando la muestra era filtrada con un filtro de tamaño mayor, podemos ver que es un dato que presenta bastante concordancia con el dato actual ya que representa un 20% de la intensidad de la muestra original. Además, debemos indicar que la masa que pertenece a la muestra filtrada es un 81% de la masa inicial. El valor de intensidad implica un valor de  $\Delta R_{90}=1,35 \times 10^{-5}$  que conduce a una masa micelar  $M=1,29 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , o lo que es lo mismo, a un número de agregación de aproximadamente 12. Por otra parte, mediante QELS hemos obtenido el radio hidrodinámico de la micela, resultando ser 2,6 nm, con una polidispersidad de 0,14.

Estos parámetros nos permiten diferenciar claramente entre la naturaleza de los dos tipos de agregados. Los datos del párrafo anterior permiten determinar



una densidad del agregado de  $0,28 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , habiendo supuesto en el cálculo que el agregado es esférico cuyo radio es el radio hidrodinámico. Para el cálculo de la densidad del agregado de mayor tamaño podemos utilizar los valores medios de la masa molecular aparente ( $=4,7 \times 10^7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y del radio de giro ( $=151 \text{ nm}$ ) de la *figura V.26*, considerando, una vez más, que la geometría del agregado es esférica. La aproximación de que el radio de la esfera es igual al radio de giro es exacta en el límite de un espesor infinitésimo de la capa de la vesícula. Con los anteriores datos resulta una densidad igual a  $5,4 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ , que es 500 veces inferior a la del agregado pequeño. Este último valor está acorde con los determinados para otras vesículas de diversa naturaleza.<sup>89</sup>

### Medidas de potencial zeta

Un *gemini* aniónico da lugar a un agregado en disolución cargado negativamente, lo que crea un potencial eléctrico relativo a la disolución, que adquiere su valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, alcanzando un valor próximo a cero fuera de la capa difusa. La caída de potencial y la distancia desde el agregado, es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como *potencial zeta* y puede ser medido de manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no. La *tabla V.5* muestra los resultados obtenidos. Además de observar un valor negativo en el intervalo de concentraciones que aparece en la *tabla V.5*, como cabría esperar al tratarse de un *gemini* aniónico, hay que resaltar que precisamente el valor de mayor carga negativa se da a una concentración de tensioactivo de 30-40  $\mu\text{M}$  a la cual se forman las vesículas.

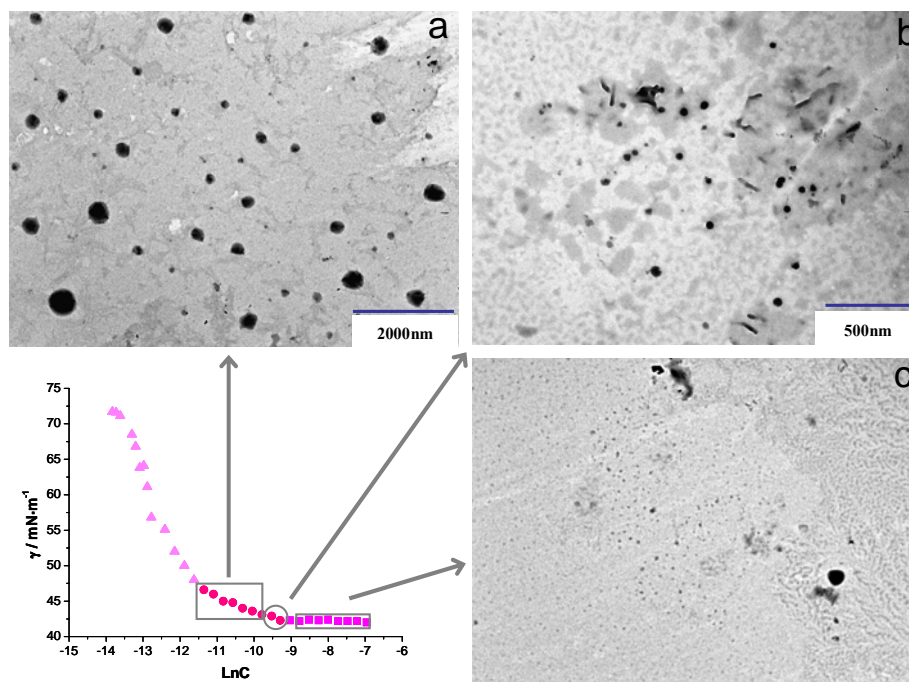
Tabla V.5.- Datos de Potencial Zeta para disoluciones de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*.

Concentración/mM	Potencial Zeta/mV
0,99	-18,52
0,54	-5,11
0,14	-20,91
0,04	-31,56
0,03	-30,82
0,02	-15,18



### Microscopía Electrónica de Transmisión del $g\text{-}2DC_{24}\text{-}AEDT$

Para las medidas TEM se han preparado muestras de diferente concentración de  $g\text{-}2DC_{24}\text{-}AEDT$  en agua deuterada (para evitar el posible crecimiento bacteriano) y en presencia de electrolito con el fin de corroborar la transición vesícula-micela al aumentar la concentración del *gemini* y confirmar así las medidas de dispersión de luz. Se han tomado imágenes de tres muestras a las concentraciones características de las tres zonas estudiadas en los párrafos anteriores, y que, nominalmente son 1; 0,2 y 0,05 mM. La *figura V.27* resume los resultados obtenidos.

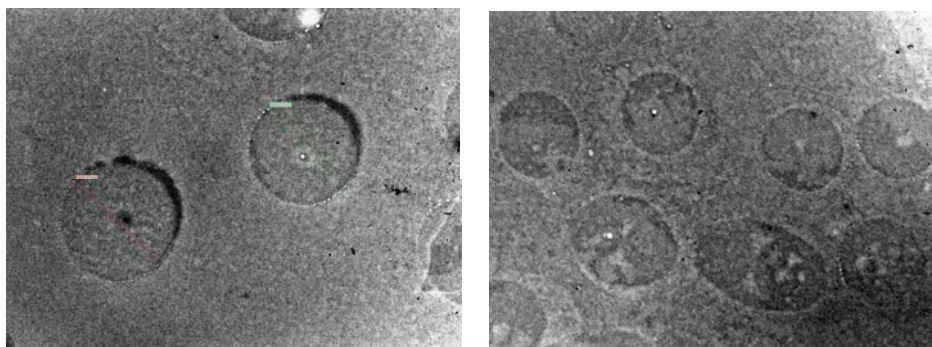


**Figura V.27.-** Imágenes TEM del  $g\text{-}2DC_{24}\text{-}AEDT$ : **(a)** 0,05 mM; **(b)** 0,2 mM y **(c)** 1 mM. En la curva  $\gamma$  vs  $\text{Ln}C$  se indican los tres tramos de diferente pendiente de la isoterma.



En la imagen (c) correspondiente a la concentración 1 mM, apenas se puede distinguir un pequeño punteado en la rejilla que bien podría ser característico de un agregado micelar pequeño, pero no se observan agregados de gran tamaño. En la imagen (b), obtenida partiendo de una concentración 0,2 mM, comienzan a distinguirse unos agregados de mayor tamaño, de diámetro aproximado entre 40-60 nm. Ya por último, en la imagen (a), correspondiente a la concentración 0,05 mM, se puede observar que la rejilla presenta agregados de aspecto globular con un diámetro comprendido entre 200-400 nm, lo que da idea de bastante polidispersidad o de que se ha producido un fenómeno de fusión de los diferentes agregados por el efecto de concentración de muestra que lleva inherente la preparación de las muestras.

Hemos extendido este estudio a una concentración más elevada, 8mM en agua deuterada. La muestra fue calentada a 45°C durante una semana. La *figura V.28* muestra las imágenes TEM obtenidas, en las que se puede observar la existencia de agregados gigantes, de diámetro comprendido entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura V.28.-** Fotos TEM de una muestra de *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* 8 mM en D<sub>2</sub>O a 45°C durante una semana. El diámetro de estos agregados oscila entre 3-3,5  $\mu\text{m}$ .

El tamaño y forma de estos agregados recuerdan a los obtenidos por Peresykin y Menger<sup>5</sup> para un *gemini* zwitteriónico (*figura V.29*). Estos autores han aceptado que tales imágenes corresponden a un coacervado. Recordemos que por tal se entiende una disolución coloidal inmiscible con su propio disolvente.<sup>92</sup>



Tradicionalmente, los coacervados se obtienen por medio de una mezcla de polielectrolitos con surfactantes.<sup>93</sup> Que un compuesto simple como el que nos ocupa, pueda dar lugar a una fase acuosa incompatible con el agua es un hecho bastante notable.

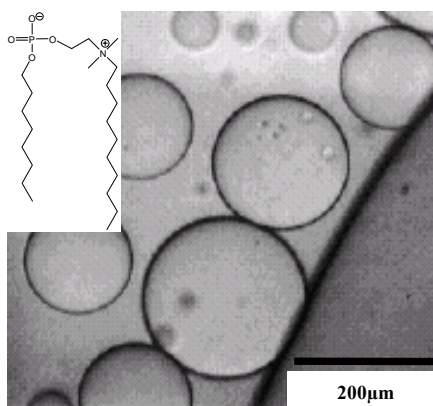


Figura V.29.- Imagen de coacervados.<sup>5</sup>

Este efecto, con la temperatura y el tiempo, no se ha podido demostrar por *Light Scattering*, ya que no se ha observado cambio alguno con respecto a la disolución inicial a 25°C. Posiblemente el efecto de concentrar la muestra durante la preparación de muestra para la medida TEM tenga influencia en la aparición o no del coacervado.

Se ha sintetizado un nuevo agente surfactante de estructura de *gemini*, derivado del ácido desoxicólico, al que abreviadamente hemos denominado como *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*, que muestra una alta tendencia a agregarse a baja concentración y que da lugar a la formación de micelas, vesículas y, posiblemente coacervados a altas concentraciones. Todas estas propiedades lo hacen atractivo desde el punto de vista de posibles aplicaciones prácticas.

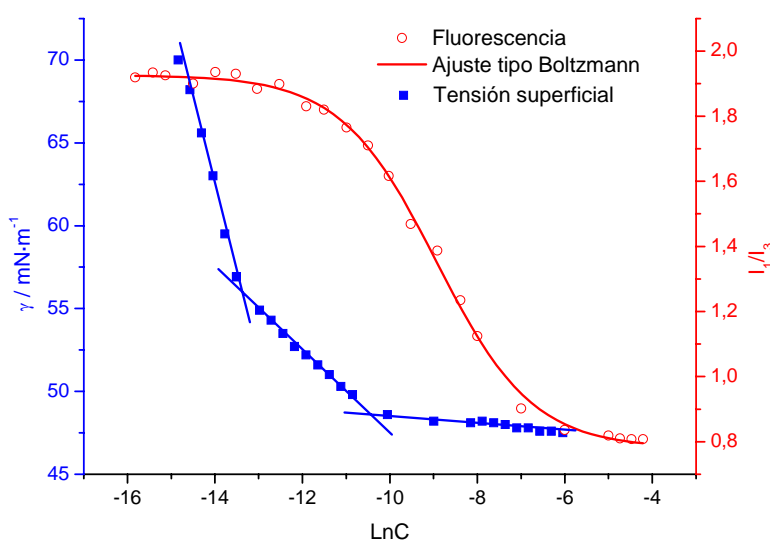
### V.3.- GEMINI *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*

La diferencia estructural entre este *gemini* y el que hemos venido estudiando hasta ahora, es que se ha cambiado el ácido biliar de partida: del ácido



desoxicólico al ácido cólico. En definitiva, existe un grupo hidroxilo adicional en cada grupo esteroide, concretamente en la posición 7 del anillo B.

Podemos adelantar que los resultados experimentales obtenidos para este *gemini*, *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*, son muy similares a los del *gemini g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. La figura V.30 muestra los resultados experimentales de las medidas de tensión superficial y la relación  $I_1/I_3$  del pireno solubilizado frente al LnC.



**Figura V.30.-** Determinación del valor de *cac* del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* por medidas de tensión superficial y por medidas de fluorescencia del pireno solubilizado en la disolución del *gemini*. Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Analicemos en primer lugar los datos de fluorescencia. El valor mínimo para la relación  $I_1/I_3$  es de 0,81, muy similar al obtenido por Ueno *et al*<sup>51,94</sup> para el pireno solubilizado en las micelas de colato sódico. Por lo tanto, los dos *gemini* sintetizados hasta ahora ofrecen al pireno ambientes polares idénticos a los de sus respectivas sales biliares de partida. Como en el caso de las sales biliares nativas, el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* ofrece un ambiente más apolar que el *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*. También debemos destacar que la curva  $I_1/I_3$  vs LnC muestra el mismo patrón, ya comentado para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. Por ello, la curva fue ajustada a una ecuación tipo



Boltzmann, habiéndose obtenido los resultados que se recogen en la *tabla V.6*. Como  $|x_0/\Delta x| < 10$ , el valor correcto para la *cac* debería ser  $cac_2$ , que discrepa bastante con el valor obtenido por medidas de tensión superficial (*vide infra*). Sin embargo, dada su proximidad a 10, se podría considerar como correcto el valor de  $cac_0$ , que aún es dos veces superior al de tensión superficial, con lo que entran en juego posibles errores de sobreestimación ya mencionados.

**Tabla V.6.-** Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* (T=25,0±0,5°C).

N	$x_0$	$\Delta x$	$r^2$	$cac_0/\mu\text{M}$	$cac_2/\text{mM}$	$A_2$	$A_{2\text{exp}}$	$ x_0/\Delta x $
23	-8,93	1,10	0,9982	132,35	1,19	0,78	0,81	8,12

La curva de tensión superficial es muy similar a la del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. Aparecen de nuevo tres tramos rectos cuyas pendientes disminuyen a medida que aumenta la concentración de tensioactivo, resultando en los dos puntos de corte  $cac_p$  y  $cac$ . La *tabla V.7* resume los datos obtenidos incluyendo las áreas por molécula de cada tramo. Es evidente que el valor de la *cac* es muy inferior al valor de la *cmc* para el colato sódico,<sup>64</sup> reducción que puede estimarse en un factor de 150 ó 500 veces, dependiendo de que utilicemos el valor experimental obtenido por fluorescencia o el obtenido por tensión superficial. Cabe mencionar también que el valor de *cac* obtenido para este *gemini* es inferior al obtenido para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* estudiado en el apartado anterior.

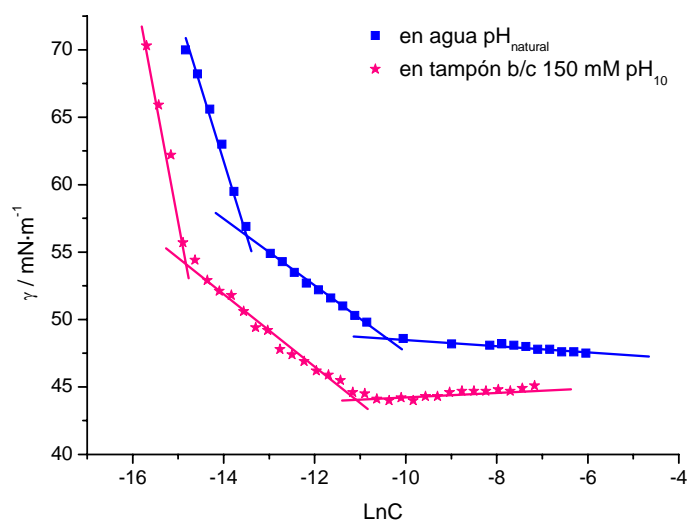
**Tabla V.7.-** Datos experimentales desde los distintos tramos de las isotermas de tensión superficial del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* en agua y en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM a pH 10. (T=25,0±0,5°C). <sup>a</sup>mol·m<sup>-2</sup>; <sup>b</sup>Å<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>μM; <sup>d</sup>mN·m<sup>-1</sup>. N = número de puntos experimentales; b/c=bicarbonato/carbonato.

Disolvente	N	$10^6 \cdot \Gamma_1^a$	$a_1^b$	$cac_p^c$	$10^6 \cdot \Gamma_2^a$	$a_2^b$	$cac^c$	$\gamma_{cac}^d$
agua pH <sub>natural</sub>	20	1,5	113,9	3,3	0,32	512,1	53,2	48,1
tampón b/c 150 mM pH <sub>10</sub>	33	5,9e <sup>-6</sup>	27,9	0,5	1,0	159,2	16,2	44,0



La *figura V.31* muestra la dependencia de la tensión superficial con la concentración de *gemini* en ausencia y en presencia de electrolito (procedente del regulador bicarbonato/carbonato utilizado). Las gráficas son prácticamente idénticas, estando la realizada en disolución reguladora desplazada hacia valores más bajos de concentración y de tensión superficial, teniendo como consecuencia menores valores de  $\gamma_{cac}$  y  $cac$ .

La similitud de estas gráficas con las correspondientes al *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*, así como los resultados recogidos en la *tabla V.7*, sugieren que todo lo mencionado para aquel *gemini*, referente a su disposición en la superficie y a la existencia de una etapa de premicelización, es de aplicación para el *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*. Por ejemplo, cuando se disuelve en agua, este *gemini* se ubicará en la interfase aire-agua en disposición vertical, mientras que en presencia de sales, aparecerán las multicapas. También cabe resaltar que el área en el primer tramo,  $a_1$ , sigue siendo muy inferior al teórico que le correspondería al *gemini*, e incluso es mucho menor que el correspondiente al colato sódico.



**Figura V.31.-** Gráficas  $\gamma$ -LnC del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* con y sin fuerza iónica añadida ( $T=25,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ).



**Caracterización estructural de los agregados del g-2C<sub>24</sub>-AEDT en disolución acuosa. Medidas de QELS y DLS**

La *tabla V.8* recoge conjuntamente los resultados de las medidas de *Light Scattering* en modo dinámico (QELS) y estático (SLS) para muestras de g-2C<sub>24</sub>-AEDT de diferente concentración. Siguiendo el ejemplo del g-2DC<sub>24</sub>-AEDT, las disoluciones fueron preparadas en el regulador bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM a pH 10 y fueron filtradas a través de filtros de Ø<sub>poro</sub>=0,45 µm.

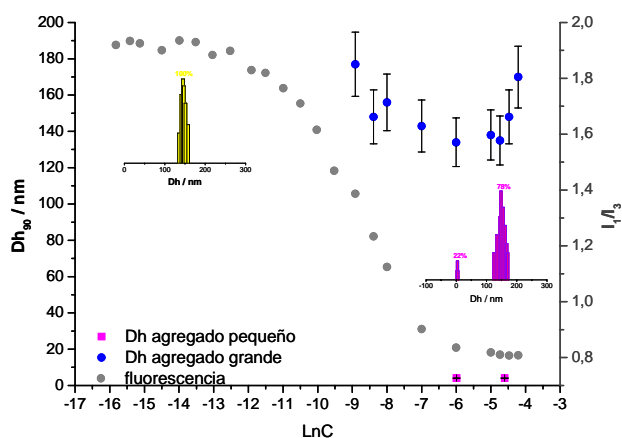
**Tabla V.8.-** Resultados de las medidas QELS y SLS realizadas para el g-2C<sub>24</sub>-AEDT a fuerza iónica constante (F.I.=300 mM). Las muestras fueron filtradas a 0,45 µm. Los ensayos fueron seguidos durante 18 días. Dh<sub>90</sub>=diámetro hidrodinámico a θ=90°; I<sub>90</sub>=I\*Sen(90°)<sub>muestra</sub>/I\*Sen(90°)<sub>decalina</sub>. σ=polidispersidad. Medidas realizadas a 25,0±0,5°C.

C/mM	t0			t3d		t6d	t18d
	I <sub>90</sub>	Dh <sub>90</sub>	σ	I <sub>90</sub>	Dh <sub>90</sub>	I <sub>90</sub>	I <sub>90</sub>
10		4-155	0,35				
2,5	23,51	4-148	0,26	47,73	395	95,42	116,07
1,0	9,11	135	0,24				
0,50	3,95	138	0,29	20,47	637	17,27	11,04
0,30	3,10	134	0,25	14,75	670	14,15	22,33
0,20	2,82	143	0,30	14,62	737	9,19	17,96
0,15	2,60	156	0,30	16,36	1125	18,32	16,87
0,10	2,16	148	0,40	44,42	1418	59,92	24,09
0,05	2,20	147	0,41	44,79	1582	30,77	16,85

Como sucedía con el *gemini* del desoxicolato, la *figura V.32* muestra una distribución de tamaños monomodal en las disoluciones más diluidas, en torno a 150 µM, mientras que a mayores concentraciones la distribución de tamaños es bimodal (concentración de *gemini* de la muestra señalada 2,5 mM). Así, aparece una componente principal a ~5 nm y otra a ~150 nm. Aunque el agregado de mayor tamaño representa un 78% del total de la luz dispersada, en realidad, la cantidad de masa representada por este agregado es solo un 0,01% de la total



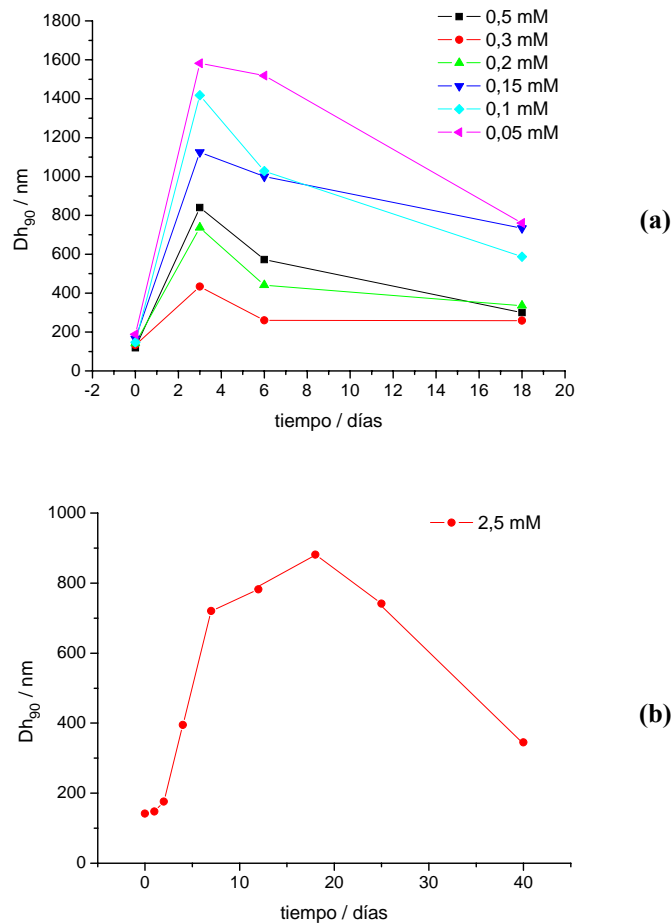
debido a que la intensidad es proporcional a la masa molecular, la cual aumenta con el (radio).<sup>3</sup> Este es el patrón que siguen todas las muestras de concentración superior al valor *cac*. Por otra parte, anticipándonos a los resultados obtenidos por SLS podemos adelantar que el patrón de intensidad no se corresponde con el proceso de transición vesícula→micela que hemos visto para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*.



**Figura V.32.-** Distribución de tamaños en función de la concentración de *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* en bicarbonato/carbonato de sodio 150mM a pH 10. Cada muestra fue filtrada a través de filtros de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,45 \mu\text{m}$  y medida a  $25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$  y a un ángulo de dispersión de  $90^\circ$ .

Este *gemini* presenta un comportamiento diferente a su análogo del desoxicolato, siendo su evolución con el tiempo lo que claramente los diferencia. La *figura V.33* muestra la variación con el tiempo del radio hidrodinámico para el *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* a diferentes concentraciones, lo que sugiere un crecimiento de los agregados. La polidispersidad también aumenta con la concentración (*tabla V.8*).<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Los tamaños obtenidos experimentalmente pueden acarrear un error en el caso de que la precipitación sea relativamente más rápida que el movimiento Browniano de tales partículas, pues los coeficientes de difusión se ven afectados por la velocidad de precipitación. Teniendo en cuenta que la distribución de tamaños se obtiene a través de estos coeficientes, los tamaños obtenidos experimentalmente son menores que la distribución real. De cualquier modo, como el crecimiento vesicular se analiza de manera cualitativa no se va a tener en cuenta esta cuestión.



**Figura V.33.-** Variación del diámetro hidrodinámico cumulante a  $\theta=90^\circ$  por envejecimiento de las muestras de  $g-2C_{24}-AEDT$  en bicarbonato/carbonato 150 mM a pH 10. **(a)** concentración de *gemini* inferior al valor  $cac_2$  experimental; **(b)** concentración de *gemini* superior al valor  $cac_2$ . Las disoluciones del tensioactivo fueron filtradas a través de filtros de  $\varnothing_{poro}=0,45 \mu\text{m}$  y medidas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

El análisis de las gráficas anteriores deja entrever que el comportamiento de este *gemini* es complejo ya que las muestras más diluidas (concentración  $< 0,5$  mM) son las que, en un tiempo menor, alcanzan un mayor tamaño, aumentando



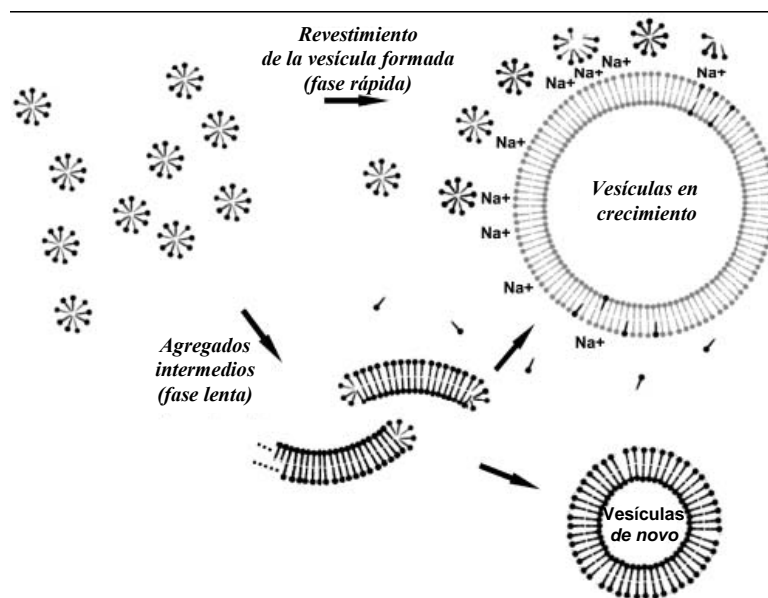
éste con la dilución de la muestra. Asimismo, podemos observar que una vez alcanzado el máximo del parámetro objeto de análisis (bien el tamaño o posteriormente la intensidad), éste disminuye. Esto es debido a la aparición de precipitado en las cubetas. En concordancia con los datos de luz dispersada este precipitado se hace visible en menor tiempo para las muestras más diluidas. Las teorías clásicas sobre la cohesión de vesículas establecen una competición entre las fuerzas atractivas de van der Waals y las repulsivas electrostáticas, que deberían tener bastante repercusión tratándose de un *gemini* di-aniónico. También existe otro factor a tener en cuenta que es el denominado como fuerzas de hidratación, siendo esta última fuerza la principal barrera, situada a unos 3 nm, en la aproximación de membranas lipídicas. Menger y Peresykin<sup>30</sup> han propuesto un modelo para la cohesión de vesículas constituidas por *gemini* a través de fuerzas hidrófobas entre las cadenas alifáticas de los *gemini*. Si predominaran las fuerzas repulsivas, no se produciría la cohesión, mientras que si el componente de cohesión en el proceso de agregación es elevado, se producirá un apilamiento de las vesículas con la posibilidad de precipitación, que no suele ser un proceso deseado.

No es fácil la realización de un análisis profundo del proceso de crecimiento de estos agregados, posiblemente vesículas. La existencia de dos zonas de concentración, una con distribución monomodal y otra con distribución bimodal, presentando ambas un modelo de crecimiento diferente, sugiere la no existencia de un mecanismo simple que pueda explicar todos los datos obtenidos. Las imágenes TEM que visualizaremos más adelante también deben ser tenidas en cuenta a la hora de proponer la estructura final de los agregados.

Aunque no podamos interpretar cuantitativamente el proceso de crecimiento de los agregados, podemos inferir parte del proceso a partir de los estudios de Walde *et al*<sup>95</sup> y de Chen y Szostak,<sup>96</sup> referidos a vesículas de ácidos grasos. Ellos proponen que las vesículas de ácidos grasos crecen espontáneamente cuando se le añaden micelas. Para explicar este crecimiento, se pueden plantear, en principio, dos mecanismos. Así, la vesícula podría crecer debido a una fusión directa entre la micela y la vesícula (mecanismo de fusión directa). En este caso, es de esperar que la velocidad inicial de crecimiento sea proporcional a la concentración de micelas. El segundo de los mecanismos, contempla el crecimiento de las vesículas por la incorporación de moléculas de ácido graso libres, procedentes de las micelas. Ahora, aceptando que la concentración de monómeros se mantenga constante e igual a la *cmc*, la velocidad de crecimiento será independiente de la concentración de micelas. Sin embargo, al observar que el crecimiento de las vesículas ocurre en dos fases (lenta y rápida), Chen y Szostak sugieren un mecanismo más complejo según el cual la incorporación de las



moléculas de ácido graso a las vesículas ya existentes tendría lugar por dos caminos que se esquematizan en la *figura V.34*. Debemos destacar que la fase lenta implica la formación de agregados intermedios a partir de las micelas, los cuales, posteriormente, pueden incorporarse a una vesícula pre-existente (aumentando su tamaño) o generar una nueva. Este mecanismo, que implica etapas sucesivas, podría explicar la existencia de un periodo de inducción como el observado experimentalmente (*figura V.33.b*).

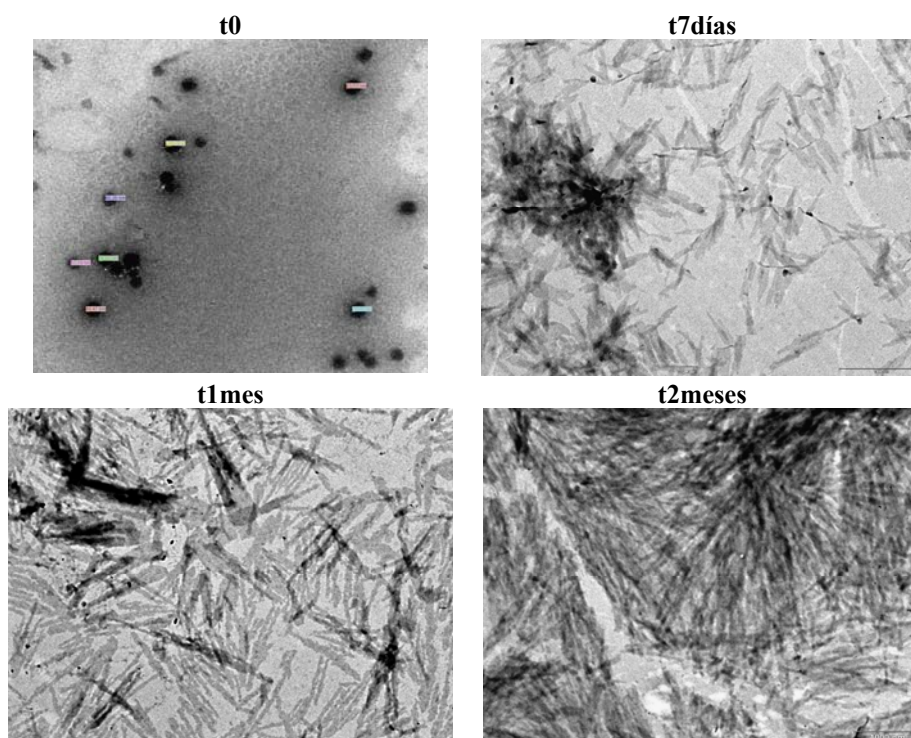


**Figura V.34.-** Mecanismo de crecimiento de vesículas de ácidos grasos a partir de micelas propuesto por Chen y Szostak.<sup>96</sup> La formación de agregados intermedios explicaría la existencia de un mecanismo de crecimiento de las vesículas lento.

En nuestro caso, las imágenes TEM (*figura V.35*) no evidencian la formación de vesículas esféricas gigantes sino más bien estructuras filiformes entrecruzadas que propician la formación de geles. Por este motivo, las vesículas deben seguir evolucionando hacia estas estructuras finales filiformes, posiblemente siguiendo un mecanismo como el observado por Soto *et al.*<sup>97</sup> Como alternativa a su incorporación a las vesículas, estas estructuras intermedias podrían originar directamente las estructuras filiformes. Además, la formación de estas estructuras

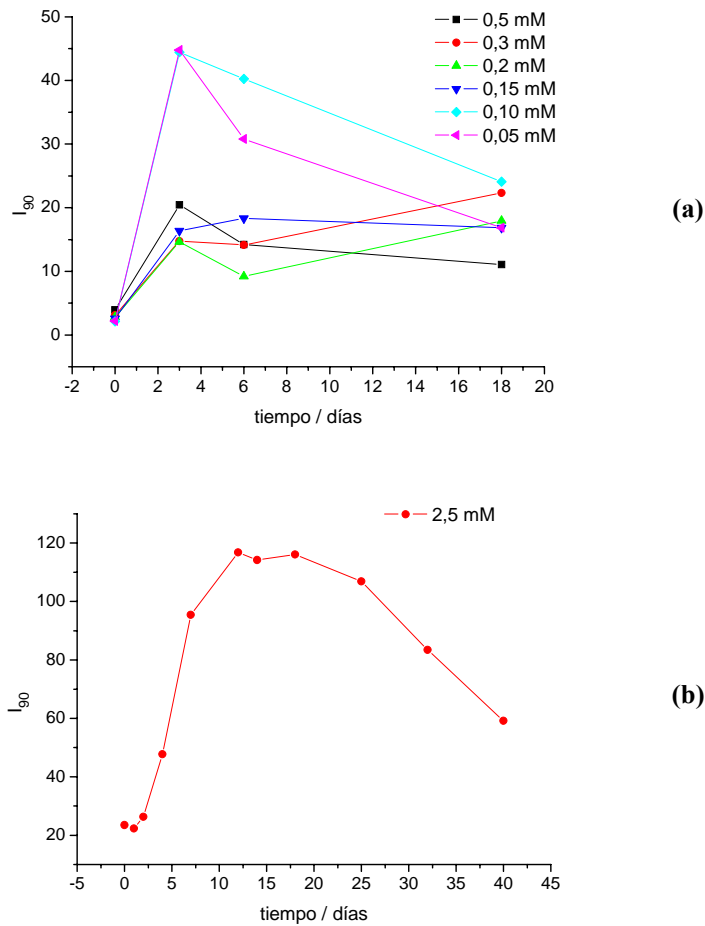


gigantes podría explicar la observación de precipitado en la cubeta de medida al final del proceso de crecimiento en consonancia con la disminución de la intensidad de luz dispersada, que sigue la misma pauta observada mediante QELS (figura V.33).



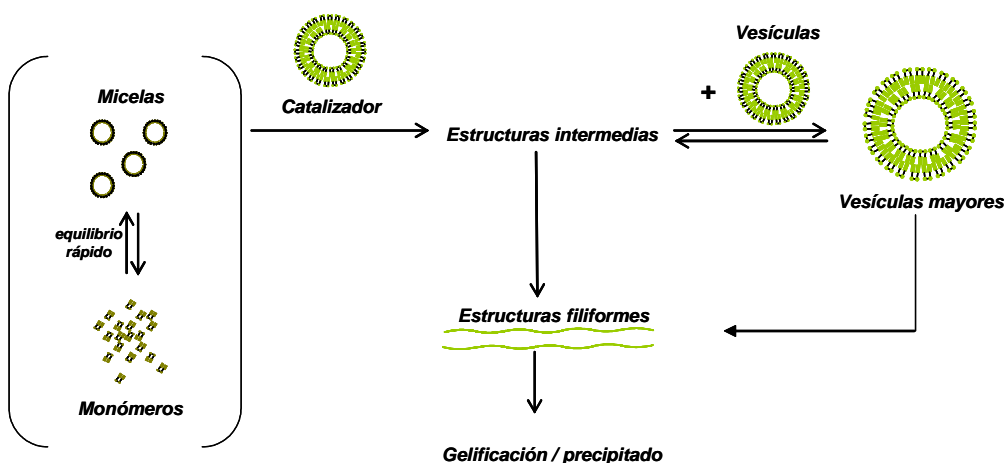
**Figura V.35.-** Imágenes TEM del *gemini g-2C<sub>24</sub>-AEDT* obtenidas transcurrido el tiempo indicado en cada foto desde la preparación de la muestra. Confirman la formación de vesículas esféricas inicialmente (diámetro medio de 80 nm), estructuras filiformes y formación final de geles.

Efectivamente, la *figura V.36* pone de manifiesto que una vez alcanzado el máximo, la intensidad comienza a disminuir y, como ya hemos indicado, sería debido a la precipitación de los agregados en disolución. Por QELS hemos observado tamaños de partículas con diámetros hidrodinámicos superiores a  $\sim 1 \mu\text{m}$ , las cuales, usualmente, tienden a precipitar, como sería nuestro caso.



**Figura V.36.-** Variación de la relación de intensidad muestra-decalina a  $\theta=90^\circ$  por envejecimiento de las muestras de  $g-2C_{24}-AEDT$  en bicarbonato/carbonato 150 mM a pH 10. **(a)** concentración de *gemini* inferior al valor  $cac_2$  experimental; **(b)** concentración de *gemini* superior al valor  $cac_2$ . Las disoluciones del tensioactivo fueron filtradas a través de filtros de  $\varnothing_{poro}=0,45 \mu\text{m}$  y medidas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Sin ánimo de que sea considerado cuantitativo, el mecanismo de la *figura V.37* recoge los hechos fundamentales hasta ahora comentados.



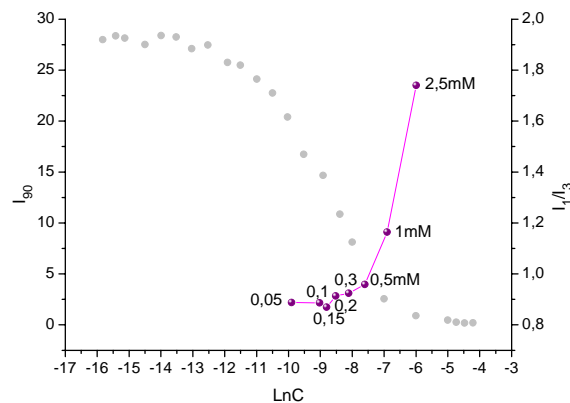
**Figura V.37.-** Mecanismo de crecimiento para los agregados de  $g-2C_{24}-AEDT$  que explica cualitativamente la existencia de un periodo de inducción, la formación de agregados filiformes y la precipitación final de los mismos.

A diferencia de lo que sucedía con el  $g-2DC_{24}-AEDT$ , no parece existir una transición vesícula→micela ya que la intensidad de la luz dispersada aumenta con la concentración (figura V.38).

Para finalizar este estudio de *Light Scattering*, se llevó a cabo una última experiencia en la que se filtró una muestra concentrada del *gemini* del colato (3 mM en disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM) en un filtro de tamaño de poro pequeño (0,03 $\mu$ m) con el fin de aislar la población de los agregados más pequeños. Después de realizar las medidas de *Light Scattering*, se concentró el filtrado en un rotavapor para conocer exactamente la cantidad de masa perdida en la filtración y poder así estimar aproximadamente la masa aparente del agregado y su número de agregación. En este caso la cantidad de masa que atraviesa el filtro y que representa a la micela es un 72% de la inicial. El diámetro hidrodinámico medido fue de 5,0 nm y la relación de intensidad a 90° fue  $I_{90}=1,85$ . Con lo que la masa molecular aparente del agregado más pequeño es  $1,3 \times 10^4$  g/mol y por tanto el número de agregación 12. Una característica importante de las micelas obtenidas es que éstas permanecen invariables con el tiempo, ya que la misma muestra se ha dejado envejecer durante 20 días y no se ha observado cambio apreciable ni en la intensidad de luz dispersada ni en el tamaño de las



micelas. Esto parece indicar que las vesículas actuarían como catalizadores<sup>95</sup> de los procesos de agregación.



**Figura V.38.-** Relación de intensidad de luz dispersada a  $\theta=90^\circ$  para las medidas SLS del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* en disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 150 mM y pH 10. Las experiencias fueron realizadas a  $25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$  previa filtración de cada una de las muestras a través de filtros de  $\varnothing_{\text{poro}}=0,45 \mu\text{m}$ .

Comparando los resultados de *Light Scattering* de la zona bimodal de los dos *gemini*, se puede observar que a igual concentración la intensidad de luz dispersada es mayor para el *gemini* del colato. Si se tiene en cuenta que tanto el agregado pequeño como el grande poseen tamaños similares en ambos surfactantes, se podría decir que el agregado de mayor tamaño se forma en mayor cantidad para el *gemini* del colato.

#### V.4.- BREVE INTRODUCCIÓN A LOS CRISTALES LÍQUIDOS

El comportamiento de un compuesto como *crystal líquido* fue descrito por primera vez por el botánico austríaco Reinitzer<sup>98</sup> en 1888 al encontrar que algunos derivados del colesterol parecían tener dos puntos de fusión. Más concretamente, observó que el sólido se transformaba en un líquido turbio al ser calentado a  $145^\circ\text{C}$  y que éste, a su vez, se convertía en un líquido totalmente claro y transparente a  $179^\circ\text{C}$ . Al realizar el proceso de un modo inverso, es decir, enfriando el líquido



transparente, observó las mismas temperaturas de transición. Correctamente, Reinitzer concluyó que la sustancia en realidad exhibía dos cambios o transiciones de fases sucesivas.

Poco después de estas primeras observaciones (1889), el cristalógrafo alemán F. Lehmann descubrió que el líquido turbio intermedio entre los cristales y el líquido transparente poseía propiedades ópticas y una estructura molecular muy parecida a la de un cristal sólido, acuñando el nombre de *cristal líquido*. Ninguno de estos investigadores era consciente de que habían descubierto un nuevo estado de la materia: las fases intermedias o mesofases y las moléculas que ofrecen este comportamiento mesógenas.

A pesar de que inicialmente los *cristales líquidos* despertaron gran interés y fueron muy estudiados durante el primer tercio del siglo pasado, pronto quedaron relegados a un rincón de la física, cayendo en el olvido y subsistiendo sólo como curiosidad de laboratorio. Diversos factores contribuyeron a esta pérdida de interés. Entre ellos cabe mencionar el prejuicio, fuertemente arraigado en el hombre desde la remota antigüedad, según el cual los estados gaseoso, líquido y sólido describen todas las posibles fases de la materia. Esta actitud, aún no superada en los años treinta del siglo pasado, conlleva naturalmente un rechazo a la dualidad sólido-líquido exhibida por los *cristales líquidos*. En consecuencia no es de extrañar que la aparente ambigüedad en el punto de fusión descubierta por Reinitzer se atribuyera únicamente a la presencia de "impurezas" en el sistema.

El *cristal líquido* es un tipo especial de estado de agregación de la materia que tiene propiedades de las fases líquida y sólida. Al tacto, se sentiría como jabonoso y pegajoso, con una sensación análoga a la que produce la mezcla pegajosa que se encuentra en el fondo de un recipiente de jabón. En realidad, este último es un genuino *cristal líquido*, no muy diferente del material de una pantalla de un ordenador portátil. En un sólido, las moléculas se encuentran rígidamente pegadas unas a otras y (al menos en la mayoría de sólidos) existe alguna clase de estructura regular, algún patrón en el que se encuentran ordenadas. El término "cristal" implica por lo tanto orden posicional y orientacional, mientras que en el líquido no hay ningún tipo de orden salvo el de corto alcance. En un *cristal líquido*, hay un cierto grado de orden orientacional y, en ciertos casos, un orden posicional mínimo. Se puede decir que se trata de un fenómeno supramolecular que se basa en la existencia de interacciones débiles entre las moléculas. Generalmente, para que estas interacciones sean suficientemente importantes, es necesario que las moléculas tengan formas anisótropas, lo que da lugar a un empaquetamiento eficaz.

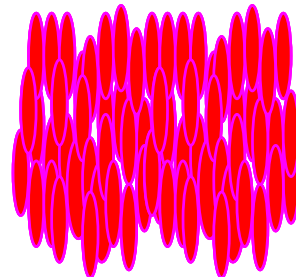


Los materiales isotrópicos son materiales cuyas propiedades no dependen de la dirección en que se miden. Los líquidos normales son isotrópicos y, por ello, sus propiedades son las mismas en cualquier dirección. Los *crisales líquidos* se convierten en líquidos isotrópicos cuando se calientan por encima de una temperatura característica, ya que entonces las moléculas tienen la suficiente energía para superar las atracciones que restringen su movimiento.

De acuerdo con la disposición que pueden adoptar las moléculas, Freidel<sup>99</sup> (1922) clasificó los *crisales líquidos* en tres grandes clases: nemáticos, esmécticos y colestéricos.

**a)** Un cristal **nemático** (*figura V.39*) exhibe orden en la orientación de sus moléculas y desorden en la posición de sus centros de masa. Las moléculas pueden moverse lateralmente, girar alrededor del eje común o deslizarse paralelamente a él. Es la mesofase menos ordenada, ya que las moléculas sólo tienen orden orientacional. Podríamos comparar este arreglo molecular con el de las cerillas dentro de una caja, aunque pueden moverse, la presencia de las demás impone restricciones a estos movimientos y tiende a mantenerlas paralelas entre sí.

**Figura V.39.-** La fase nemática exhibe orden de orientación, pero desorden en la posición de los centros de masa moleculares.



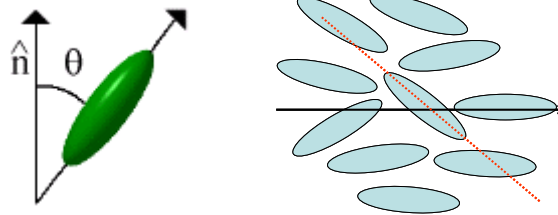
Respecto a la posición de sus centros de masa, un cristal nemático se comporta como un líquido ordinario y sus moléculas se mueven caóticamente. En cambio, difiere totalmente de un líquido ordinario en que sus moléculas se orientan y al moverse mantienen sus ejes paralelos a una dirección común. Por supuesto, este orden nunca es perfecto y sólo ocurre a temperaturas moderadas cuando las variaciones térmicas no son tan intensas como para destruir totalmente este orden de orientación. También es importante mencionar que, además de la temperatura, otras propiedades, como la densidad, son de gran importancia para determinar el grado de orden o el tipo de fase líquido cristalino que puede formarse. En efecto, cuando el número de moléculas por unidad de volumen es elevado, es decir,



cuando la densidad es grande, las moléculas están más cerca unas de otras y las interacciones repulsivas entre ellas son más intensas, lo que favorece la aparición de orden tanto de orientación como de posición en el *crystal líquido*. Sin embargo, estas fluctuaciones térmicas producen defectos en la orientación dando lugar a estructuras microscópicas en forma de hilo que flotan en el nemático o que se adhieren a la superficie del recipiente. Precisamente esta característica fue el origen del nombre *nemático* que en griego significa hilo.

Para cuantificar el grado de orden de un material, se define el *parámetro de orden* que se ilustra en la *figura V.40* para un líquido nemático. Tradicionalmente, se define a través del ángulo que forman el vector director,  $\vec{n}$ , que indica la dirección preferente que adopta el líquido, y el eje mayor del mesógeno.<sup>100</sup>

**Figura V.40.-** Definición del ángulo theta que determina el orden del *crystal líquido*.



Resulta útil definir una función de distribución  $f(\theta) \cdot d\theta$  que represente el número de moléculas orientadas dentro de un intervalo  $(\theta, \theta+d\theta)$  con respecto al vector en cada instante de tiempo. En el caso más simple, todas las distancias perpendiculares al vector son equivalentes y, por tanto, no hay dependencia con el ángulo azimutal. El parámetro de orden se define a través de un polinomio de Legendre,  $P_2$ :

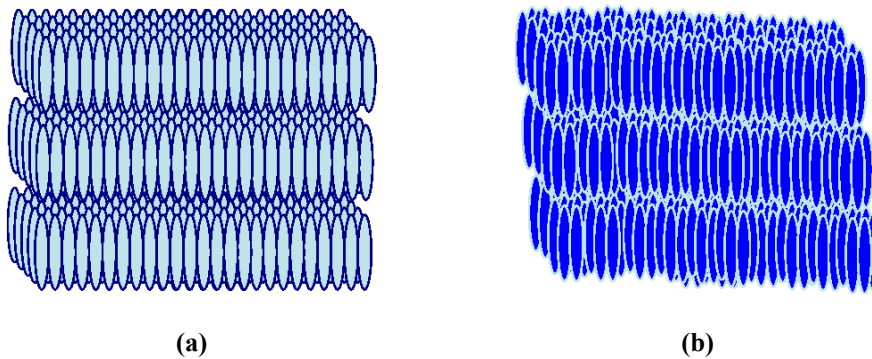
$$S = \frac{\int_0^\pi f(\theta) \left( \frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\theta}{\int_0^\pi f(\theta) \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\theta} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle = \left\langle \frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right\rangle \quad [\text{V.14}]$$

En un líquido isotrópico, el promedio de los términos del coseno es cero, y por tanto, el parámetro se hace nulo, mientras que para un cristal perfecto se hace uno. Un *crystal líquido* suele presentar valores típicos que oscilan entre 0,3 y 0,9 y depende de la temperatura, como resultado de la agitación molecular. Para el



cálculo de este parámetro se suele recurrir a medidas de propiedades macroscópicas como RMN, *birrefringencia*, etc.

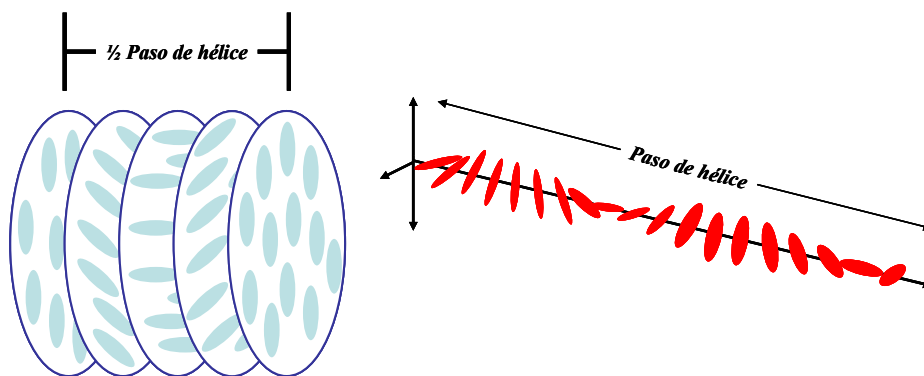
**b)** El cristal **esmético** (*figura V.41*) presenta la fase más ordenada de los *cristales líquidos*. Las moléculas tienden a organizarse en capas planas paralelas entre sí, como las hojas de un libro pero con sus ejes moleculares perpendiculares a estos planos y paralelos entre sí. Éste es, por ejemplo, el arreglo de las moléculas en las capas superficiales de una pompa de jabón y es el que le proporciona la cohesión necesaria para formarse. De hecho, esmético se deriva del vocablo griego que designa una sustancia de propiedades similares al jabón. Como en los nemáticos, las moléculas de esmético también pueden girar alrededor de la dirección de orientación común, pero no pueden hacerlo fuera de la capa en que se encuentran. En cada plano las moléculas pueden acomodarse en filas con diferentes grados de orden de posición de sus centros de masa. En el caso más ordenado, se produce un arreglo regular muy parecido al de la red de un sólido, en el que hay orden y repetición en cada dirección. En cambio, en el arreglo más desordenado, los centros de masa moleculares se mueven caóticamente en cada plano, de modo que en este caso el esmético es nemático por planos (*figura V.41.b*). Debe enfatizarse, sin embargo, que en cualquier caso el esmético es siempre fluido y las diferentes capas se deslizan, en mayor o menor grado, unas sobre otras.



**Figura.V.41-** (a) *Cristal líquido* esmético con orden de orientación de los ejes moleculares y orden en la posición de sus centros de masa. (b) Capas de esmético en las que no existe orden de posición. Se comportan como nemáticos en cada plano.



c) La tercera clase de *cristales líquidos* posee una estructura molecular característica de muchos compuestos que contienen colesterol. Por esta razón, se le denomina **colestérica**, o mejor, como cristales *nemáticos quirales* (figura V.42). En realidad se produce en compuestos que presentan quiralidad, esto es, no tienen simetría de inversión. Como en los esmécticos, las moléculas de colestérico también pueden acomodarse en capas superpuestas, pero con una diferencia crucial: los ejes moleculares se orientan en una dirección paralela al plano de las capas. Esta dirección cambia ligeramente de capa a capa debido a la peculiar estructura molecular de los colestéricos, y en consecuencia el eje de orientación, al pasar de un plano a otro, describe una trayectoria en forma de hélice. Una característica importante de las mesofases colestéricas es el paso de hélice,  $p$ , o distancia entre los extremos de la hélice. Una consecuencia de este paso de hélice es su habilidad para reflejar selectivamente la luz cuya longitud de onda coincida con la distancia  $p$ .



**Figura V.42.-** Dibujo colestérico. En la fase colestérica las moléculas forman capas parecidas a las de la fase esméctica, pero con la diferencia que las moléculas de las capas vecinas se disponen con ángulos diferentes, dando al *cristal líquido* una disposición helicoidal.

Los *cristales líquidos* se pueden clasificar también según su modo de preparación. Así, aquellos que se forman por fusión de la fase sólida, se denominan ***cristales líquidos termotrópicos*** (del griego *thérme*, calor, y *tropé*, cambio). Pueden mostrar diferentes temperaturas de transición entre fases: transiciones cristal-cristal, punto de fusión (desde el sólido a la primera mesofase), mesofase-



mesofase (cuando existen diferentes mesofases) y punto de aclaramiento (de la última mesofase al líquido isotrópico). En general, estas transiciones se observan tanto al calentar la muestra como al enfriarla (transiciones enantrotópicas), pero en algunos casos sólo se observan al enfriar (transiciones monotrópicas). Según la temperatura y tipo de moléculas, los *cristales líquidos* termotrópicos pueden organizarse en diferentes fases: nemáticas, colestéricas, esmécticas o columnares. Si estas moléculas tienen un marcado momento dipolar eléctrico, su orientación puede ser controlada mediante campos eléctricos.

Los *cristales líquidos liotrópicos* son aquellos que se forman al destruir la red cristalina del compuesto por adición de un disolvente. Estos compuestos presentan mesofases que dependen de la temperatura, de la concentración y del disolvente. Un cristal liotrópico está formado por dos o más componentes que exhiben propiedades líquido-cristalinas en un determinado intervalo de concentración. En las fases liotrópicas, las moléculas de disolvente rellenan el espacio alrededor de los componentes para dar fluidez al sistema. Muchas moléculas anfífilas muestran secuencias de fase líquido-cristalina dependiendo del volumen entre la parte hidrófoba y la hidrófila.

También se puede abordar la clasificación atendiendo al tipo de molécula que da lugar al *cristal líquido*. Todas ellas tienen una marcada anisotropía ya sea de forma o de solubilidad. De este modo, estas interacciones son suficientemente fuertes para mantener las asociaciones entre moléculas en una orientación preferente, sin pérdida de libertad para moverse, teniendo en cuenta que no se encuentran unidas por enlaces covalentes.

Los complejos con comportamiento de *cristal líquido* suelen ser típicamente moléculas grandes y alargadas. La forma alargada hace que las moléculas se coloquen paralelamente, con libertad para poder desplazarse unas respecto a otras a lo largo de sus ejes. En el caso de la *anisotropía de forma*, al menos uno de los ejes moleculares es muy diferente al resto, mientras que la *anisotropía de solubilidad* se refiere al hecho de que las propiedades de solubilidad varían mucho de una parte a otra de la molécula.

En el grupo de moléculas que poseen anisotropía de solubilidad se encuadran moléculas anfífilas que inicialmente dan lugar a micelas y/o vesículas, posteriormente estos agregados se pueden agregar en fases cúbicas o lamelares, de gran importancia, porque son del tipo de estructuras que se encuentran en las membranas celulares. Este tipo de anisotropía también puede darse por medio de polímeros siempre y cuando una parte de la cadena presente un cierto grado de rigidez.



Dentro de la anisotropía de forma, tenemos los siguientes *crisales líquidos*, que suelen formar parte de los *crisales líquidos* termotrópicos (*figuras V.43 y V.44*):

i) Calamíticos.- Son aquellos cuyas moléculas poseen un eje mucho más largo que los otros dos. Es importante que, al menos una parte de la molécula sea suficientemente rígida como para poder mantener una elongación tal que el alineamiento se vea favorecido por la interacción de las diferentes moléculas.

ii) Discóticos.- En este caso las moléculas tienen forma de disco, es decir, tienen un eje mucho más corto que el resto.

iii) Otros tipos de moléculas mesógenas de bajo peso molecular. Recientemente han levantado el interés moléculas tipo *plátano*, formadas por moléculas curvadas quirales o aquirales, ya que dan lugar a un nuevo tipo de fases.<sup>101</sup>

iv) También existen muchas clases de polímeros que dan lugar a *crisales líquidos*, LCP (*Liquid Crystalline Polymers*). Estos híbridos muestran mesofases características de los *crisales líquidos* de moléculas de bajo peso molecular y a su vez, mantienen las propiedades poliméricas. Se dividen a su vez en dos categorías según que la parte mesógena de la molécula se encuentre dentro de la cadena principal (MCLCP–*Main Chain Liquid Crystal Polymer*-) o esté insertada en una cadena lateral (SCLCP–*Side Chain Liquid Crystal Polymers*-). Las mesofases generadas por este tipo de materiales dependen de la flexibilidad del esqueleto central y/o de sus cadenas laterales. En algunos casos, la parte flexible se alterna con la parte rígida -mesógena-.<sup>102,103</sup>

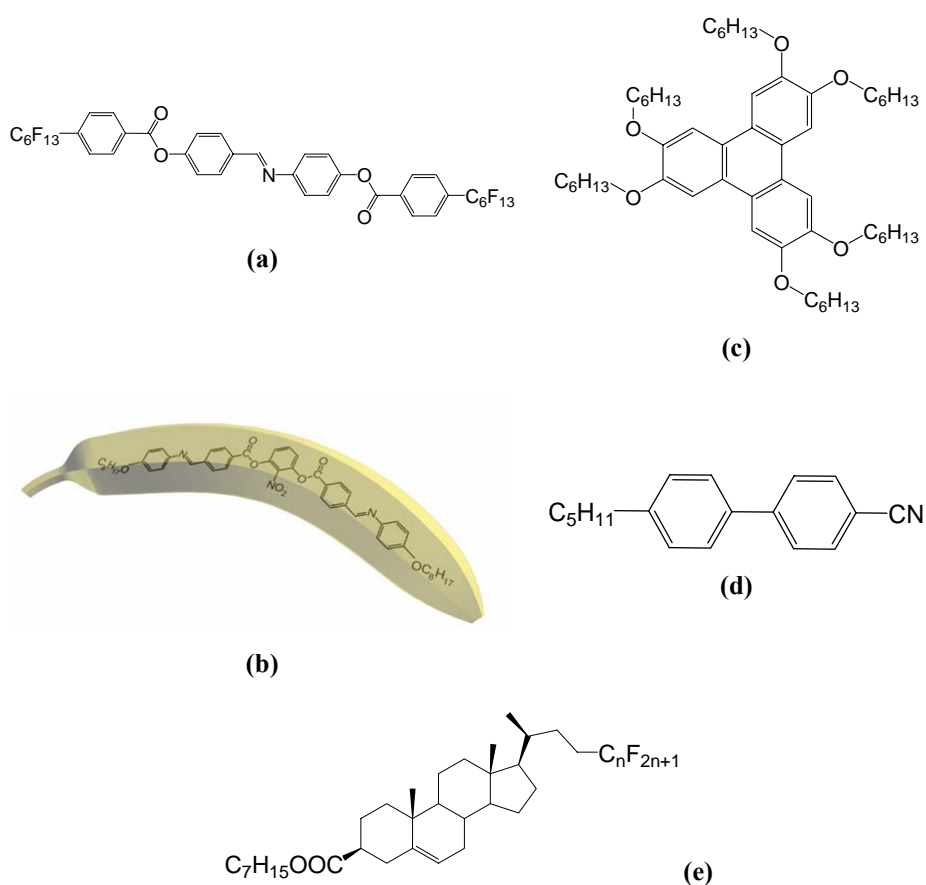
Estrechamente relacionados con los LCP se encuentran los *crisales líquidos* derivados de unidades dendríticas.<sup>104</sup>

En la clasificación anterior no podían faltar estructuras supramoleculares<sup>105</sup> que también dan lugar a *crisales líquidos*, ni tampoco el tipo de moléculas tratadas en este capítulo: los surfactantes *gemini*.<sup>106</sup>

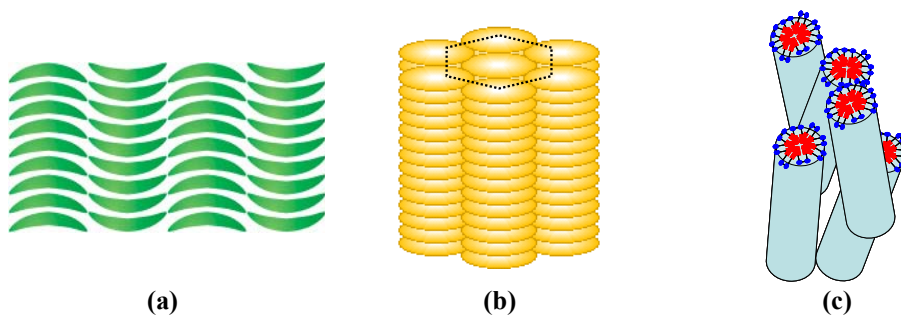
Después del olvido al que fueron sometidos los *crisales líquidos* durante el segundo tercio del siglo pasado, el afán de miniaturización de los dispositivos electrónicos indujo el renacimiento de los *crisales líquidos*. Entonces ocurrió algo lógico, pero que no se había anticipado: al reducir tanto las dimensiones de los dispositivos electrónicos casi se perdió la comunicación con ellos mismos: cada vez era más difícil transmitir -a bajo coste- la información al hombre, pues los diodos semiconductores emisores de luz consumen grandes corrientes eléctricas y los cinescopios de televisión son demasiado grandes. Faltaba un puente de



comunicación entre lo muy pequeño y el mundo macroscópico. Es entonces, a principios de los años sesenta, cuando los *cristales líquidos* son recordados y comienza su resurgimiento hasta convertirse en uno de los campos más activos en la investigación científica interdisciplinaria, con enormes posibilidades de aplicación tecnológicas.<sup>98</sup> La *figura V.45* muestra la evolución del número de publicaciones científicas sobre *cristales líquidos* en el periodo 1950-2006.

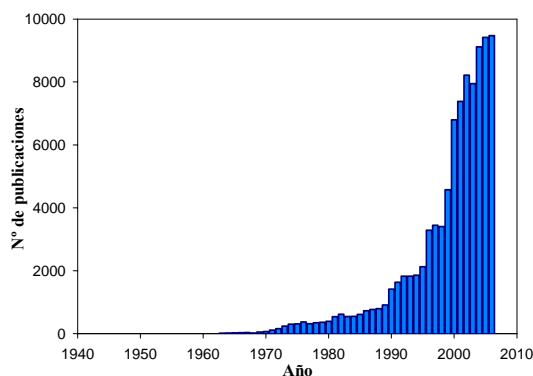


**Figura V.43.-** (a) Estructura de una molécula calamítica. (b) Estructura en forma de *plátano*.<sup>101</sup> (c) Estructura de una molécula discótica, esta última recuerda a una estructura dendrítica.<sup>107</sup> (d) Estructura de una molécula colestérica.<sup>108</sup> (e) Estructura de una molécula colestérica con el colesterol como base,  $n=4$  ó  $6$ .



**Figura V.44.-** (a) Arreglo molecular generado por un mesógeno tipo *plátano*. (b) Fase esméctica en columna hexagonal ( $Col_h$ ) generada por una molécula discótica. (c) Fase nemática generada por una molécula anfífila que da lugar a agregados tipo tubo.

**Figura V.45.-** Evolución del número de publicaciones en lo que se refiere a *cristales líquidos* utilizando la búsqueda en Internet a través de la fuente CAS desde 1950 hasta 2006.



Como ejemplo de tales aplicaciones, comentaremos única y resumidamente sus aplicaciones en las pantallas LCD (*Liquid Crystal Display*). La mayoría de *cristales líquidos* responden con facilidad a los campos eléctricos, exhibiendo distintas propiedades ópticas en presencia o ausencia del campo. El tipo más común de visualizador LCD es el denominado nemático de torsión, término que indica que sus moléculas en su estado desactivado presentan una disposición en espiral. La peculiaridad de este tipo de materiales es que la existencia de una dirección preferida afecta el comportamiento de los rayos luminosos en el material



cambiando su intensidad, color y dirección de propagación. A esta dirección especial se le llama eje óptico del material y es la causa de muchos fenómenos ópticos importantes. Es necesario subrayar aquí que la existencia del eje óptico es un fenómeno colectivo que se da de forma espontánea en los *crisales líquidos*. Así, por ejemplo, si un rayo de luz blanca incide sobre el *crystal líquido* formando un ángulo con el eje óptico puede transformarse en luz de color al transmitirse a través del líquido pues la velocidad de la luz en el fluido depende de la dirección de propagación respecto al eje óptico. Pero, además de este cambio en el color, también puede ocurrir que el rayo saliente se divida en dos rayos luminosos cuyas intensidades relativas varíen dependiendo de la dirección del rayo incidente con el eje óptico. A este fenómeno se le llama *birrefringencia* -posesión de dos índices de refracción-. Las fases liotrópicas que se pueden identificar con el microscopio polarizante son la laminar y la hexagonal, debido a que son birrefringentes. Estas fases son las que más comúnmente se presentan en preparados cosméticos, tales como champúes, enjuagues capilares, emulsiones y cremas de afeitar.<sup>109</sup> Compuestos colestéricos reflejan la luz con una longitud de onda igual al paso de hélice. Este paso de hélice es dependiente de la temperatura y por lo tanto el color se hace dependiente de la temperatura.<sup>110</sup>

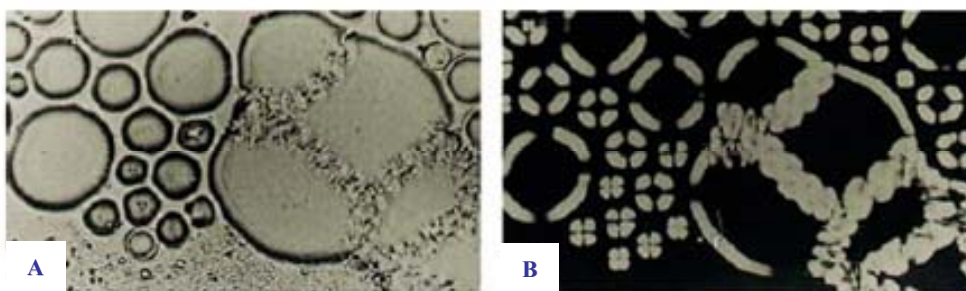
En los organismos vivos las mesofases liotrópicas son abundantes. En particular, las membranas biológicas, que están estructuradas en capas, como un *crystal líquido* esméctico, están constituidas por moléculas cilíndricas (fosfolípidos, lecitina) situadas perpendicularmente a la superficie de la membrana, la cual es fluida y elástica. Las moléculas pueden fluir dentro de cada capa pero, no es frecuente el intercambio entre capas. Estas mesofases actúan como huéspedes de proteínas las cuales se encuentran flotando en la membrana. Esta estructura en *crystal líquido* es de vital importancia ya que, por ejemplo, las membranas dejan de cumplir sus obligaciones durante la cristalización.<sup>98</sup>

También existen pequeñas cadenas de ADN que se comportan como cilindros en disolución acuosa y por encima de un valor de concentración crítico se puede separar la fase isótropa de la anisótropa. Para la mayoría de los casos la fase resulta ser colestérica.<sup>111</sup>

Hay que resaltar que el primer *crystal líquido* del que se tiene cuenta es un derivado del colesterol. La precipitación del colesterol en la región biliar ocurre cuando la concentración de colesterol supera la solubilidad micelar y/o vesicular. En un modelo biliar sobresaturado, matenido a 37°C, se observa que el sistema da lugar a una mesofase intermedia compuesta de colesterol y lecitina. Este sistema evoluciona y a los 20 días aparecen cristales de colesterol monohidrato.<sup>112</sup>



Las propiedades más generales de las formas líquido-cristalinas del colesterol incluyen la *birrefringencia*, alto orden de agregación hasta dar lugar a esferulitas y estructuras helicoidales (*figura V.46*). Presentan una gran resistencia mecánica, estabilidad frente a la lipólisis natural y radiaciones.<sup>113</sup>



**Figura V.46.-** Mesofase de esferulitas del colesterol con estructura helicoidal. **(a)** Vista a través de un polarizador. **(b)** A través de polarizadores cruzados.

En cuanto a las sales biliares, estos compuestos se unen al grupo de moléculas mesógenas que dan lugar a *crisales líquidos* liotrópicos. Puede hacerse una generalización de este comportamiento sobre la base de su estructura química lo que influye en su solubilidad, siendo las dihidroxisales las que presentan mayor tendencia a formar *crisales líquidos*, de hecho, el desoxicolato sódico da lugar a una mesofase cuando alcanza el 39,1 % en peso en disolución acuosa. El aumento de la hidrofilia de la cabeza polar favorece la formación de la mesofase. Comparativamente con la mesofase generada por los fosfolípidos, presentan una baja estabilidad térmica lo que sugiere una pequeña barrera energética con la fase isotrópica.<sup>114</sup> También existen derivados monoméricos o diméricos del litocólico que dan lugar a *crisales líquidos* termotrópicos.<sup>115</sup>

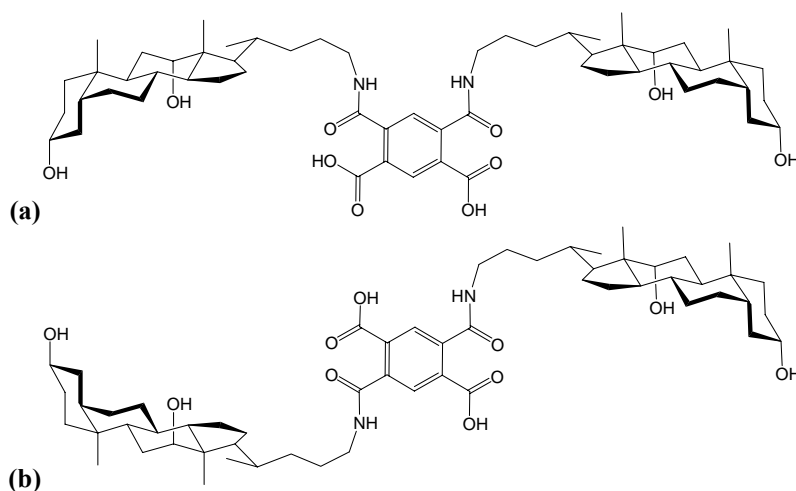
#### V.5.- GEMINI *g*-2DC<sub>24</sub>-PIR

Como ya hemos mencionado, la longitud del puente es un factor que afecta a las propiedades de los surfactantes *gemini* convencionales. La solubilidad de la molécula puede ser modulada actuando sobre la hidrofilia de las cabezas polares, sobre las cadenas hidrocarbonadas y/o sobre la constitución del espaciador. Así, el



equilibrio entre todos estos factores que rigen las interacciones hidrófobas y las fuerzas electrostáticas repercutirá sobre los procesos de micelización y determinará sus propiedades como surfactantes. Entre estos factores se encuentra la rigidez o flexibilidad del puente.<sup>15</sup> Los *gemini* convencionales unidos por un puente rígido, reducen la tensión superficial del agua de forma más rápida y tienen menor tendencia a la agregación que sus análogos con puentes flexibles.<sup>116</sup> En cambio, los valores de *cmc* son del mismo orden de magnitud, con lo que se mantiene la disminución respecto al surfactante de partida.<sup>117</sup> Por lo tanto el uso de un puente rígido a la hora de obtener dos nuevos *gemini* de sales biliares genera buenas expectativas a la hora de poder obtener un comportamiento o propiedades tensioactivas diferentes. Ésta ha sido la razón de emprender la síntesis y caracterización de los *gemini* con puente piromielítico.

En el *apéndice A* puede verse el procedimiento de síntesis, purificación y caracterización del compuesto. En cualquier caso, antes de comenzar con la caracterización fisicoquímica del nuevo *gemini*, a la hora de trabajar con derivados de ácidos biliares unidos por un puente aromático, es necesario considerar que tal puente ofrece la posibilidad de obtención de isómeros *meta* y *para* (figura V.47).



**Figura V.47.-** Estructura de los isómeros del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. **(a)** Isómero *meta*, *g-(m)2DC<sub>24</sub>-PIR*. **(b)** Isómero *para*, *g-(p)2DC<sub>24</sub>-PIR*.



El objetivo inicial siempre fue el aislamiento y purificación de cada isómero, aunque no se ha logrado satisfactoriamente. A continuación se hace un pequeño resumen del procedimiento sintético seguido en la elaboración de este *gemini* para comprender cuál ha sido la etapa responsable de la obtención simultánea de ambos isómeros como productos de reacción:

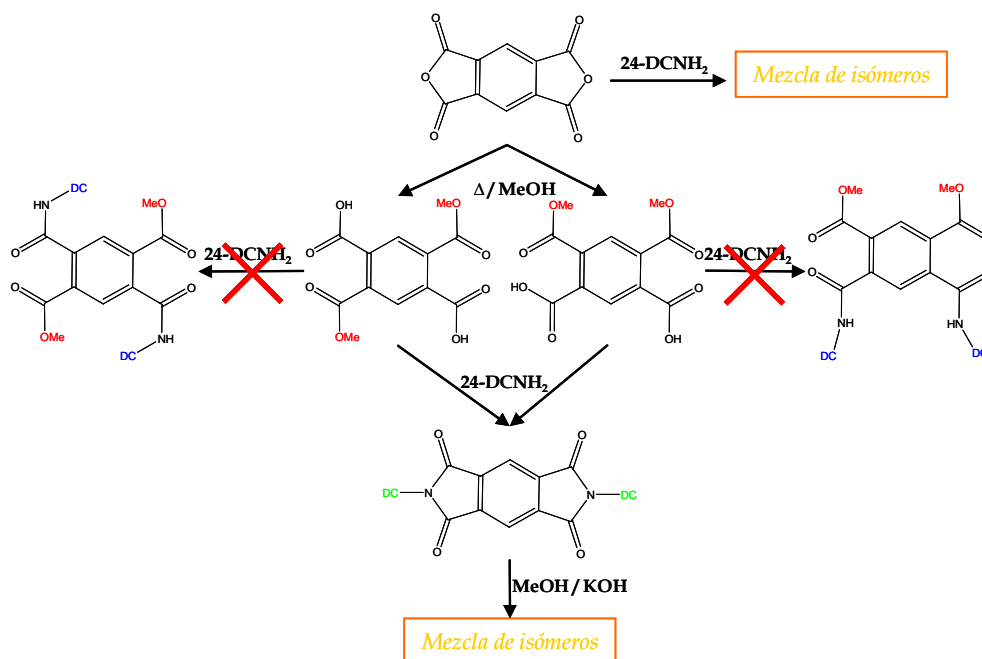
1. La reacción directa del ácido 24-aminodesoxicólico con el anhídrido piromielítico se ha rechazado como ruta sintética inicial debido a su potencial capacidad de generación de la mezcla de isómeros.
2. Una vez desechado el paso anterior se realizó la di-esterificación del anhídrido piromielítico mediante calentamiento a reflujo con metanol y posterior aislamiento del *para*-diéstermetílico (*p-PMDE*) y del *meta*-diéstermetílico (*m-PMDE*).
3. A continuación, cada uno de estos isómeros por separado se acopló con el ácido 24-aminodesoxicólico mediante enlaces amida utilizando las rutas de acoplamiento DEPC/TEA o DIC/HOBt. Un análisis inicial de los espectros de RMN obtenidos condujo a presumir la obtención de la di-amida. La existencia de simetría, referida a la equivalencia de los hidrógenos aromáticos, tanto de la *para*-di-amida como de la molécula realmente obtenida, la di-imida, condujo a que este análisis inicial fuese erróneo.
4. El último paso incluye la hidrólisis de los teóricos di-ésteres. En el análisis de los espectros de RMN se observó la obtención de la mezcla isómera. Esto condujo a un análisis más en profundidad de la etapa anterior y al esclarecimiento de la formación de la di-imida. A modo de resumen, véase el esquema de la *figura V.48*.

A pesar de los esfuerzos realizados en la variación de la condiciones de reacción, tales como cambio de disolvente, disminución de temperatura, precipitación del crudo de reacción,... no se ha mejorado el resultado que trascendería de la aplicación del paso 1 mencionado. Por ello, las muestras empleadas deben ser consideradas como mezclas isómeras, refiriéndonos a ellas como *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. Las técnicas de caracterización empleadas (RMN, MALDI-TOF, FT-IR y análisis elemental) confirman la inexistencia de otros subproductos.

Como en los estudios anteriores, comenzaremos por mostrar los resultados obtenidos sobre la tensioactividad del compuesto. El primer detalle que llama nuestra atención en el análisis de la isoterma de tensión superficial de una disolución de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en medio acuoso sin la presencia de ningún electrolito



es la aparición de un “escalón” justo antes de alcanzar el valor de concentración de agregación crítica tal y como puede verse en la figura V.49.

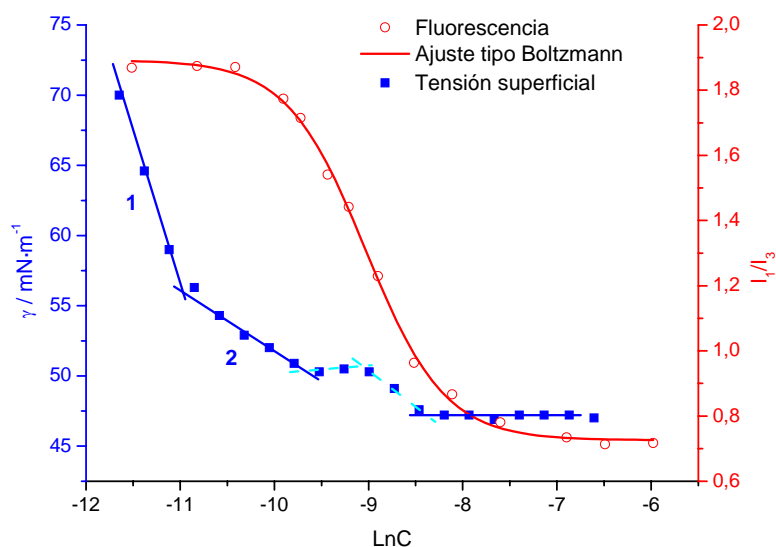


**Figura V.48.-** Esquema de síntesis del *g*-2DC<sub>24</sub>-PIR donde se incluyen los pasos más importantes. La reacción real se produce en línea vertical descendente, mientras que las teóricas se desarrollan en horizontal.

Es inoportuno e interesante al mismo tiempo, que la presencia de este “escalón” aparezca precisamente en este *gemini* ya que impide su interpretación de forma exacta debido a la existencia de los dos isómeros. Este tipo de curvas se pueden dar en mezclas de surfactantes<sup>118</sup> e interpretarse como sigue: por debajo del primer punto de corte, las moléculas de surfactante se encuentran dispersas en disolución. Para las concentraciones comprendidas entre el primer y el segundo punto de corte, existirá un único tipo de agregado. Asumiendo que los valores de *cac* de los surfactantes puros coincidiesen con estos puntos de corte, existirán micelas ricas en uno de los dos isómeros en equilibrio con las moléculas de ambos isómeros libres. Por encima del segundo punto de corte, aunque la delimitación puede que no sea del todo precisa, existirán agregados mixtos. Un hecho que



podría corroborar esta hipótesis es que los isómeros por separado diesen una isoterma de tensión superficial con *cac* similares a los dos puntos de corte. También se podría dar el hecho de que presentasen el mismo tipo de curva, en cuyo caso la explicación anterior perdería solidez. Sin embargo, sería un hecho no reportado en la bibliografía que un único surfactante dé lugar a una pseudo-fase.



**Figura V.49.-** Determinación del valor de *cac* del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* por medidas de tensión superficial y por medidas de fluorescencia del pireno solubilizado en la disolución del *gemini*. Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

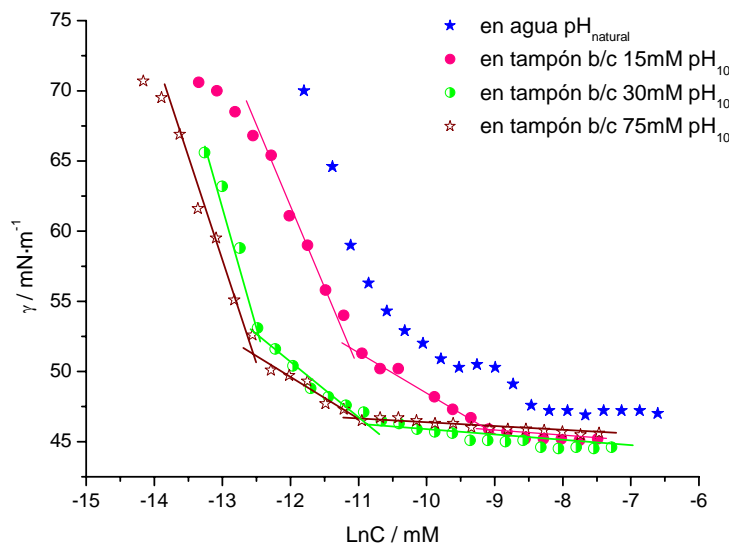
La gráfica  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  de la *figura V.49* presenta un único valor de *cac* igual a 0,12 mM, es decir, no muestra dos puntos de inflexión. El valor anterior es prácticamente 10 veces superior al obtenido por el mismo método para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*, aún cuando sigue siendo dos órdenes de magnitud inferior al del NaDC.<sup>119</sup> El valor límite inferior ( $A_2=0,73$ ; *tabla V.9*) es del orden del publicado para el NaDC,<sup>51</sup> por lo que el entorno del pireno debe ser similar en ambos compuestos. En este caso, el valor de la *cac* más acertado viene dado por el punto de inflexión de la curva ya que  $|x_0/\Delta x| > 10$  (*tabla V.9*).



**Tabla V.9.-** Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* (T=25,0±0,5°C).

N	x <sub>0</sub>	Δx	r <sup>2</sup>	cac <sub>0</sub> /mM	cac <sub>2</sub> /mM	A <sub>2</sub>	A <sub>2exp</sub>	x <sub>0</sub> /Δx
14	-9,04	0,41	0,9987	0,119	0,274	0,73	0,72	22,05

La presencia de electrolitos en el medio (suministrados en forma de disolución reguladora bicarbonato/carbonato de sodio) produce la desaparición del “escalón” mencionado, disminuye el valor de *cac* y rebaja en 2 mN/m la tensión superficial mínima respecto a la disolución medida en ausencia de electrolito (*figura V.50*). Aún así, sigue siendo 4 mN/m por encima de lo que la rebajaba su homólogo de puente flexible (= 41,8 mN/m).



**Figura V.50.-** Gráficas  $\gamma$ -LnC para el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* a diferente fuerza iónica (T=25,0±0,5°C).

En la *tabla V.10* pueden verse los resultados experimentales de las experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica, para las



magnitudes exceso superficial ( $\Gamma$ ), área superficial por molécula ( $a$ ) y los valores de concentración de preagregación crítica ( $cac_p$ ) y la concentración de agregación crítica propiamente dicha ( $cac$ ).

**Tabla V.10.-** Datos experimentales desde los distintos tramos de las isoterms de tensión superficial del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. Experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica y pH (T=25,0±0,5°C). <sup>a</sup>mol·m<sup>-2</sup>; <sup>b</sup>Å<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>μM; <sup>d</sup>mN·m<sup>-1</sup>. N =número de puntos experimentales; b/c=bicarbonato/carbonato. †Valor correspondiente al primer escalón horizontal, marcado con línea punteada en la figura V.49.

Disolvente	N	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>1</sub> <sup>a</sup>	a <sub>1</sub> <sup>b</sup>	cac <sub>p</sub> <sup>c</sup>	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>2</sub> <sup>a</sup>	a <sub>2</sub> <sup>b</sup>	cac <sup>c</sup>	γ <sub>cac</sub> <sup>d</sup>
agua pH <sub>natural</sub>	20	2,0	83,0	21,5	0,38	437,0	$\frac{117,0^\ddagger}{226,2}$	47,0
tampón b/c 15 mM pH <sub>10</sub>	22	4,3	39,0	14,8	1,2	138,4	108,6	45,2
tampón b/c 30 mM pH <sub>10</sub>	24	6,5	25,5	3,8	1,6	105,1	19,3	44,6
tampón b/c 75 mM pH <sub>10</sub>	26	5,3	31,6	3,6	1,1	144,4	16,0	45,6

Como ya hemos mencionado, la experiencia en agua evidencia un comportamiento especial. Del punto de corte de las dos rectas que aparecen dibujadas en color azul claro en la figura V.49 se deduce un valor de  $cac$  de 0,117 mM. Sin embargo, si tenemos en cuenta el valor que se obtiene del punto de corte entre las dos zonas de diferente pendiente a mayor concentración, el valor experimental es más elevado e igual a 0,226 mM. De todos modos, son valores que no difieren sustancialmente con el estimado por medidas de fluorescencia.

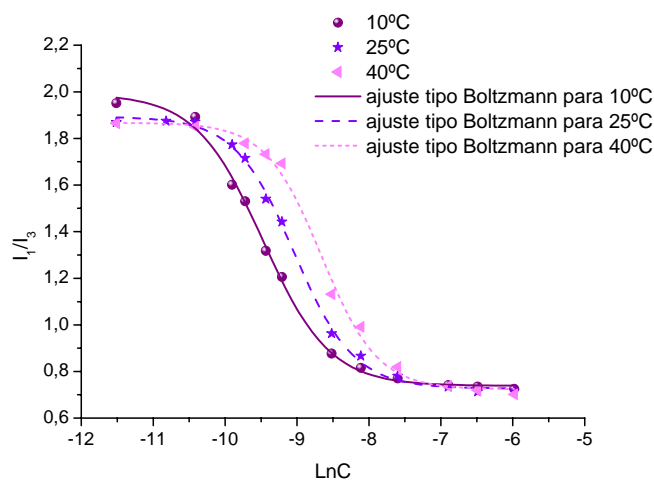
El análisis de las pendientes de las gráficas de tensión superficial arroja unos valores y comportamiento del área superficial por molécula similar a los anteriores *gemi* (tabla V.10).



### Análisis termodinámico del proceso de agregación del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*

Los resultados obtenidos por *Light Scattering* (*vide infra*) muestran que este *gemini* presenta un único tipo de agregado en disolución. Por este motivo, se han determinado los parámetros termodinámicos de agregación. Esta situación no se ha planteado para los dos *gemini* con puente AEDT debido a la distribución bimodal observada mediante *Light Scattering*.

Para este análisis termodinámico se ha recurrido a medidas de fluorescencia en estado estacionario, es decir, se ha determinado la relación  $I_1/I_3$  del pireno solubilizado en diferentes concentraciones del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en agua y a diversas temperaturas. La cantidad de pireno fue la misma en todas ellas y en muy baja concentración con respecto a la sal biliar. Las gráficas  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  se muestran en la *figura V.51* y los resultados efectivos de los análisis se resumen en la *tabla V.11*. De acuerdo con el modelo de equilibrio para la formación de agregados y tratando a éstos como una pseudo-fase,<sup>120</sup> pueden obtenerse las funciones termodinámicas energía libre estándar de agregación ( $\Delta G_a^0$ ), entalpía ( $\Delta H_a^0$ ) y entropía ( $\Delta S_a^0$ ) a partir de los valores de *cac*.



**Figura V.51.-** Gráficas  $I_1/I_3$  del pireno vs el Ln de la concentración de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. Las experiencias fueron realizadas a diferentes temperaturas ( $\Delta T \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).



**Tabla V.11.-** Datos obtenidos experimentalmente del ajuste tipo Boltzmann de la curva  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  para el  $g\text{-}2DC_{24}\text{-}PIR$  a diferentes temperaturas ( $\Delta T \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

$T/^\circ\text{C}$	$x_0$	$\Delta x$	$r^2$	$cac_0/\text{mM}$	$cac_2/\text{mM}$	$A_2$	$A_{2\text{exp}}$	$ x_0/\Delta x $
10	-9,48	0,46	0,9979	0,076	0,196	0,74	0,72	20,61
25	-9,04	0,41	0,9987	0,119	0,274	0,73	0,72	22,05
40	-8,66	0,39	0,9963	0,173	0,390	0,72	0,70	22,20

De acuerdo con este modelo, el proceso de agregación se puede describir como:



donde  $S^-$  representa la concentración de surfactante,  $C^+$  la concentración de contraiones y,  $M^{p-}$  el agregado formado por  $n$  monómeros con una carga efectiva  $p$ .

En la *figura V.52* se representan los valores de  $\text{Ln}cac_0$  con la temperatura, pudiendo observar un aumento lineal con la misma. Conocida esta dependencia, se pueden obtener los parámetros termodinámicos mencionados. Los mismos se resumen en la *tabla V.12*. Las ecuaciones requeridas para el cálculo se recogen en al pie de la tabla.

El valor negativo de la energía libre de Gibbs nos indica que el proceso de agregación observado para este *gemini* es espontáneo. Además, también podemos adelantar que como las medidas de *Light Scattering* se efectúan pocos minutos (5-10 min) después de preparar y filtrar la disolución, el proceso es factible y relativamente rápido, desde una óptica cinética.

En el intervalo de temperaturas estudiado, el efecto predominante es el entálpico, haciéndose más importante a medida que la temperatura aumenta. Esto concuerda con lo observado para las respectivas sales biliares de partida, NaC y NaDC, tal y como puede verse en la *tabla V.13*. Los valores de entalpía son mucho más favorables en el caso del *gemini*, lo que puede entenderse de igual modo que los bajos valores de  $cac$  para surfactantes diméricos con respecto a surfactantes



convencionales y que son debidos principalmente a que dos cadenas alquílicas son transferidas al mismo tiempo desde el agua a una pseudo-fase micelar.

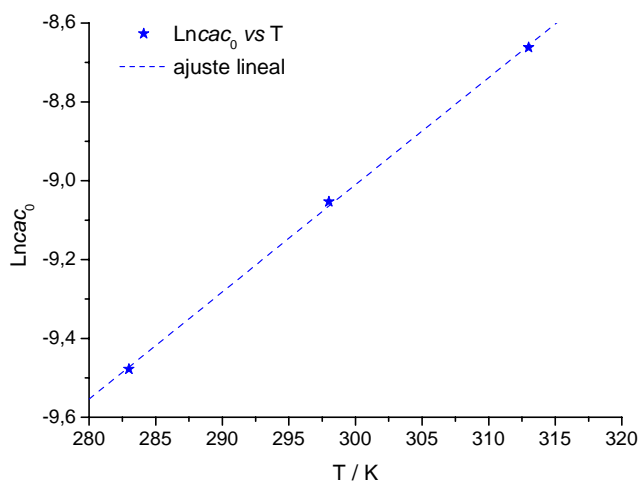


Figura V.52.- Representación gráfica  $Lncac_0$  vs T para el sistema  $g-2DC_{24}-PIR$  en agua.

Tabla V.12.- Parámetros termodinámicos obtenidos para el  $g-2DC_{24}-PIR$  en agua. <sup>a</sup>  $\Delta G_a^0 (gemini) = RT(1,5 - \alpha) \times Lncac$  donde  $\alpha$  es la fracción de cargas de los iones surfactante del agregado no neutralizadas por los contraiones. Para este parámetro se ha adoptado el valor determinado para diversos ácidos biliares naturales,<sup>50</sup> igual a 0,7; <sup>b</sup>  $\Delta H_a^0 = -RT^2 \frac{\partial Lncac}{\partial T}$  y <sup>c</sup>  $\Delta S_a^0 = \frac{\Delta H_a^0 - \Delta G_a^0}{T}$ .

T/°C	Lncac <sub>0</sub>	$\Delta G_a^0 / kJ \cdot mol^{-1a}$	$\Delta H_a^0 / kJ \cdot mol^{-1b}$	$\Delta S_a^0 / J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1c}$	$T\Delta S_a^0 / kJ \cdot mol^{-1}$
10	-9,48	-17,84	-18,16	-1,15	-0,32
25	-9,04	-17,92	-20,14	-7,46	-2,22
40	-8,66	-18,03	-22,22	-13,39	-4,19

Hay que tener en cuenta que los valores de *cmc* presentados en la tabla V.13 han sido obtenidos mediante la técnica de calorimetría de valoración



isotérmica (ITC) que presenta la ventaja de que la  $cmc$  y la  $\Delta H_m^0$  pueden ser determinadas directamente a partir del mismo experimento. En cambio, la técnica de fluorescencia obliga a calcular la entalpía a partir de la dependencia de la  $cac$  con la temperatura a través de la ecuación de van't Hoff. Ambos cálculos dependen en gran medida del valor medido para la  $cac$ .

La variación de  $\Delta H_a^0$  y  $\Delta S_a^0$  con la temperatura muestran una relación típica del proceso, denominado compensación entálpico-entrópica. Como consecuencia, la variación de  $\Delta G_a^0$  con la temperatura es baja (figura V.53), ya que cuando la parte entálpica contribuye poco a la energía libre surge, que la parte entrópica contribuye en un orden mayor, y viceversa. Analicemos esta compensación entálpico-entrópica más detenidamente.

**Tabla V.13.-** Datos bibliográficos de los parámetros termodinámicos de micelización para el colato sódico (NaC) y para el desoxicolato sódico (NaDC).

Compuesto	T/°C	cmc/mM	$\Delta G_m^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta H_m^0/\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\Delta S_m^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
NaC <sup>121</sup>	12	14,4	-19,56	4,48	24,00
	13	15,0	-19,54	4,39	23,93
	40	15,5	-21,29	-2,43	18,86
	50	16,0	-21,88	-4,40	17,48
	70	20,4	-22,55	-8,70	13,85
NaC <sub>([NaCl]=0,1M)</sub> <sup>43</sup>	11	12,5	-19,9	4,3	24,4
	24	10,0	-21,0	1,6	22,5
	44	14,5	-22,1	-4,4	17,7
NaDC	11	6,2	-21,52	3,34	24,86
	16	5,0	-22,34	2,59	24,93
	41	6,2	-23,73	-4,77	18,96
	50	6,2	-24,40	-7,40	17,00
	70	8,3	-25,10	-10,87	13,85
NaDC <sub>([NaCl]=0,1M)</sub>	10	4,2	-22,3	3,8	26,1
	25	4,0	-23,6	-1,4	22,2
	45	4,0	-25,2	-7,3	17,9

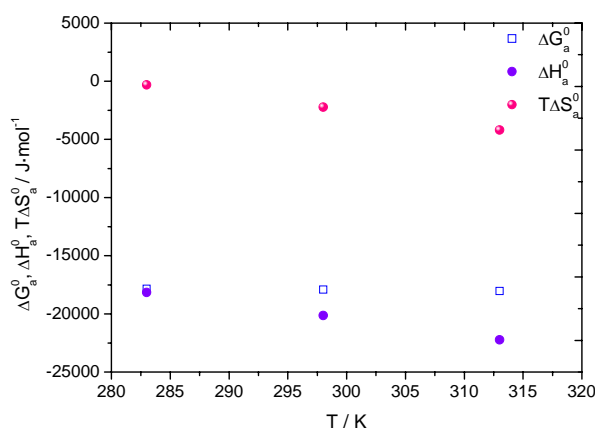


La *figura V.54* muestra que la representación  $\Delta H_a^0$  vs  $\Delta S_a^0$  es lineal, es decir, obedece a la ecuación empírica *V.16*:

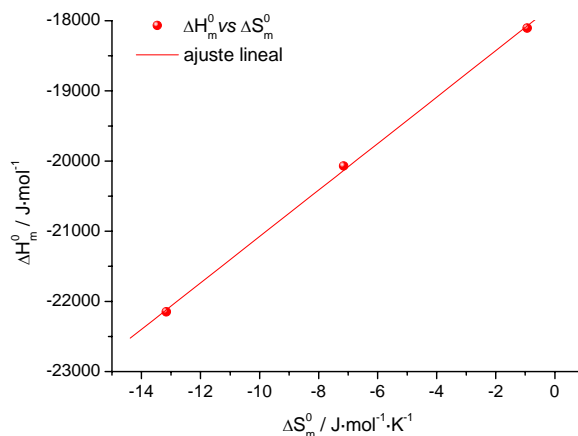
$$\Delta H_a^0 = \Delta H_a^* + T_c \Delta S_a^0 \quad [V.16]$$

donde  $\Delta H_a^*$  es el valor de entalpía que corresponde a una determinada temperatura donde la única fuerza que contribuye a la energía libre de Gibbs es la entalpía, es decir, cuando  $\Delta S_a = 0$ . El término  $T_c$  se denomina temperatura de compensación, y aunque no tiene un significado físico claro, se puede considerar la media geométrica del intervalo de temperaturas para un determinado compuesto. Se ha encontrado empíricamente para varios surfactantes que el valor de  $T_c$  se encuentra en un intervalo de temperaturas entre 273K y 343K.<sup>122</sup>

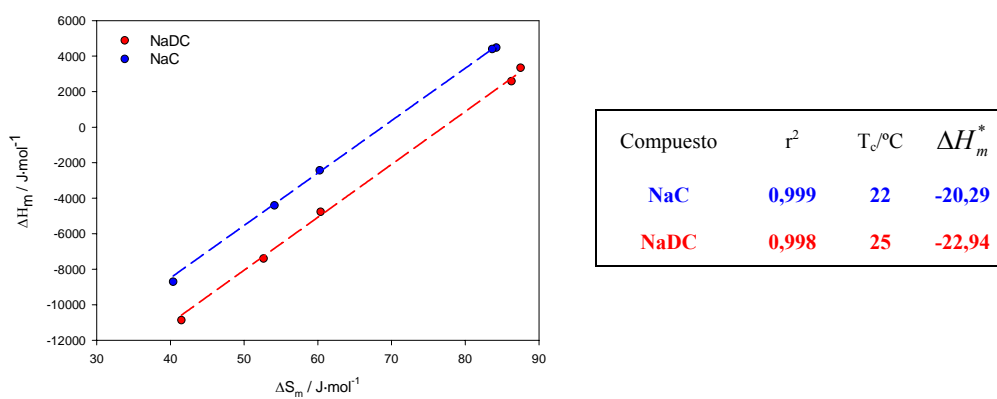
Del ajuste de los datos experimentales de la *figura V.54* obtenemos un valor para  $T_c$  de 330K (57°C) y  $\Delta H_a^* = -17,75 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Este último valor está en consonancia con los obtenidos para el NaC y el NaDC (*figura V.55*). En cambio, el valor de  $T_c$  es considerablemente mayor que el de las sales biliarias naturales. Hay que tener en cuenta que los procesos de agregación del *gemin* y los de las sales biliarias pueden ser distintos ya que éstas comúnmente originan micelas y los *gemin* hasta ahora estudiados en esta tesis doctoral originan vesículas.



**Figura V.53.-** Variación con la temperatura de los parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente para el sistema *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en agua.



**Figura V.54.-** Compensación entálpico-entrópica para el sistema *g*-2DC<sub>24</sub>-PIR en agua.



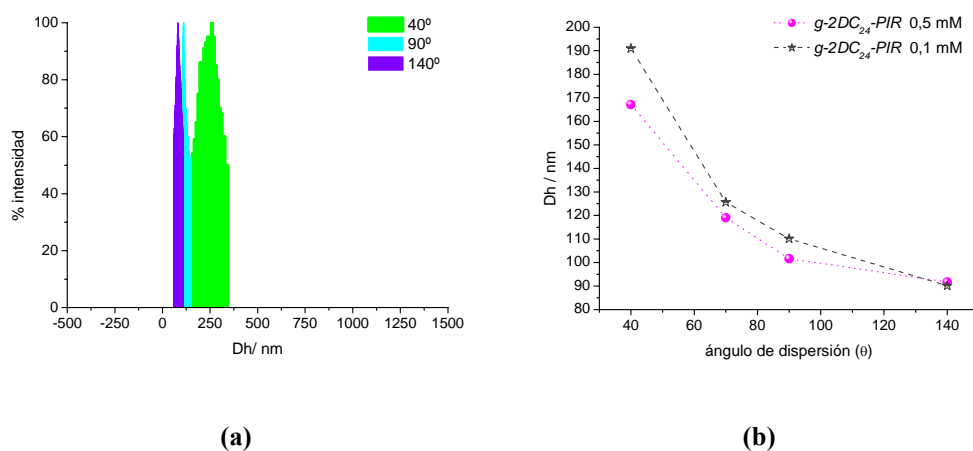
**Figura V.55.-** Representación y datos del proceso de compensación entálpico-entrópica para el NaC y el NaDC obtenidos por Paula<sup>121</sup>, véase la *tabla V.13*. La entalpía que aparece en la tabla anexa está dada en las unidades kJ·mol<sup>-1</sup> y la temperatura en °C.



De este análisis termodinámico, la conclusión más importante es que los valores de energía libre para este *gemini* tienen una alta similitud con los bibliográficos referidos a las sales biliares originales de partida, salvo que en éstas, el proceso de micelización está regido por un efecto entrópico y, en cambio, para este *gemini* el efecto determinante es el entálpico. Además, dentro del posible error que conlleva determinar el valor de *cac*, que para las sales biliares naturales es siempre objeto de controversia, la técnica de fluorescencia se revela como una técnica útil para la determinación de parámetros termodinámicos.

### Caracterización estructural de los agregados del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en disolución acuosa. Medidas de Light Scattering QELS y SLS

En el intervalo de concentraciones estudiado (0,11-2,1 mM), las medidas de dispersión de luz dinámica, QELS, revelan la existencia de una distribución monomodal de agregados (*figura V.56*), por lo que su interpretación resultará, *a priori*, más sencilla que en el caso de los *gemini* con puente de AEDT.



**Figura V.56.-** Análisis QELS del *gemini g-2DC<sub>24</sub>-PIR*: **(a)** Distribución de tamaños en función del ángulo  $\theta$ . **(b)** Variación del *Dh* obtenido por el método de cumulantes en función del ángulo  $\theta$ . En todas las experiencias que se llevaron a cabo el filtro seleccionado fue el de 0,45  $\mu\text{m}$ .



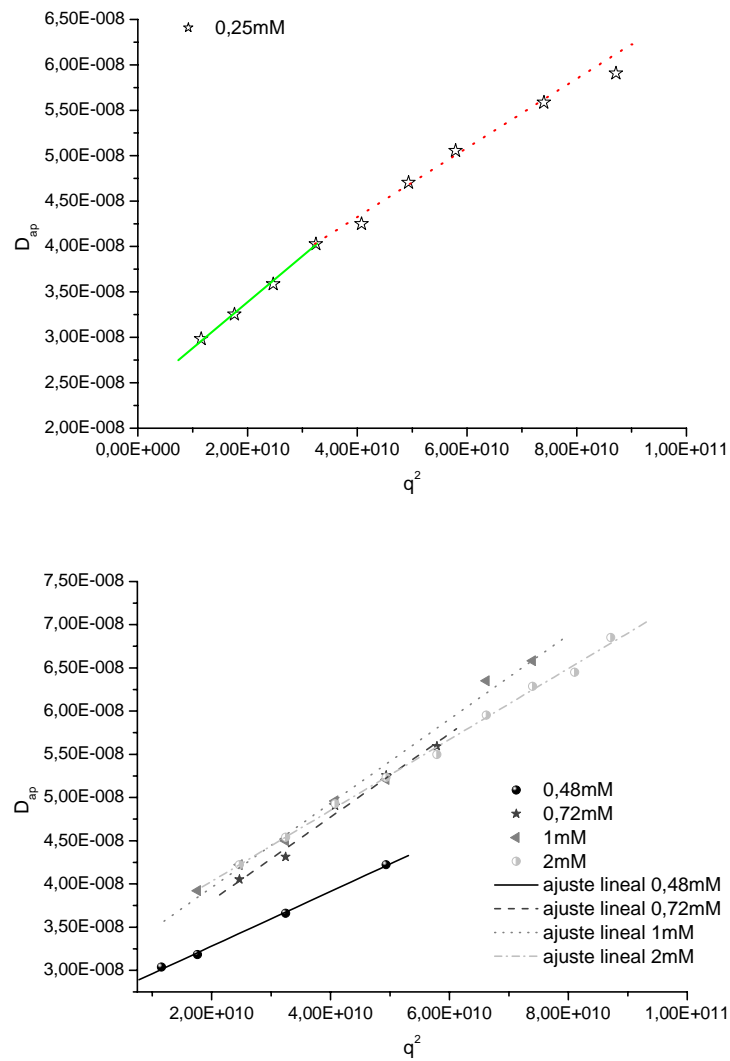
Como en este caso existe una sólo distribución de poblaciones, se pueden realizar estudios de Zimm Dinámico. Tal y como ocurre en otros surfactantes, el tamaño y estructura del agregado dependen de la concentración, por lo que la doble extrapolación  $q \rightarrow 0$  y  $c \rightarrow 0$ , típica de las gráficas de Zimm, podría llevar a conclusiones erróneas, aunque hay casos como en los fosfolípidos y vesículas de fullereno donde se realizan.<sup>123</sup> Por ello, los parámetros obtenidos por *Light Scattering* se extrapolarán únicamente a ángulo cero para obtener el valor del radio hidrodinámico libre del efecto de la disimetría angular sobre la intensidad de luz dispersada. Los datos obtenidos se muestran en la *figura V.57*, y puede observarse que en algunas de las muestras estudiadas, no se cumple la linealidad esperada para todo el intervalo de  $q$ , fundamentalmente, para los valores mayores del  $\text{sen}(\theta/2)$ . En este caso se utiliza la aproximación de Guinier (ecuación V.17),<sup>124</sup> la cual se cumple para valores de  $\theta$  bajos:

$$P(q) \approx \exp(q^2 R_g^2 / 3) \quad [\text{V.17}]$$

La *tabla V.14* resume los valores de los coeficientes de difusión aparente extrapolados a ángulo cero ( $D_c$ ) así como los valores del radio hidrodinámico,  $R_h$ , calculados a partir de los datos representados en la *figura V.57*. Aunque los datos de la tabla evidencian una cierta disminución del radio hidrodinámico con la concentración, hemos calculado el medio del mismo, resultando un valor medio de  $R_h=84\pm 7$  nm.

**Tabla V.14.-** Resultados obtenidos del análisis de Zimm Dinámico para distintas concentraciones de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y las medidas fueron realizadas a T=25,0±0,5°C.

Concentración/mM	r <sup>2</sup>	D <sub>c</sub> /10 <sup>-8</sup> cm <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup>	R <sub>h</sub> /nm	σ <sub>90</sub>
0,25	0,9984	2,390	102,5	0,26
0,48	0,9991	2,645	92,6	0,25
0,72	0,9933	2,841	86,3	0,28
1,00	0,9949	2,984	82,1	0,29
2,00	0,9981	3,209	76,4	0,23

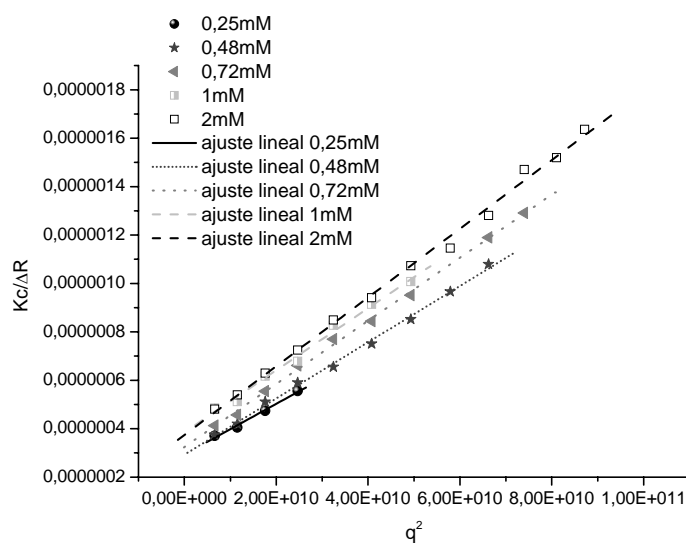


**Figura V.57.-** Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en las concentraciones: 0,25 mM; 0,48 mM; 0,72 mM; 1 mM y 2 mM. Las muestras se prepararon en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y se midieron a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ . En el gráfico superior se observa una desviación de los puntos experimentales para los valores de  $\theta$  más elevados.



Determinar la masa molecular de los agregados en disolución a partir de los estudios SLS, obliga a medir la variación del índice de refracción con la concentración, resultando un valor de  $dn/dc = 0,169 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , que es casi idéntico al obtenido para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*. El intervalo de concentración estudiado fue el mismo que en el caso de las medidas en modo dinámico. La *figura V.58* resume las experiencias realizadas y la *tabla V.15* recoge los valores de los parámetros determinados, esto es, la masa molecular aparente,  $M_{ap}$ , el número de agregación,  $n_{ag}$ , y el radio de giro,  $R_g$ , resultando los siguientes valores medios:  $M_{ap} = (3,0 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $n_{ag} = (3,0 \pm 0,4) \times 10^3$  y  $R_g = 105,8 \pm 5,3 \text{ nm}$ .

A partir de los valores de  $R_h$  y  $R_g$  de las *tablas V.14* y *V.15*, se determinó el valor del parámetro  $\rho$  a cada una de las concentraciones estudiadas (*tabla V.15*). El valor medio resultó ser  $\rho = 1,2 \pm 0,2$ . Dado que el valor de  $\rho$  característico para vesículas es 1, la forma de los agregados del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* que sugiere este parámetro es de tipo globular. Este hecho viene corroborado por las imágenes TEM que se muestran más adelante. La desviación de  $\rho$  de la unidad, posiblemente sea debida a la polidispersidad de las muestras (en torno a 0,27), tal y como ocurría para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*.



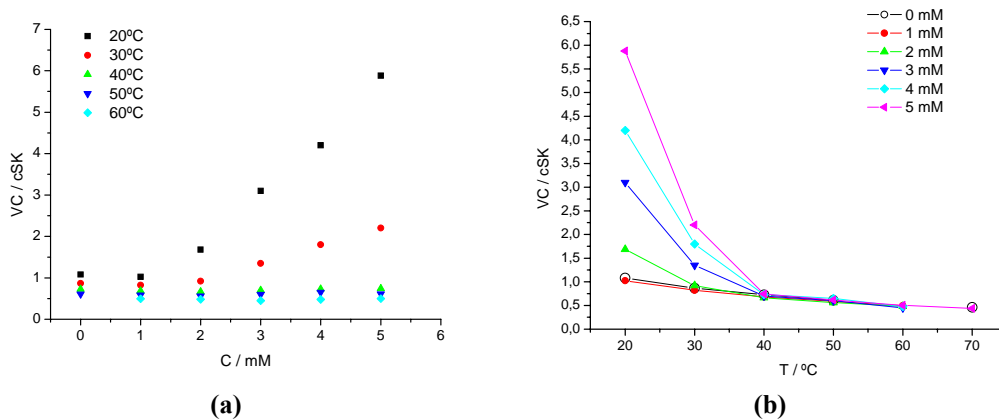
**Figura V.58.-** Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en las concentraciones: 0,25 mM; 0,48 mM; 0,72 mM; 1 mM y 2 mM. Las muestras se prepararon en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y se midieron a  $T=25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .



**Tabla V.15.-** Resultados obtenidos del análisis de Zimm Estático para distintas concentraciones de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y las medidas fueron realizadas a T=25,0±0,5°C.

Concentración/mM	r <sup>2</sup>	M <sub>ap</sub> /10 <sup>6</sup> g·mol <sup>-1</sup>	n <sub>ag</sub> /10 <sup>3</sup>	R <sub>g</sub> /nm	ρ
0,25	0,9951	3,4	3,3	103,3	1,0
0,48	0,9986	3,4	3,3	109,1	1,2
0,72	0,9990	3,1	3,1	109,8	1,3
1,00	0,9957	2,6	2,6	99,9	1,2
2,00	0,9980	2,7	2,7	106,7	1,4

Por otra parte, hemos observado que las muestras del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* se vuelven bastante viscosas al aumentar la concentración. Para no tener que aplicar correcciones, ésta es una de las razones por las que no se han realizado medidas de *Light Scattering* a concentraciones mayores. Sólo se ha realizado la medida de la viscosidad cinemática con objeto de determinar una concentración aproximada donde se hace patente el aumento de viscosidad de la disolución frente al medio acuoso. La *figura V.59* resume los resultados obtenidos. Las medidas han sido realizadas en un viscosímetro Cannon-Fenske.

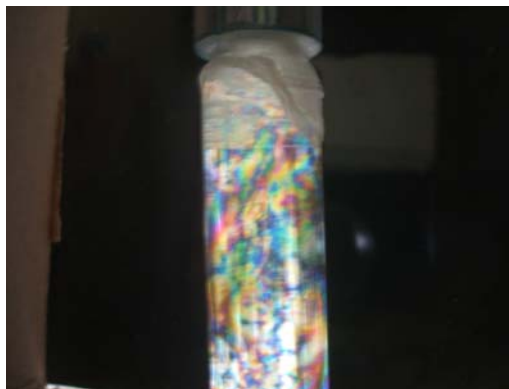


**Figura V.59.-** (a) Variación de la viscosidad cinemática del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en agua con la concentración a distintas temperaturas. (b) Variación de la viscosidad cinemática de disoluciones acuosas del *gemini* con la temperatura (T±0,2°C).



Se puede observar que la viscosidad presenta un cambio drástico en torno a una concentración entre 1-2 mM y a temperaturas inferiores a 30°C. Ya hemos visto que por debajo de 2 mM este *gemini* presenta unos agregados tipo vesicular de forma esférica, pero la presencia de estas partículas no debería originar un aumento tan brusco de la viscosidad. Por ello, este cambio en la viscosidad, además de un efecto de la concentración, debe reflejar un cambio en la estructura coloidal.

Si se aumenta la concentración hasta aproximadamente 20 mM se puede observar el fenómeno de *birrefringencia*, ya se comentó que es una propiedad óptica exhibida por los *crisales líquidos* (*vide supra*). La *figura V.60* muestra una imagen de esta disolución en un microscopio con los polarizadores cruzados.



**Figura V.60.-** Aspecto de una disolución en agua 20mM de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* a temperatura ambiente cuando se sitúa entre dos placas polarizadoras con los ejes cruzados.

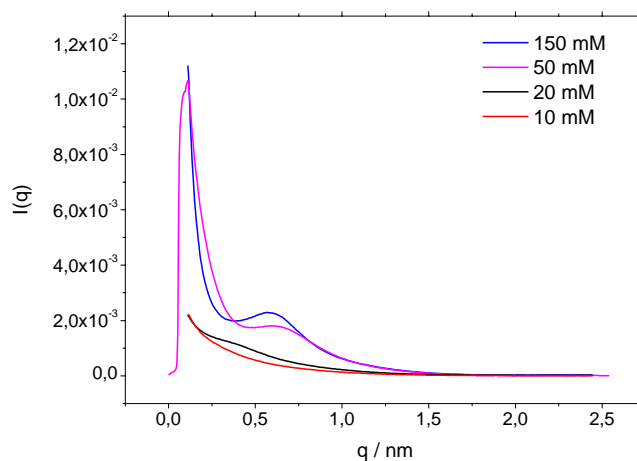
En esta zona donde el sistema se encuentra en una mesofase de cristal líquido nemático, la técnica de dispersión de luz utilizada hasta el momento se revela como inadecuada, ya que la señal generada por los dominios nemáticos no puede ser fácilmente diferenciable de las partículas dispersas. Es en este caso donde se realizaron medidas de dispersión de Rayos X a bajo ángulo (Small Angle X-Ray Scattering -SAXS-) que indican la presencia de agregados cilíndricos con un diámetro de 5 nm. Hay que tener en cuenta que las medidas SAXS fueron realizadas a concentraciones del *gemini* más elevadas (10-150 mM), las concentraciones tratadas hasta aquí son de un orden de magnitud inferior. De hecho en el gráfico de la *figura V.61* se puede observar la presencia de una segunda señal a medida que se concentra el derivado de sal biliar.

El análisis de los resultados SAXS de la curva de intensidad en función del vector de dispersión,  $q$ , justo a continuación del máximo de intensidad, nos ofrece la interpretación de que la fase anisotrópica está compuesta por agregados cilíndricos que presentan un radio de giro para la sección transversal de  $17,4 \pm 1,5$



Å. Si se supone que el cilindro es homogéneo, esto corresponde a un radio de 24,6 Å o un diámetro de 49,2 Å. A partir de la región contigua del máximo y suponiendo un empaquetamiento hexagonal sale una distancia entre cilindros de 100 Å aproximadamente.

La no presencia de otras señales de Bragg en la gráfica de intensidad nos indica la ausencia de un mayor orden en el sistema, con lo que posiblemente nos encontremos ante una *mesofase nemática*.



**Figura V.61.-** Medidas SAXS a diferentes concentraciones del *gemini g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en agua.

### **Microscopía TEM del *g-DC<sub>24</sub>-PIR***

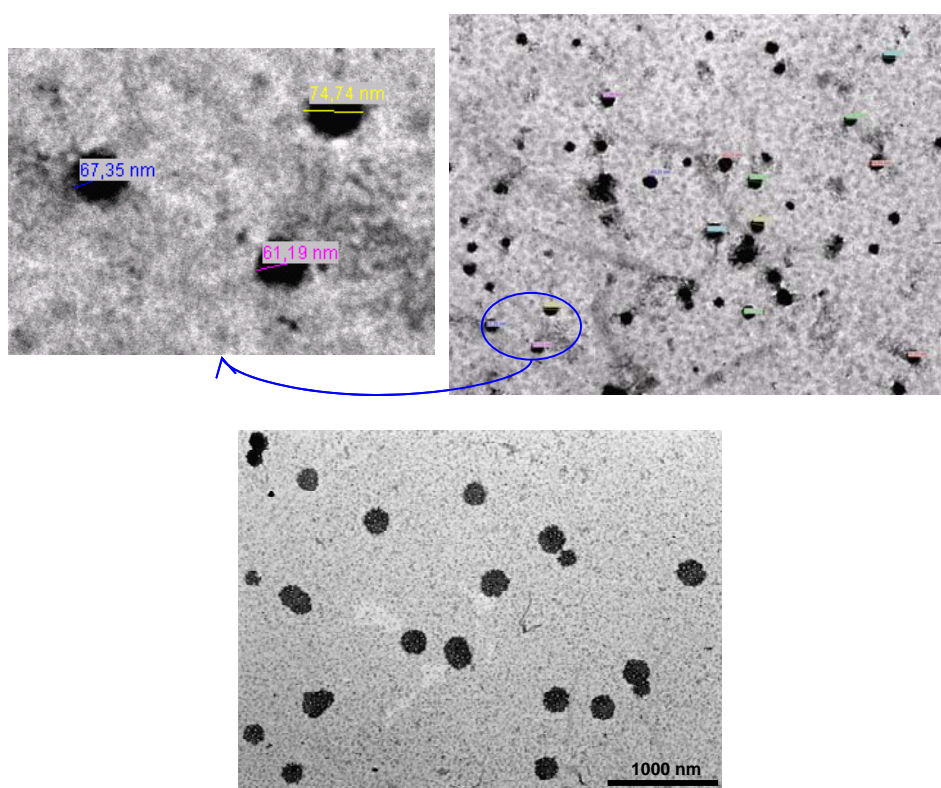
Antes de pasar a analizar este nuevo hecho de formación de *crystal líquido* observado a concentraciones elevadas de *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*, vamos a caracterizar los agregados que se forman en disolución a concentraciones más bajas.

La *figura V.62* muestra la existencia de agregados de carácter esférico. El análisis de 20 agregados presentes en la imagen superior, indica un valor del diámetro medio de  $69 \pm 6$  nm, inferior al hidrodinámico obtenido por *Light Scattering*. Esta última técnica proporciona un resultado referido al tamaño de la vesícula más el agua de hidratación asociada, mientras que la microscopía TEM, por el hecho en sí que conlleva la preparación de las muestras (véase *apéndice B*), se refiere al agregado seco. Las imágenes tomadas de otras rejillas obtenidas de una



muestra de igual concentración reflejan la existencia de estructuras de mayor tamaño, con un valor medio de diámetro  $199 \pm 15$  nm, tal y como puede verse en la imagen inferior de la *figura V.62*. Esta diferencia puede ser debida simplemente al tiempo de secado de las muestras.

En definitiva, la suma de los resultados de *Light Scattering* y el análisis TEM, nos indica que la forma de los agregados a los que da lugar este *gemini* es esférica a bajas concentraciones.

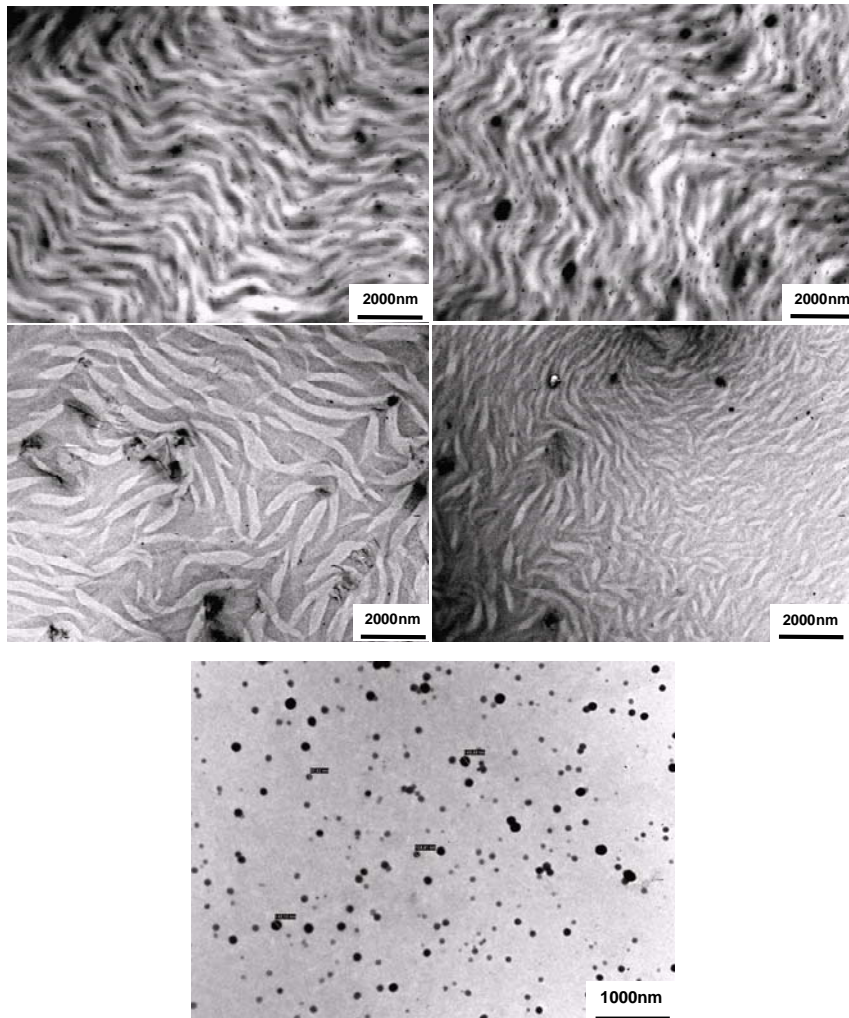


**Figura V.62.-** Fotos TEM obtenidas a una concentración 0,2 mM del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

Las imágenes TEM tomadas a concentraciones mayores evidencian un cambio drástico en la estructura de los agregados. La *figura V.63* muestra una



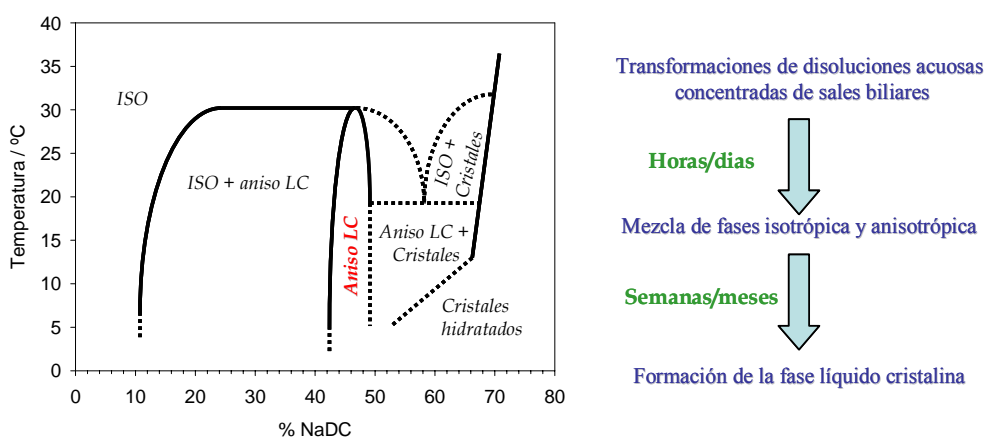
estructura ondulante típica de *crystal líquido* y la desaparición de este tipo de orden al calentar la muestra.



**Figura V.63.-** Fotos TEM del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* en concentraciones superiores a las analizadas por *LS*. Las fotos que aparecen en la parte superior corresponden a una muestra 5 mM en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente. Justo debajo, aparecen otras imágenes características de una muestra más diluida, 2 mM, también a temperatura ambiente. Sin embargo, si la muestra se calienta hasta 40°C, el resultado es el que aparece al final de la figura, destrucción de la estructura líquido-cristalina.



El antecedente más cercano a nuestro *gemini* biliar corresponde al NaDC. Según Amenitsch *et al*<sup>125</sup> el NaDC manifiesta una fase anisotrópica de *crystal líquido* a partir de aproximadamente una concentración del 40 % en agua. Además, esta fase líquido-cristalina se manifiesta en un intervalo de concentraciones estrecho (aproximadamente un 5 %), existiendo un intervalo de concentraciones amplio donde co-existen las regiones isotrópicas y líquido-cristalinas. Esta región se alcanza en el tiempo de una semana. La *figura V.64* recoge el diagrama de fases publicado por estos autores. La formación de la mesofase requiere tiempos de equilibrado relativamente largos (varias semanas), y un intervalo de estabilidad térmica moderado ya que por encima de 32°C la fase líquido-cristalina se convierte en isotrópica. Por encima de la concentración que da lugar esta fase, se observa la presencia de una zona isotrópica micelar idéntica a la primera, aunque con mayor viscosidad y en equilibrio con la formación de cristales.



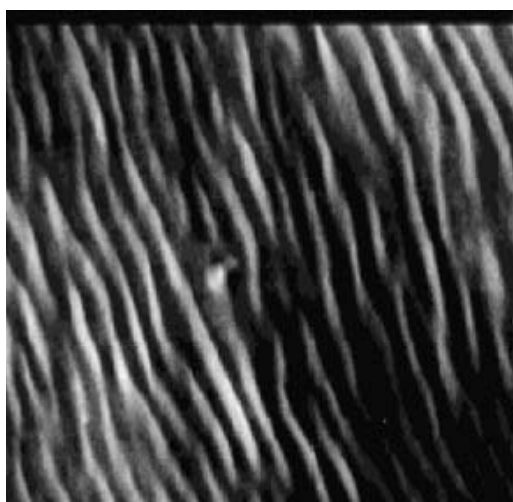
**Figura V.64.-** Diagrama de fases para el NaDC, diagrama similar al presentado para otras sales biliares conjugadas o sin conjuguar. Las abreviaturas significan: ISO.- Solución isotrópica, aniso LC.- Fase anisotrópica líquido-cristalina. La obtención de estas fases ocurre mediante un proceso cinético lento que puede tener lugar en días, como por ejemplo en el NaTC y el NaTDC, o durante meses, como en el NaDC.<sup>125</sup>

Para el caso de nuestro *gemini*, en la *figura V.63* se puede observar que al aumentar la temperatura en el sistema tiene lugar la destrucción de la estructura líquido-cristalina dando lugar a la formación de vesículas. Como puede observarse en la foto TEM a 40°C, estas vesículas presentan una mayor polidispersidad,



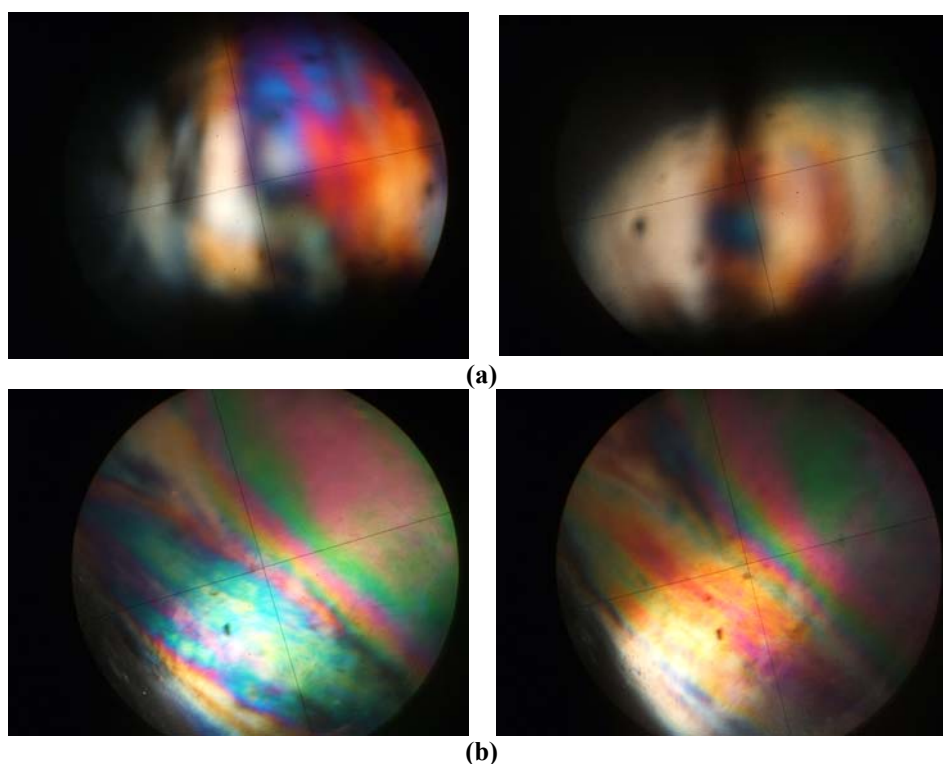
diámetros en torno a 60-150 nm, que las generadas a bajas concentraciones (*figura V.62*). Este hecho es similar al comentado para el diagrama de fases del NaDC.

Si se compara la imagen TEM de la muestra 5 mM del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* con la imagen de la *figura V.65* de una disolución de NaDC, observa más orden en esta última (lo que se ve reflejado en líneas paralelas y ordenadas en la foto con microscopio polarizante). Este resultado concuerda con el bajo orden que indicaban las medidas SAXS (*vide supra*), mientras que esta misma técnica para el NaDC evidencia un mayor orden.



**Figura V.65.-** Fase líquido-cristalina observada para una disolución del 47,1% de NaDC en agua observada por microscopio de luz polarizada una vez sometido a una pequeña presión.<sup>114</sup>

Ya hemos comentado que este compuesto manifiesta *birrefringencia* al situarse entre dos placas polarizadoras. Esta propiedad se hace más patente al observar la muestra a través de un microscopio de luz polarizada (*figura V.66*). En esta figura se hace notable la gama de los diferentes colores que muestra el compuesto según la orientación de la muestra.



**Figura V.66.-** Imágenes observadas a través de un microscopio de luz polarizada de una muestra de  $g\text{-}2DC_{24}\text{-PIR}$  50 mM en agua a temperatura ambiente. **(a)** Diferencia observada cuando se gira la muestra  $90^\circ$ . **(b)** En cambio, en este caso se mantiene fija la muestra y se gira  $90^\circ$  el polarizador.

Como conclusión podemos decir que el  $g\text{-}2DC_{24}\text{-PIR}$  presenta un modelo de agregación diferente a los anteriores *gemini*, el cual es diferente según la concentración. A bajas concentraciones da lugar a agregados de tipo esférico que se pueden considerar como vesículas. A medida que la concentración aumenta lo hace también la viscosidad, debido a un cambio en la forma de los agregados. En muestras de concentración en torno a 10 mM, se observa *birrefringencia*, por lo que el compuesto genera un *crystal liquido* liotrópico-nemático-colestérico al



carecer la molécula de centro de inversión. El esquema de agregación se podría resumir como:



*Vesículas esféricas* → *Agregados cilíndricos* → *gel* → *Cristal Líquido*

La ventaja de este *gemini* respecto al NaDC es que se observa la presencia de una fase líquido-cristalina a concentraciones ~1% de *gemini* y de manera casi instantánea en agua frente al ~40% del NaDC y semanas de equilibrado. Esto lo hace interesante para posibles aplicaciones prácticas.

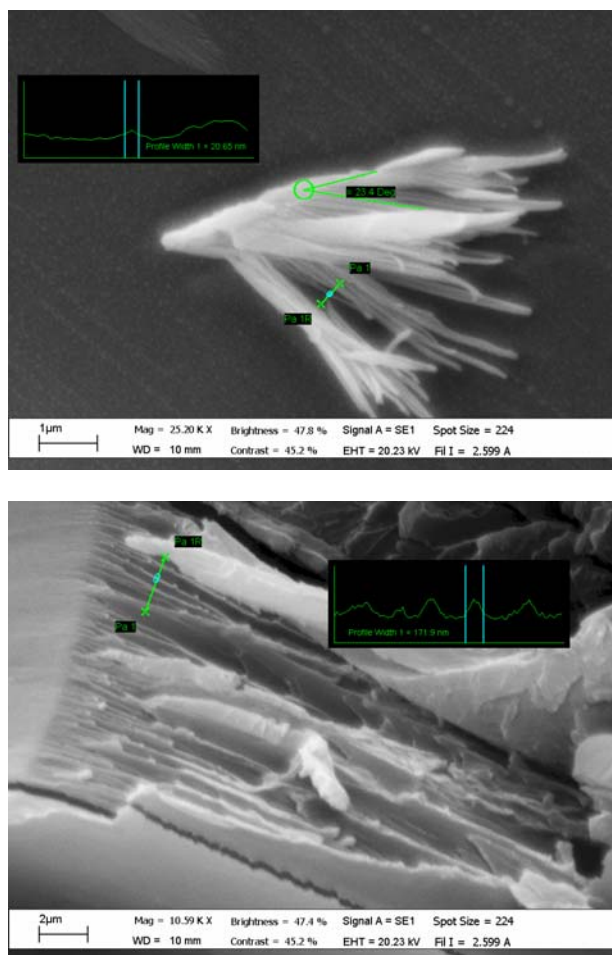
Se han propuesto modelos de agregación micelar deducidos a partir de cristales o de estructuras fibrilares.<sup>126</sup> A la hora de inferir una estructura, las fibras son mejores modelos de partida que los cristales, ya que la estructura de la fibra se aproxima más a la disolución micelar acuosa. De hecho las transiciones:

*Agregados micelares* → *gel* → *Fibra*

tienen lugar de una manera más gradual, con cambios estructurales más moderados ya que la fibra es tirada de una disolución micelar concentrada mediante la participación de la fuerza de la gravedad.

En la *figura V.67* se muestra una imagen SEM obtenida de una fibra seca desde agua. De este *gemini* se han obtenido fibras secas desde una disolución concentrada. Para ello se preparó una disolución muy concentrada (aproximadamente 200 mM de la sal biliar en agua) y se tiraron varias fibras, mediante gravedad, en el momento en el que la textura de la disolución era la más óptima. En la primera imagen de la *figura V.67* se muestra un agregado ramificado, depositado sobre la fibra original. Este agregado es *quasi* unidireccional de estructura fibrilar, con un diámetro de unos 21 nm para la fibra que visualmente se aprecia de menor tamaño. En la segunda imagen se muestra una sección del corte transversal irregular de una de estas fibras, en donde se puede observar el orden en la orientación de fibrillas más pequeñas después de orientar la muestra en la preparación de la fibra. Se puede relacionar como una estructura fibrilar macroscópica compuesta de estructuras fibrilares de menor tamaño, en esta segunda imagen se muestra el diámetro de una fibrilla de 171 nm, dentro de la fibra original y con la misma orientación.

Esta estructura fibrilar viene a reforzar el esquema de agregación de este compuesto en función de la concentración, *vide supra*, donde se mencionaba la presencia de agregados cilíndricos, ya determinados mediante la técnica SAXS.



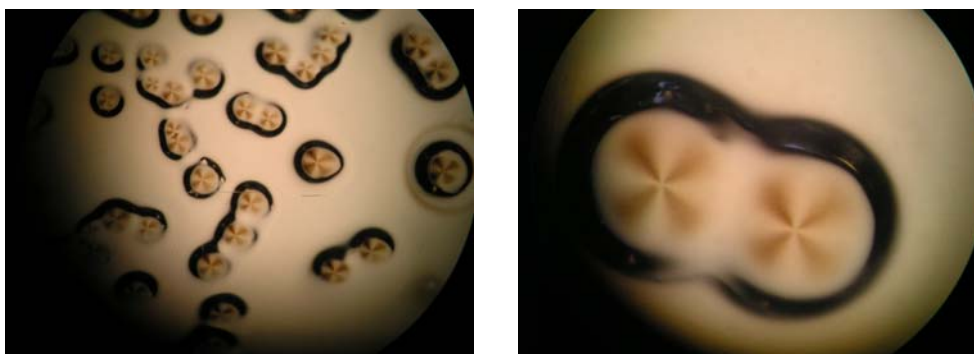
**Figura V.67.-** Imágenes SEM realizadas sobre una fibra seca tirada desde una muestra de  $g$ - $2DC_{24}$ - $PIR$  200 mM en agua. La barra en el margen inferior izquierdo de la imagen superior indica 1  $\mu$ m y la barra que aparece en la foto inferior 2 $\mu$ m.

Es viable sugerir que las interacciones por enlace de hidrógeno son las responsables de la formación de la fibra, y por lo tanto del gel,<sup>127</sup> aunque es posible que no sea la única fuerza causante del fenómeno de gelificación. Estudios publicados recientemente han mostrado que amidoderivados de ácidos biliares son



agentes gelificantes importantes.<sup>128</sup> Estos estudios han demostrado que la agregación y el proceso de gelificación posterior en este tipo de sistemas tiene lugar por medio del enlace de hidrógeno intermolecular, donde el enlace amida y varios grupos hidroxilo son esenciales. La orientación espacial de los grupos que forman parte del enlace de hidrógeno también juega un papel importante en el proceso de gelificación con efectos hidrófobos intermoleculares, principalmente entre los sistemas anillo del esteroide. De hecho los enlaces de hidrógeno que pueden ser esenciales para la formación de cristales son probablemente las fuerzas conductoras en la formación de las estructuras fibrosas durante la agregación.<sup>129</sup>

Antes de finalizar este apartado, debemos comentar que se llevaron a cabo varias pruebas de cristalización con la di-imida (*vide supra* en la *figura V.48*) fundamentalmente en una mezcla de cloroformo y metanol, aprovechando que este compuesto es muy soluble en el primer disolvente e insoluble en el segundo. Por evaporización de una mezcla inicial cloroformo: metanol 9:1 no se obtuvieron los cristales perseguidos sino que el sistema evolucionó dando lugar a una mesofase, esferulitas, que acabó sedimentando (*figura V.68*).



**Figura V.68.-** Esferulitas obtenidas por concentración de una disolución de la di-imida (compuesto cuya hidrólisis deriva en el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*) en una mezcla inicial CHCl<sub>3</sub>(9):MeOH(1). Imágenes obtenidas a través de un microscopio de luz polarizada.

Recordemos que las esferulitas se definen como un tipo de agregado cristalino de simetría esférica constituido por haces de fibrillas que se ramifican a partir de un núcleo central.<sup>130</sup>

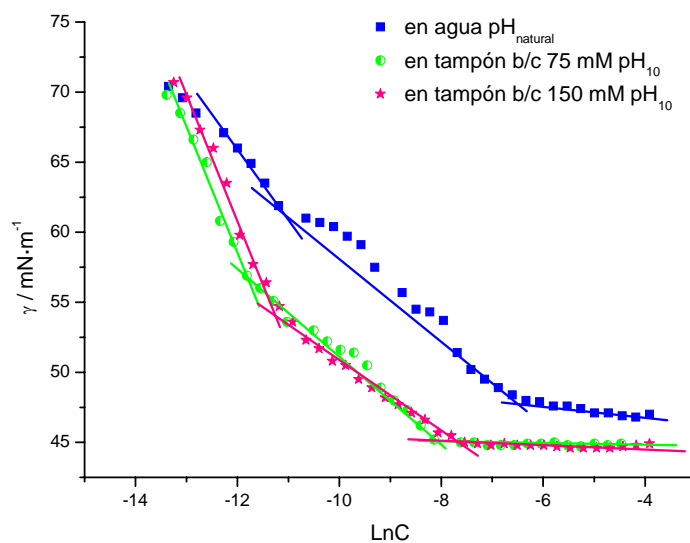


### V.6.- GEMINI $g-2C_{24}$ -PIR

Para completar la familia de los *gemini* de sales biliares y siguiendo el estudio casi sistemático aplicado a cada uno de ellos, en este apartado presentamos los resultados obtenidos para el *gemini* derivado del 24-aminocolato con el puente rígido derivado del ácido piromielítico. Como en el caso del  $g-2DC_{24}$ -PIR, con la introducción de este puente, se debe tener presente que la ruta sintética conduce a la obtención de una mezcla de isómeros. En el *apéndice A* puede verse con detalle el procedimiento de obtención, purificación y caracterización del nuevo *gemini* derivado del ácido cólico.

#### *Determinación de la cac del $g-2C_{24}$ -PIR por tensión superficial y fluorescencia*

La mezcla de isómeros del  $g-2C_{24}$ -PIR muestra una gráfica  $\gamma$  vs LnC con escasa linealidad en el tramo intermedio (*figura V.69*), alcanzándose la linealidad en presencia de un electrolito. Como en el  $g-2DC_{24}$ -PIR, este efecto se atribuyó a la mezcla de isómeros.



**Figura V.69.-** Gráficas  $\gamma$ -LnC para el  $g-2C_{24}$ -PIR a diferente fuerza iónica ( $T=25,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ).



La *tabla V.16* resume los valores de los distintos parámetros derivados de las isothermas de tensión superficial (exceso superficial,  $\Gamma$ , área superficial por molécula,  $a$  y los valores de concentración de preagregación crítica,  $cac_p$ , y concentración de agregación crítica,  $cac$ ) a partir de las experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica.

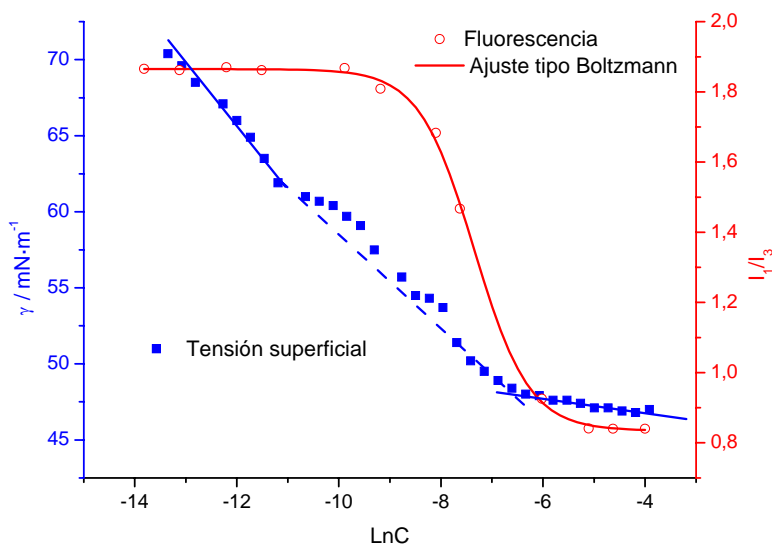
**Tabla V.16.-** Datos experimentales desde los distintos tramos de las isothermas de tensión superficial del *g-2C<sub>24</sub>-PIR*. Experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica y a pH 10 (T=25,0±0,5°C). <sup>a</sup>mol·m<sup>-2</sup>; <sup>b</sup>Å<sup>2</sup>·molécula<sup>-1</sup>; <sup>c</sup>μM; <sup>d</sup>mN·m<sup>-1</sup>. N =número de puntos experimentales; b/c=bicarbonato/carbonato.

disolvente	N	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>1</sub> <sup>a</sup>	a <sub>1</sub> <sup>b</sup>	cac <sub>p</sub> <sup>c</sup>	10 <sup>6</sup> ·Γ <sub>2</sub> <sup>a</sup>	a <sub>2</sub> <sup>b</sup>	cac <sup>c</sup>	γ <sub>cac</sub> <sup>d</sup>
agua pH <sub>natural</sub>	33	0,65	256,8	6,0	-	-	1483	46,8
tampón b/c 75 mM pH <sub>10</sub>	33	1,3	129,5	7,2	0,41	404,1	390,2	44,8
tampón b/c 150 mM pH <sub>10</sub>	37	1,3	131,2	13,0	0,34	493,6	462,0	44,8

En la *figura V.70* se representan conjuntamente las curvas  $\gamma$  vs LnC y I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> vs LnC. Se puede observar que los valores de concentración de agregación crítica que se obtienen desde las dos técnicas son bastante afines, salvando siempre las contradicciones que existen al definir cuál es el valor real de  $cac$ , y cuál es la técnica más fiable, es decir, la más adecuada. Como valor correcto de  $cac$ , se considerará el que se obtiene a partir del punto de inflexión de la curva I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> vs LnC, pues el valor absoluto de la relación  $x_0/\Delta x$  es mayor que 10 tal y como puede verse en la *tabla V.17*.

**Tabla V.17.-** Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el *g-2C<sub>24</sub>-PIR* (T=25,0±0,5°C).

N	x <sub>0</sub>	Δx	r <sup>2</sup>	cac <sub>0</sub> /mM	cac <sub>2</sub> /mM	A <sub>2</sub>	A <sub>2exp</sub>	x <sub>0</sub> /Δx
12	-7,34	0,54	0,9993	0,645	1,947	0,83	0,84	13,6

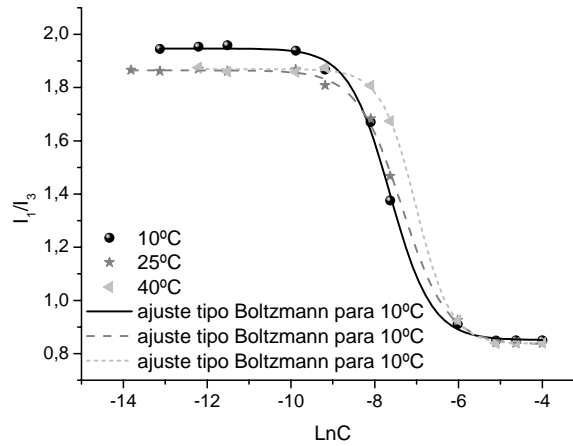


**Figura V.70.-** Determinación del valor de *cac* del *g-2C<sub>24</sub>-PIR* por medidas de tensión superficial y por medidas de fluorescencia del pireno solubilizado en la disolución del *gemini*. Las experiencias fueron realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

### **Análisis termodinámico del proceso de agregación del *g-2C<sub>24</sub>-PIR***

Adelantándonos al resultado obtenido por *Light Scattering* y, de igual modo que ocurre en el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*, este nuevo *gemini* presenta una única población de agregados en disolución. Por ello, se han calculado los parámetros termodinámicos de agregación.

Este análisis termodinámico fue realizado a partir de los datos obtenidos por medidas de fluorescencia de estado estacionario. Con este propósito, se prepararon muestras de diferente concentración de *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en disolución acuosa con igual cantidad de pireno en todas ellas y en concentración muy inferior a la de la sal biliar. Los resultados experimentales se resumen en la *tabla V.18* y las gráficas  $I_1/I_3$  vs  $\text{LnC}$  se representan en la *figura V.71*.

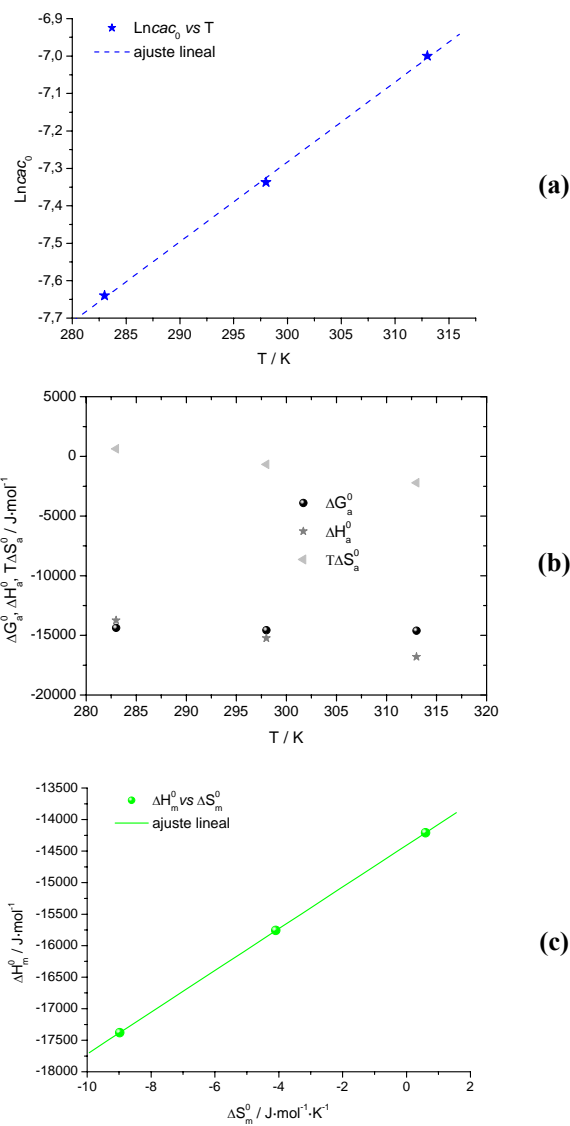


**Figura V.71.-** Gráficas  $I_1/I_3$  del pireno vs el Ln de la concentración de  $g-2C_{24}-PIR$ . Las experiencias fueron realizadas a diferentes temperaturas ( $\Delta T \pm 0,5^\circ C$ ).

**Tabla V.18.-** Datos obtenidos experimentalmente del ajuste tipo Boltzmann de la curva  $I_1/I_3$  vs LnC para el  $g-2C_{24}-PIR$  a diferentes temperaturas ( $\Delta T \pm 0,5^\circ C$ ).

T/°C	$x_0$	$\Delta x$	$r^2$	$cac_0/mM$	$cac_2/mM$	$A_2$	$A_{2exp}$	$ x_0/\Delta x $
10	-7,63	0,49	0,9988	0,484	1,325	0,85	0,85	15,4
25	-7,34	0,54	0,9993	0,645	1,947	0,83	0,84	13,6
40	-7,01	0,41	0,9998	0,899	2,194	0,84	0,84	17,0

Si comparamos los datos de la *tabla V.19* con los del  $g-DC_{24}-PIR$  se puede observar que los valores de energía libre son un poco inferiores para este nuevo *geminis*. Entre el colato y el desoxicolato sódico se da esta misma pauta de comportamiento. De nuevo, la contribución energética es aportada mayoritariamente por la entalpía. La energía libre de Gibbs asociada al proceso de agregación permanece casi invariable en el intervalo de temperaturas estudiado debido a la compensación entálpico-entrópica (*figura V.72*).



**Figura V.72.-** (a) Datos experimentales de la representación gráfica del  $\ln(cac_0)$  vs T para el sistema  $g\text{-}2C_{24}\text{-}PIR$  en agua. (b) Variación de los parámetros termodinámicos con la T. (c) Compensación entálpico-entrópica.



Los parámetros obtenidos del proceso de compensación entálpico-entrópica nos proporcionan un valor de temperatura de compensación de 57°C y  $\Delta H_a^*$  de -14,5 kJ·mol<sup>-1</sup>, valores que caen en el intervalo de temperaturas publicado y son comparables a los de las sales biliares naturales (*vide supra*).

**Tabla V.19.-** Parámetros termodinámicos obtenidos para el *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en agua.

<sup>a</sup>  $\Delta G_a^0(\text{gemini}) = RT(1,5 - \alpha) \times Lncac$  donde  $\alpha$  es la fracción de cargas de los iones surfactante del agregado no neutralizadas por los contraiones. Para este parámetro se ha adoptado el valor determinado para diversos ácidos biliares naturales,<sup>50</sup> igual a 0,7; <sup>b</sup>  $\Delta H_a^0 = -RT^2 \frac{\partial Lncac}{\partial T}$  y <sup>c</sup>  $\Delta S_a^0 = \frac{\Delta H_a^0 - \Delta G_a^0}{T}$ .

T/°C	Lncac <sub>0</sub>	$\Delta G_a^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1a}$	$\Delta H_a^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1b}$	$\Delta S_a^0/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1c}$	$T\Delta S_a^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
10	-7,63	-14,37	-13,74	2,23	0,630
25	-7,34	-14,56	-15,23	-2,26	-0,672
40	-7,01	-14,60	-16,80	-7,03	-2,201

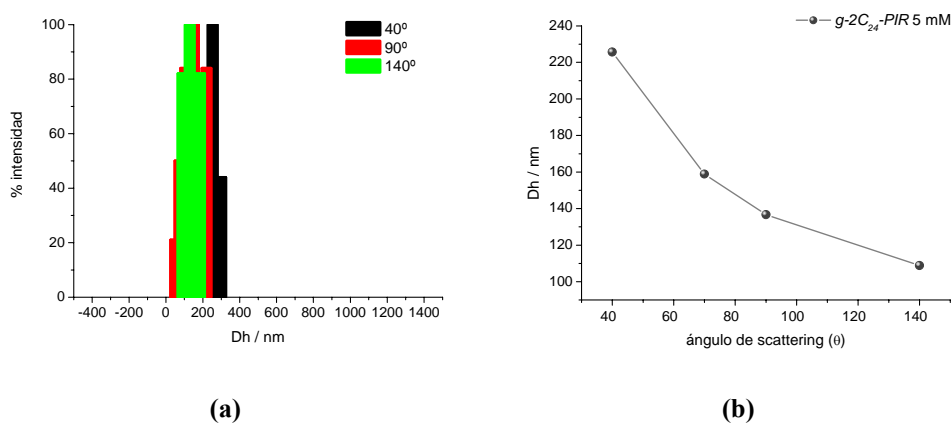
**Caracterización estructural de los agregados del *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en disolución acuosa. Medidas de Light Scattering QELS y SLS**

Las muestras de este *gemini* son menos viscosas, lo que ha permitido trabajar a concentraciones más elevadas que en el caso anterior. Todos los ensayos fueron realizados en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10, y las muestras siempre se filtraron a través de 0,45 µm.

La *figura V.73* muestra los datos experimentales del diámetro hidrodinámico, *D<sub>h</sub>*, obtenidos a partir de medidas QELS. Si se comparan los resultados QELS para los dos *gemini* sintetizados con puente rígido, se puede comprobar que el *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en disolución da agregados de mayor tamaño. Los valores numéricos experimentales se recogen en la *tabla V.20*. El diámetro hidrodinámico medio es 117±5 nm, frente al valor de 84 nm en los agregados del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*. En la *figura V.74* se representan las ramas Zimm Dinámico para cada concentración del derivado de sal biliar.



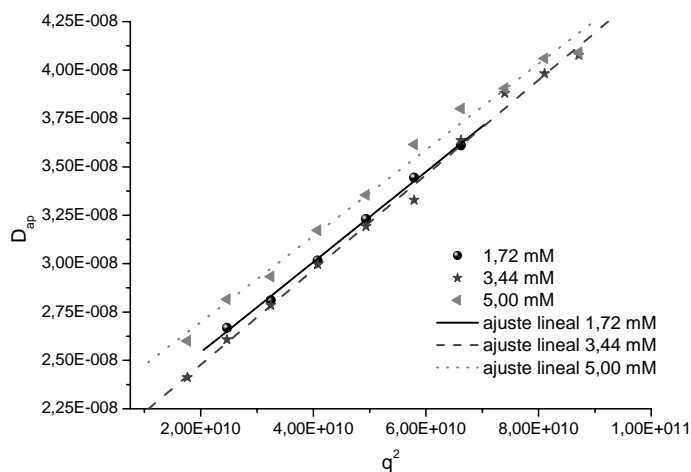
La *tabla V.21* resume los datos de la masa molecular aparente, el número de agregación y el radio de giro, que conjuntamente con el radio hidrodinámico, permite obtener el parámetro  $\rho$  que da idea de la forma del agregado en disolución. El valor de  $\rho$  se aleja bastante de la unidad (valor característico de vesículas) ya que resultó un valor promedio de 1,7 que se puede correlacionar con micelas tipo “gusano”. En la *figura V.75* se representan las ramas Zimm para diferentes concentraciones del *gemini* resultado de las medidas de la intensidad de luz dispersada a diferentes ángulos  $\theta$ .



**Figura V.73.-** Análisis QELS del *gemini g-2C<sub>24</sub>-PIR*: **(a)** Distribución de tamaños en función del ángulo  $\theta$ . **(b)** Variación del  $D_h$  obtenido por el método de cumulantes en función del ángulo  $\theta$ . En todas las experiencias que se llevaron a cabo el filtro seleccionado fue el de 0,45  $\mu\text{m}$ .

**Tabla V.20.-** Resultados obtenidos del análisis de Zimm Dinámico para distintas concentraciones de *g-2C<sub>24</sub>-PIR*. Las muestras fueron preparadas en bicarbonato/carbonato de sodio (30 mM; pH 10).  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

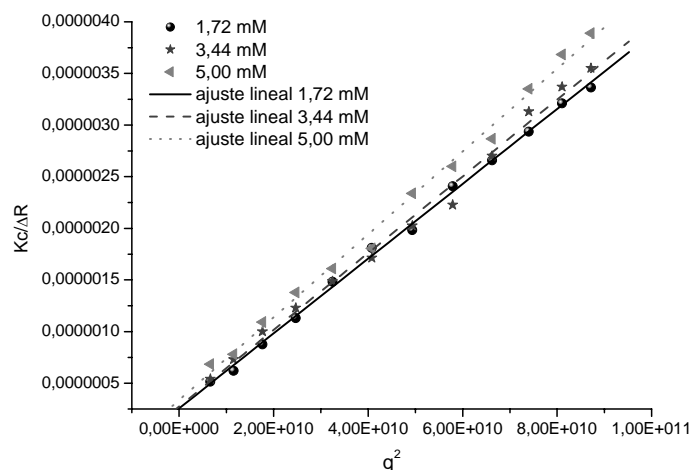
Concentración/mM	$r^2$	$D_c/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	$R_h/\text{nm}$	$\sigma_{90}$
1,72	0,9989	2,074	118,2	0,23
3,44	0,9975	1,987	123,3	0,28
5,00	0,9951	2,253	108,8	0,28



**Figura V.74.-** Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en las concentraciones: 1,72 mM; 3,44 mM y 5,00 mM. Las muestras se prepararon en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y se midieron a T=25,0±0,5°C.

**Tabla V.21.-** Resultados obtenidos del análisis de Zimm Estático para distintas concentraciones de *g-2C<sub>24</sub>-PIR*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución de bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y las medidas fueron realizadas a T=25,0±0,5°C.

Concentración/mM	r <sup>2</sup>	M <sub>ap</sub> /10 <sup>6</sup> g·mol <sup>-1</sup>	n <sub>ag</sub>	R <sub>g</sub> /nm	ρ
1,72	0,9990	3,89	3707	205,6	1,74
3,44	0,9966	3,65	3478	201,6	1,64
5,00	0,9973	2,97	2830	189,1	1,74



**Figura V.75.-** Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones del *g-2C<sub>24</sub>-PIR* en las concentraciones: 1,72 mM; 3,44 mM y 5,00 mM. Las muestras se prepararon en tampón bicarbonato/carbonato de sodio 30 mM a pH 10 y se midieron a T=25,0±0,5°C.

### Microscopía TEM del *g-2C<sub>24</sub>-PIR*

A diferencia con las muestras del *gemini g-2DC<sub>24</sub>-PIR*, éste forma en disolución agregados de forma alargada y no esférica. En las fotos TEM de las figuras V.76 y V.77, se pueden ver dos imágenes representativas de dos disoluciones de diferente concentración del derivado de sal biliar en D<sub>2</sub>O (para evitar el crecimiento bacteriano posible) y en ellas se pueden observar agregados micelares tipo “gusano” de longitud media aproximada a 200 nm. También se puede observar una mayor densidad de agregados conforme la concentración del *gemini* aumenta.

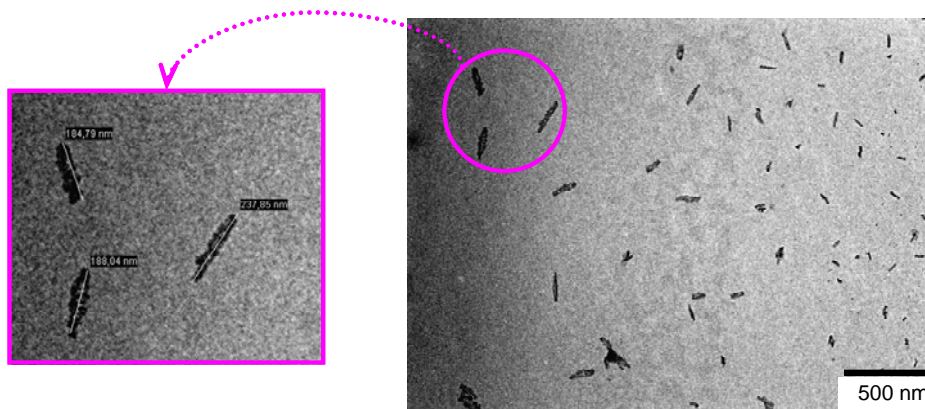


Figura V.76.- Imagen TEM de una muestra 0,2 mM de  $g\text{-}2C_{24}\text{-PIR}$  en  $D_2O$ .

### BIBLIOGRAFÍA

1. Bunton, C. A.; Robinson, L. B.; Schaak, J.; Stam, M. F. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2346-50.
2. Parreira, H. C.; Lukenbach, E. R.; Lindemann, M. K. O. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, *56*, 1015-21.
3. Zana, R.; Benrraou, M.; Rueff, R. *Langmuir* **1991**, *7*, 1072-5.
4. Frindi, M.; Michels, B.; Levy, H.; Zana, R. *Langmuir* **1994**, *10*, 1140-5.
5. Peresyphkin, A. V.; Menger, F. M. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1347-1350.
6. Alami, E.-O.; Holmberg, K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100-102*, 13-46.
7. Oda, R.; Candau, S. J.; Oda, R.; Huc, I. *Chem. Communications* **1997**, 2105-6.
8. Yoshimura, T.; Ohno, A.; Esumi, K. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *272*, 191-6.
9. Hait, S. K.; Moulik, S. P. *Current Sci.* **2002**, *82*, 1101-11.
10. Zhu, Y. P.; Masuyama, A.; Kobata, Y.; Nakatsuji, Y.; Okahara, M.; Rosen, M. *J. J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *158*, 40-5.
11. Wang, C.; Huang, J.; Tang, S.; Zhu, B. *Langmuir*, **2001**, *17*, 6389-92.
12. Menger, F. M.; Keiper, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1907-20.



13. Castro, M. J. L.; Kovensky, J.; Fernandez Cirelli, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3995-8.
14. Renouf, P.; Mioskowski, C.; Lebeau, L. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1357-60.
15. Zana, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97, 205-53.
16. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley: New York, **1980**.
17. Tanford, C. *Science* **1978**, 200, 1012-18.
18. Zana, R.; Levy, H.; Danino, D.; Talmon, Y.; Kwetkat, K. *Langmuir* **1997**, 13, 402-8.
19. Rosen, M. J.; Zhu, Z. H.; Gao, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 157, 254-9.
20. Schosseler, F.; Anthony, O.; Beinert, G.; Zana, R. *Langmuir* **1995**, 11, 3347-50.
21. Chen, H.; Han, L.; Luo, P.; Ye, Z. *Surface Sci.* **2004**, 552, L53-L57.
22. Li, F.; Rosen, M. J. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 224, 265-71.
23. Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 3020-4.
24. Tartar, H. V. *J. Phys. Chem.* **1955**, 59, 1195-9.
25. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525-68.
26. Moulik, S. P. *Current Sci.* **1996**, 71, 368.
27. Goyal, P. S.; Aswal, V. K. *Current Sci.* **2001**, 80, 972-979.
28. Menger, F. M.; Littau, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10083-90.
29. Raghavan, S. R.; Fritz, G.; Kaler, E. W. *Langmuir* **2002**, 18, 3797-803.
30. Menger, F. M.; Peresypkin, A. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5340-5.
31. Oda, R.; Huc, I.; Homo, J.-C.; Heinrich, B.; Schmutz, M.; Candau, S. *Langmuir* **1999**, 15, 2384-90.
32. Oda, R.; Huc, I.; Danino, D.; Talmon, Y. *Langmuir* **2000**, 16, 9759-69.
33. Mitjans, M.; Martinez, V.; Clapes, P.; Perez, L.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Pharm. Res.* **2003**, 20, 1697-701.
34. Massi, L.; Guittard, F.; Geribaldi, S.; Levy, R.; Duccini, Y. *Int. J. Antimicrobial Agents* **2003**, 21, 20-6.



35. Kirby, A. J.; Camilleri, P.; Engberts, J. B. F. N.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Soderman, O.; Bergsma, M.; Bell, P. C.; Fielden, M. L.; Garcia Rodriguez, C. L.; Guedat, P.; Kremer, A.; McGregor, C.; Perrin, C.; Ronsin, G.; van Eijk, M. C. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1448-57.
36. McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 809-11.
37. Li, Y.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 283-304.
38. Ronsin, G.; Kirby, A. J.; Rittenhouse, S.; Woodnutt, G.; Camilleri, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 13026.
39. Hsieh, H.-P.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12077-8.
40. Muller, J. G.; Ng, M. M.; Burrows, C. J. *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 143-8.
41. Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Jacobs, M. A.; Aminabhavi, T. M.; Mukunoki, Y. *Colloid Polym Sci* **1983**, *261*, 781.
42. Simonovic, B. R.; Momirovic, M. *Mikrochim. Acta* **1997**, *127*, 101-4.
43. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5267-75.
44. Gyimesi, J.; Barcza, L. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1993**, *15*, 153.
45. Fisher, A. E. O.; Naughton, D. P. *Transition Metal Chem.* **2004**, *29*, 315-9.
46. Platas-Iglesias, C.; Corsi, D. M.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Imbert, D.; Buenzli, J.-C. G.; Toth, E.; Maschmeyer, T.; Peters, J. A. *Dalton Trans.* **2003**, 727-37.
47. Wang, Y.-M.; Wang, Y.-J.; Wu, Y.-L. *Polyhedron* **1998**, *18*, 109-17.
48. Zana, R.; Levy, H.; Kwetkat, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *197*, 370-6.
49. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolivar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116-22.
50. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 9-15.
51. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*, 1789-93.
52. Weil, I. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 133-40.



53. Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, *12*, 2186-9.
54. Small, D. M. in *The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism*; Nair, P. P., Kritchevski, D., Eds.; Plenum Press: New York. **1971**, Chapter 8, 249-356.
55. Ekwall, P.; Ekholm, R.; Norman, A. *Acta Chem. Scand.* **1957**, *11*, 693-702.
56. Soto Tellini, V. H. *Tesis Doctoral* **2006**.
57. Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, *84*, 31-52.
58. Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Bhat, M. K.; Nahar, P. B.; Deshpande, M. V. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6.
59. Ekwall, P.; Ekholm, R. *Proc. Intern. Congr. Surface Activity, 2nd, London* **1957**, *1957*, 23-30.
60. Rosen, M. J.; Mathias, J. H.; Davenport, L. *Langmuir* **1999**, *15*, 7340-6.
61. Tsubone, K.; Ogawa, T.; Mimura, K. *J. Surfactants Detergents* **2003**, *6*, 39-46.
62. Rosen, M. J.; Tracy, D. J. *J. Surfactants Detergents* **1998**, *1*, 547-54.
63. Kawamura, H.; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3321-6.
64. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10186-91.
65. Song, L. D.; Rosen, M. J. *Langmuir* **1996**, *12*, 1149-53.
66. Viseu, M. I.; Velazquez, M. M.; Campos, C. S.; Garcia-Mateos, I.; Costa, S. M. B. *Langmuir* **2000**, *16*, 4882-9.
67. Bergstroem, M.; Eriksson, J. C. *Langmuir* **1996**, *12*, 624-35.
68. Israelachvili, J. N. *Eds Degiorgio, V. and Corti, M.* **1985**, North Holland, Amsterdam.
69. Coello, A.; Meijide, F.; Mougán, M. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 73-5.
70. Luisi, P. L. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 380-4.
71. Engberts, J. B.; Kevelam, J. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 779-89.
72. Gradzielski, M. *J. Physics: Condensed Matter* **2003**, *15*, R655-R697.
73. Seifert, U. *Adv. Phys.* **1997**, *46*, 13-137.



74. Jung, H. T.; Coldren, B.; Zasadzinski, J. A.; Iampietro, D. J.; Kaler, E. W. *PNAS* **2001**, *98*, 1353-7.
75. Lasic, D. D.; Joannic, R.; Keller, B. C.; Frederik, P. M.; Auvray, L. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *89-90*, 337-49.
76. Schurtenberger, P.; Mazer, N. A.; Känzig, W. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1042-9.
77. Long, M. A.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1733-42.
78. Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 8560.
79. Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5633-44.
80. Pinazo, A.; Perez, L.; Infante, M. R.; Pons, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 1475-81.
81. Johnsson, M.; Wagenaar, A.; Engberts, J. B. F. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 757-60.
82. Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3064.
83. Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 356-62.
84. Corti, M.; Degiorgio, V. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 711-7.
85. Nagarajan, R. *Langmuir* **1994**, *10*, 2028-34.
86. Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. *Biophysical J.* **1996**, *71*, 1641-50.
87. Burchard, W. *Environmental Particles, Volume Editors: Jacques Buffle, and Herman P. Van Leeuwn. Environmental Analytical and Physical Chemistry Series, 2*, Lewis Publishers, Boca Raton (Capítulo 4).
88. Zhou, S.; Burger, C.; Chu, B.; Sawamura, M.; Nagahama, N.; Toganoh, M.; Hackler, U. E.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Science* **2001**, *291*, 1944-7.
89. Duan, H.; Chen, D.; Jiang, M.; Gan, W.; Li, S.; Wang, M.; Gong, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12097-8.
90. Rangelov, S.; Almgren, M.; Edwards, K.; Tsvetanov, C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 7542-755.
91. Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16224.
92. Menger, F. M.; Sykes, B. M. *Langmuir* **1998**, *14*, 4131-7.



93. Stuart, M. A. C.; Besseling, N. A. M.; Fokkink, R. G. *Langmuir* **1998**, *14*, 6846-9.
94. Ueno, M.; Kimoto, Y.; Ikeda, Y.; Momose, H.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *117*, 179.
95. Walde, P.; Wick, R.; Fresta, M.; Mangone, A.; Luisi, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11649-54.
96. Chen, I. A.; Szostak, J. W. *Biophysical J.* **2004**, *87*, 988-98.
97. Soto, V. H.; Jover, A.; Mejjide, F.; Vázquez Tato, J.; Galantini, L.; Pavel, N. V. *Adv. Mater. en imprenta.*
98. Pikin, S.; Blinov, L. *Cristales Líquidos. Ed. Mir*, **1985**.
99. Collings, P. J. *Liquid Crystals; Princeton University Press* **2002**.
100. Singh, S. *Physics Reports* **2000**, *324*, 107-269.
101. Pelzl, G.; Diele, S.; Weissflog, W. *Adv. Mat.* **1999**, *11*, 707-24.
102. Moore, J. S.; Stupp, S. I. *Macromolecules* **1988**, *21*, 1217-21.
103. Percec, V.; Asandei, A. D.; Hill, D. H.; Crawford, D. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2597-604.
104. Tschierske, C. *J. Mat. Chem.* **1998**, *8*, 1485-508.
105. Suarez, M.; Lehn, J.-M.; Zimmerman, S. C.; Skoulios, A.; Heinrich, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9526-32.
106. Acharya, D. P.; Kunieda, H.; Shiba, Y.; Aratani, K. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1790-7.
107. Kumar, S.; Manickam, M. *Chem. Commun.* **1997**, 1615-6.
108. Gray, G. W.; Harrison, K. J.; Nash, J. A. *Liq. Cryst., Proc. Int. Conf.* **1975**, 381-96.
109. Pasquali, R. C.; Bregni, C.; Serrao, R. *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*, 453.
110. Fraschini, M. *EP 81-100760 19810203* **1981**.
111. Strzelecka, T. E.; Rill, R. L. *Macromolecules* **1991**, *24*, 5124-33.
112. Angelico, M.; Guardia, P. D. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**, Aldo Roda; Enrico Roda; Alan Hofmann, Ed. Mansson, Milan, 501-517.
113. Stewart, G. T. *Liquid Crystals* **2003**, *30*, 541-57.
114. Marques, E. F.; Edlund, H.; La Mesa, C.; Khan, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5178-

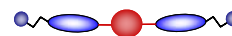


- 86.
115. Shaikh, V. A. E.; Maldar, N. N.; Lonikar, S. V. *Bull. Mat. Sci.* **2003**, *26*, 559-63.
116. Rosen, M. J.; Song, L. D. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *179*, 261-8.
117. Laschewsky, A.; Lunkenheimer, K.; Rakotoaly, R. H.; Wattebled, L. *Colloid Polymer Sci.* **2005**, *283*, 469-79.
118. Staehler, K.; Selb, J.; Candau, F. *Langmuir* **1999**, *15*, 7565-6.
119. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, *3*, 323-35.
120. Shinoda, K.; Hutchinson, E. *J. Phys. Chem.* **1962**, *6*, 577-82.
121. Paula, S.; Sues, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11742-51.
122. Chen, L.-J.; Lin, S.-Y.; Huang, C.-C. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4350-6.
123. Song, T.; Dai, S.; Tam, K. C.; Lee, S. Y.; Goh, S. H. *Polymer* **2003**, *44*, 2529-36.
124. Pencer, J.; Hallett, F. R. *Langmuir* **2003**, *19*, 7488-97.
125. Amenitsch, H.; Edlund, H.; Khan, A.; Marques, E. F.; La Mesa, C. *Colloids Surfaces* **2003**, *213*, 79-92.
126. Campanelli, A. R.; Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Viorel Pavel, N.; Quagliata, C. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **1989**, *7*, 391-400.
127. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, *18*, 987-91.
128. Valkonen, A.; Lahtinen, M.; Virtanen, E.; Kaikkonen, S.; Kolehmainen, E. *Biosensors Bioelectronics* **2004**, *20*, 1233-41.
129. Willemen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2329-35.
130. Magill, J. H. *J. Mat. Sci.* **2001**, *36*, 3143-64.

***VI.- NUEVOS SURFACTANTES DIMÉRICOS DE SALES BILIARES***

---





## VI.1- BREVE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por su peculiar estructura, los ácidos biliares constituyen una de las clases con más proyección en el reconocimiento molecular, en la química huésped-anfitrión y en la química biomimética, La *Química Supramolecular* estudia el comportamiento de moléculas ligadas mediante fuerzas intermoleculares débiles, abarcando un campo de investigación altamente interdisciplinar y en rápida expansión que se encuentra en la frontera entre la química y la biología.

El ácido cólico posee cuatro grupos funcionales que no son equivalentes entre sí, ubicados a lo largo de la molécula, lo que permite obtener un gran control en su modificación química. Por ello, se pueden sintetizar moléculas con diferentes capacidades para generar estructuras supramoleculares en función de los sustituyentes que se coloquen en cada uno de los grupos funcionales que posee. Desde el punto de vista económico, este ácido es casi tan favorable como el colesterol.

### *Oligómeros acíclicos de ácidos biliares. Estructuras lineales*

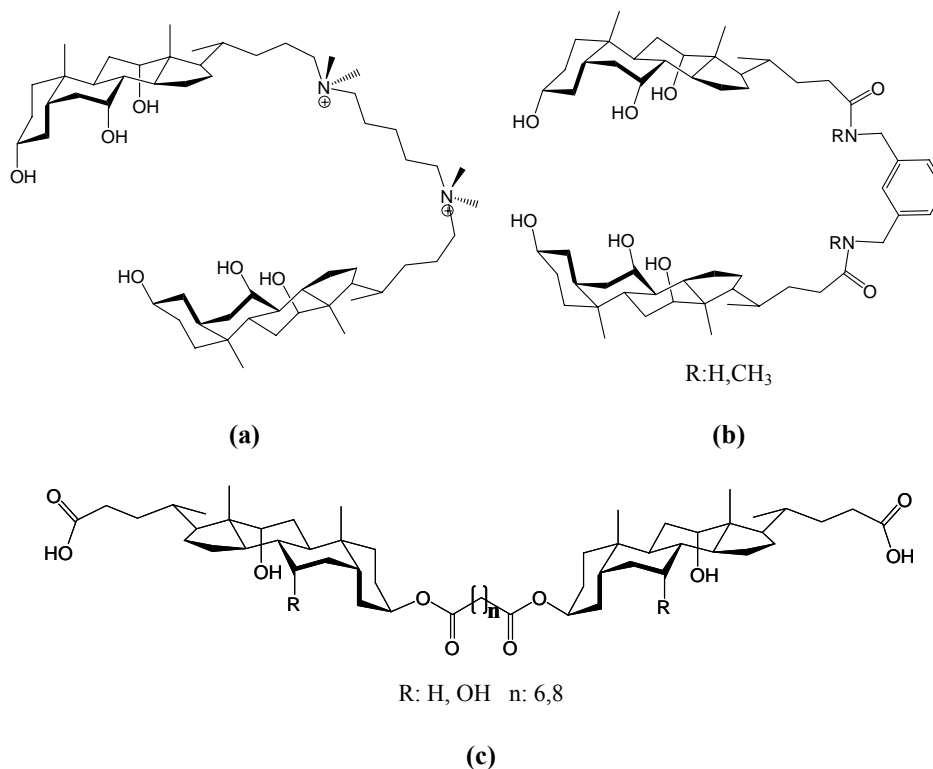
La idea de fusionar dos o más unidades de sal biliar mediante una molécula puente para formar oligómeros acíclicos surgió hace tres décadas a través de McKenna *et al.*<sup>1</sup> que fueron los primeros en sintetizar un derivado de este tipo. El ensamblaje de los fragmentos esteroides a través de un puente se puede realizar por la unión al puente del grupo carboxílico en posición 24, de los grupos hidroxilo en posiciones 3, 7 o 12 o a partir de un derivado en estas mismas posiciones como puede ser un derivado amínico como se muestra en la *figura VI.1*.

La molécula de la *figura VI.1.a* presenta una estructura de *gemin* de sal biliar que resulta de la unión al puente a través de enlaces amina. La proximidad de las unidades esteroide permite mejorar la capacidad solubilizadora a concentraciones bajas respecto a la *cmc* del monoesteroide de partida.<sup>2</sup> Este enlace amina permite la formación de sales de amonio cuaternario y convertirse en un *gemin* catiónico, biológicamente importante a la hora de interactuar con la doble hélice de ADN.<sup>3,4</sup>

Los dímeros que se pueden observar en la *figura VI.1.c* añadidos a disoluciones de sales biliares favorecen la micelización al disminuir su *cmc*.<sup>5</sup> Por ello, han sido propuestos para prevenir la reabsorción de los ácidos biliares en el tracto intestinal y así bajar el nivel de colesterol en el torrente sanguíneo.<sup>6</sup> Se han

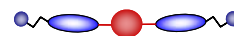


sintetizado también dímeros similares de ácido cólico y desoxicólico con propiedades antimicrobianas.<sup>7</sup> En este caso, los dímeros se unen a través de un enlace amida.



**Figura VI.1.-** Diferentes ejemplos de dímeros acíclicos unidos mediante enlace (a) amina, (b) amida y (c) éster.

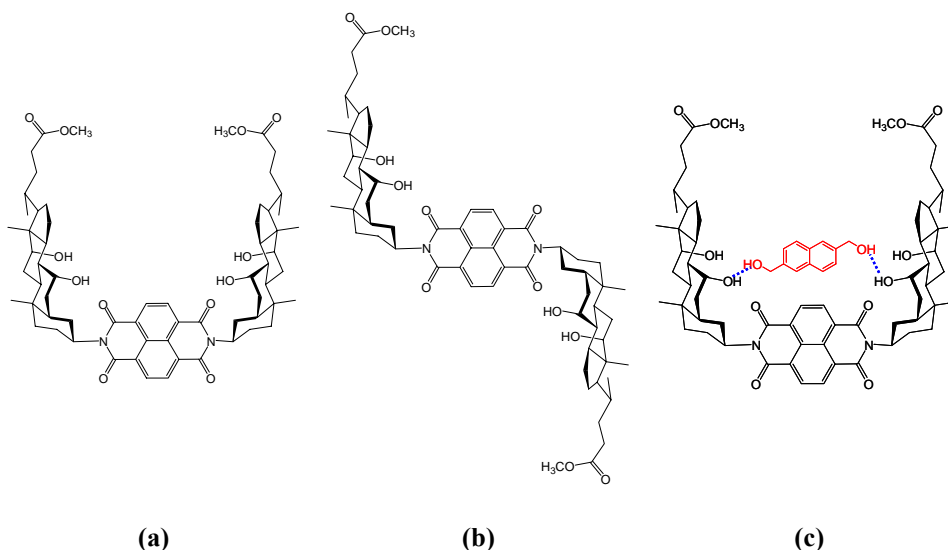
Otra clase importante de estos compuestos lo forman derivados análogos a los de la *figura VI.1.b*, denominados compuestos tipo *pinza*. Estos compuestos se pueden agrupar en torno a una determinada molécula de una forma similar a los procesos biológicos enzima-sustrato. La situación espacial de estos grupos así como sus propiedades químicas dan lugar a una estructura tipo *sandwich* en cuyo interior se localiza un determinado huésped. En este tipo de compuestos es más deseable la presencia de un grupo rígido que uno flexible, ya que en el primero se



ve restringida la movilidad de los grupos esteroide. Un análisis conformacional, mediante  $^1\text{H-RMN}$ , de la molécula a diferentes temperaturas nos muestra dos tipos de comportamiento diferente:

- En ausencia de una molécula huésped la *pinza* presenta dos tipos de conformación estables.
- En presencia de la molécula que se asocia presenta una única conformación.

Un ejemplo de este tipo de conformación se puede ver en la *figura VI.2*, aunqu la molécula no tiene porque presentar una unión imida.<sup>8</sup>



**Figura VI.2.-** Conformaciones más estables de una molécula tipo *pinza* en ausencia de huésped (**a y b**); y conformación más estable inducida por la presencia de 2,6-bis(hidroximetil)naftaleno (**c**). La conformación (**a**) se denomina “sin” y la (**b**) “anti”.

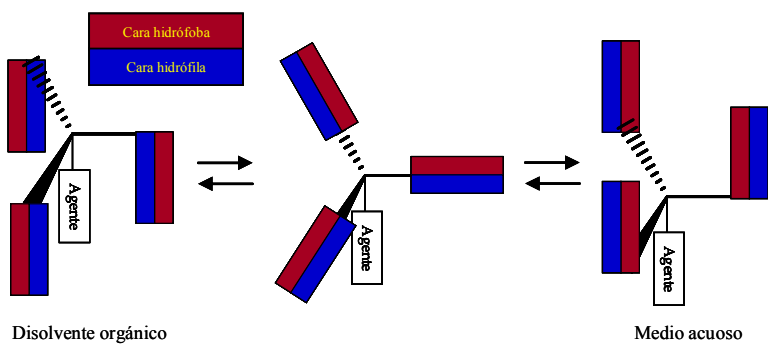
Otras moléculas de características similares, pero en este caso el grupo huésped va ligado a la molécula anfitrión, se denominan *paraguas*.<sup>9</sup> Este tipo de



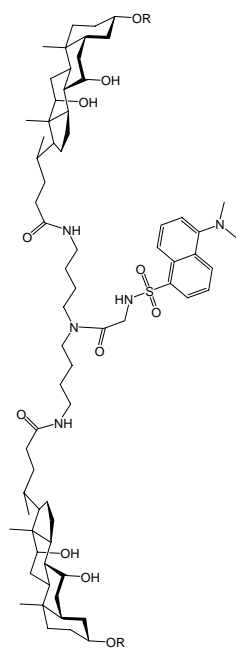
moléculas están diseñadas para actuar de escudo cuando un determinado compuesto se encuentra en un ambiente hostil, y ofrecen potenciales aplicaciones en el campo de diseño de fármacos. La construcción de este tipo de compuestos requiere la existencia dos superficies (una hidrófila y otra hidrófoba) y los derivados de sales biliares ofrecen esta peculiaridad. Bajo condiciones ambientales adecuadas, es decir, polaridad del disolvente o anfifilia de los esteroides combinada con la hidrofilia o hidrofobia del agente, pueden aparecer las siguientes situaciones:

1. Para agentes de marcado carácter hidrófobo en medios polares, las interacciones hidrófobas se maximizan en el caso de que la cara hidrófila de los esteroides se encuentren expuestas al medio, y el huésped se encuentre rodeado por la parte hidrófila. Si la disolución tiene lugar en un medio apolar, se producirá la situación inversa, tanto las caras hidrófobas de los esteroides como el agente, se encuentran expuestos al disolvente hidrocarbonado, y las interacciones por enlaces de hidrógeno de los hidroxilos del cuerpo del esteroide son las que dirigen las caras polares, como si se tratara de una micela inversa.
2. En el caso de que el agente sea polar (*figura VI.3.a*), se pueden proponer las siguientes hipótesis:
  - Difusión del agente hasta la superficie de las membranas biológicas, en una conformación en la que el agente se encuentra expuesto al medio.
  - Difusión a través de biomembranas cuando el agente se encuentra protegido por los esteroides.<sup>10-12</sup>

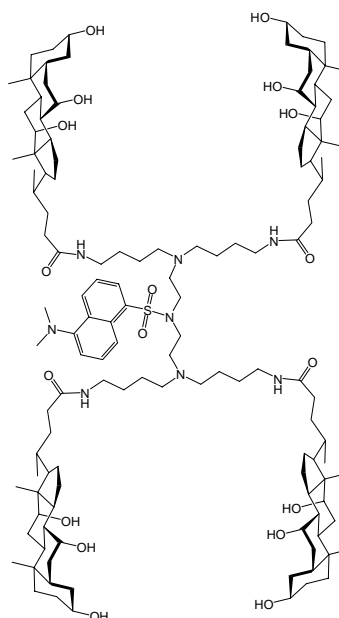
Las primeras *pinzas moleculares* diseñadas partiendo de moléculas de sales biliares estaban constituidas por dos unidades de ácido 1-pirenocarboxílico unidas a los grupos 3-OH y 12-OH del ácido cólico y/o desoxicólico, la distancia entre ellos es de unos 6-6,4 Å.<sup>13</sup> Estos derivados mostraron constantes de asociación moderadas con polinitrilos aromáticos, los cuales, al tener defecto de carga se acomodan entre las dos moléculas de pireno paralelas mediante un proceso de donación  $\pi$  (véase la *tabla VI.1*).



(a)



(b)



(c)

R: H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>

**Figura VI.3.-** (a) Esquema de actuación de un *paraguas* cuando el agente es hidrófilo. (b) Molécula *paraguas* dimérica, la fluorescencia del grupo dansilo hidrófilo indica cuál de las situaciones se da. (c) Molécula *paraguas* tetramérica que debería otorgar una mayor protección en disolventes apolares.

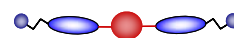


Tabla VI.1.- Diferentes tipos de *pinzas moleculares*.<sup>14,15</sup>

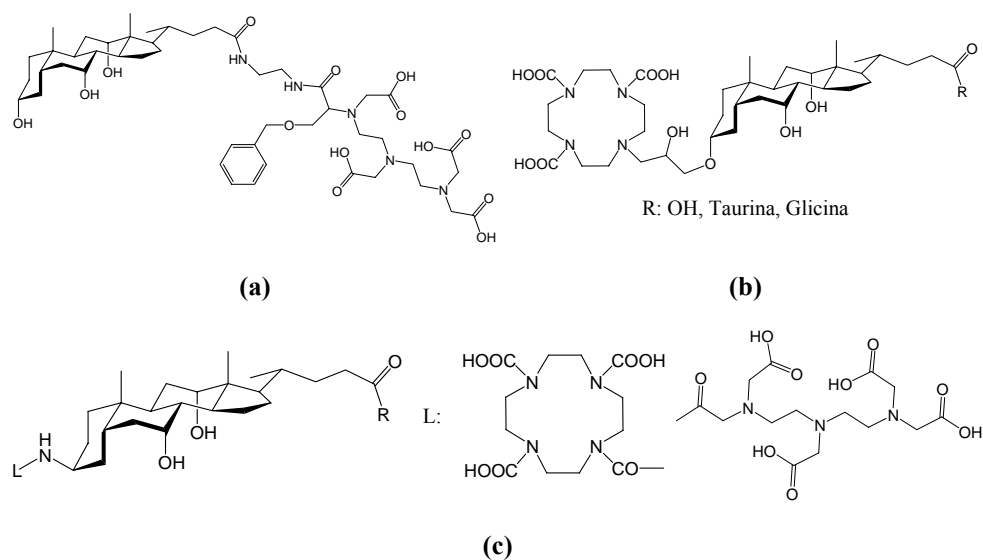
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Huésped (Y)
<p>X: H, OH, =O</p>			Diferentes tipos de nitrilos aromáticos
			9-N-butiladenina y Biotin metiléster

Los métodos de cálculo computacional son muy útiles en el diseño de estas nuevas estructuras supramoleculares, especialmente en la elaboración de moléculas hospedadoras para diferentes clases de huéspedes. Los cálculos teóricos hacen posible una *estimación* de si la cavidad tiene el espacio suficiente para un huésped determinado o no. Este tipo de cálculos puede evitar la síntesis de moléculas que no tengan las características buscadas. Por ejemplo, un análisis computacional previo sobre la capacidad de complejación de moléculas aromáticas por las *pinzas moleculares*, indicaba que estas moléculas serían embebidas perfectamente por las pinzas, hecho que más tarde sería corroborado por el análisis de la estructura cristalina mediante Rayos X.<sup>13</sup> Rao y Maitra usando el software PCMODEL, minimizaron todas las posibles combinaciones de un par ácido bencenodicarboxílico en la generación de un nuevo tipo de *pinza molecular* receptora de adenina y biotina, encontrando que sólo una de las nueve posibles combinaciones poseía la orientación correcta para asociar la adenina. Esto redujo considerablemente el trabajo sintético que, sin estos cálculos, se habría realizado.<sup>16</sup>

En la década de los noventa se generalizó el uso de complejos de gadolinio con ligandos poliaminopolicarboxílicos como agentes de contraste en la técnica de



Resonancia Magnética de Imagen. Después de una inyección intravenosa el agente de contraste llegaba a un equilibrio entre la sangre y el fluido intersticial, pero no podía penetrar las membranas celulares. Anelli *et al*<sup>17</sup> sintetizaron derivados del ácido dietilentriaminopentaácetico (DTPA) y 1,4,7,10-tetraazociclodecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) de ácido cólico (*figura VI.4*). Partiendo del dato experimental de que  $\text{Log}(K_{ML})=19$  para los complejos de Gd con esos ligandos, obtuvieron que: (i) los derivados de la posición tres presentaban una mayor eliminación por vía hepática, (ii) los derivados que conservan la configuración en la posición C3 entran en la circulación Na/taurocolato, lo que les permite llegar a los hepatocitos, y (iii) los derivados de ácido cólico parecen más efectivos que sus derivados conjugados de glicina y taurina.



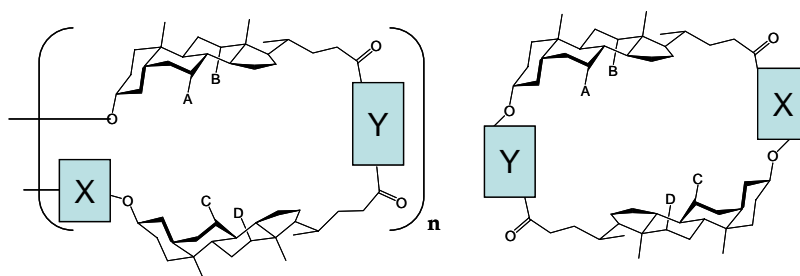
**Figura VI.4.-** Derivados con una constante de complejación con el gadolinio elevada, con posibilidades de ser usados como agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen Intracelular. (a) Derivado del ácido cólico por la posición de la cadena lateral con el ácido dietilentriaminopentaácetico (DTPA) (b) Derivado por la posición C3, conservando la configuración del ácido cólico, con el ácido 1,4,7,10-tetraazociclodecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). (c) Derivado por la posición C3 con inversión de configuración con el DTPA y el DOTA.



Se han desarrollado también, como en otros compuestos usados en el estudio de la circulación hepática y/o intestinal, sondas fluorescentes de los ácidos biliares con grupos fluoróforos en la cadena lateral como la aminofluoresceína.<sup>18</sup>

### ***Oligómeros cíclicos de ácidos biliares: cicocolatos y colafanos***

En los últimos años los compuestos que más interés están suscitando son los derivados cíclicos, en este caso, la libertad conformacional de una estructura cíclica se ve muy restringida con respecto a los derivados de estructura abierta y además pueden servir de modelos gracias a su posible mimetismo con centros receptores biológicos. Los derivados cíclicos de ácidos biliares se pueden agrupar en: colafanos, cicocolatos y cicocolatos ligados a anillos porfirínicos (véase la figura VI.5).

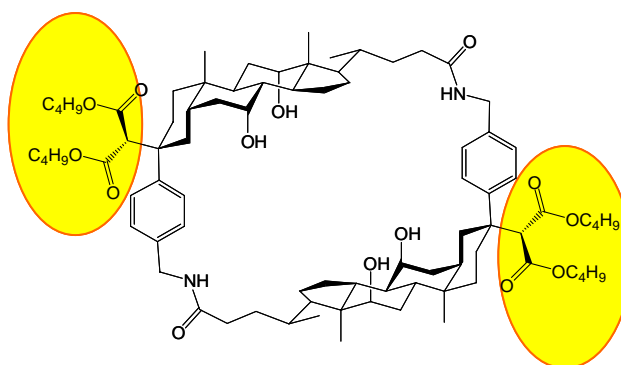


**Figura VI.5.-** Estructuras de colafanos según sean cabeza-cabeza (izquierda), o cabeza-cola (derecha). Donde X e Y son moléculas puente y, A, B, C y D son H u OH, o bien pueden ser grupos catalíticos o con funcionalidad específica.<sup>19</sup>

Los colafanos son estructuras donde los espaciadores son grupos aromáticos que se encuentran unidos al núcleo esteroide. Estos grupos aromáticos se suelen unir a la posición C3 haciendo una doble función: cerrar la estructura y al mismo tiempo acentuar la curvatura natural de las sales biliares debido a la estructura en *cis* de los anillos A y B (posición 5 $\beta$ ). Estas estructuras generan espacio suficiente para acomodar a un gran número de huéspedes que se pueden unir mediante enlaces de hidrógeno con los hidroxilos esteroides en posición 7 y 12 $\alpha$  si poseen la funcionalidad adecuada. Además, se puede ejercer un control complementario sobre la solubilidad en cualquier disolvente mediante la adición de



grupos de polaridad deseada hacia el exterior de la cavidad.<sup>20</sup> Por ejemplo, el colafano de la *figura VI.6* da lugar a la formación de complejos 1:1 con  $\beta$ -D-glucósidos con una constante de asociación de  $K_{as}=1560 \text{ M}^{-1}$ .<sup>21,22</sup>



**Figura VI.6.-** Colafano de gran solubilidad en cloroformo gracias a los grupos remarcados dirigidos hacia el exterior de la cavidad.

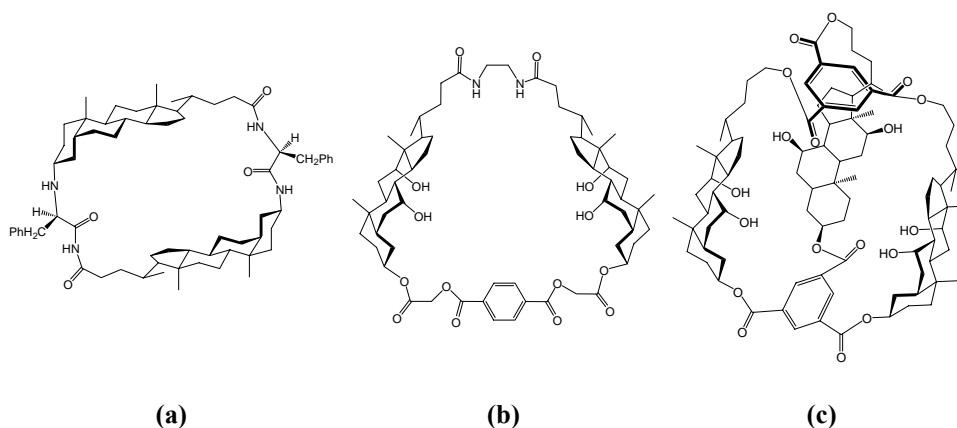
La quiralidad de los colafanos, la presencia de diferentes tipos de puentes de unión y la variedad en el número de unidades esteroides, permite el diseño de cavidades ajustables a huéspedes de diferentes tamaños. Además se puede cambiar la polaridad de la cavidad pasando de una cavidad de carácter lipófilo si usamos litocólico, a una cavidad hidrófila en el caso del ácido cólico (*figura VI.7*). Además, estos derivados cíclicos pueden estar orientados en el sentido *cabeza-cola* (entendiendo la posición de anillo A como la cabeza y la cadena lateral como la cola) o *cabeza-cabeza*, siendo la cavidad hospedadora de estos últimos bastante asimétrica, lo que favorece el reconocimiento estero y enantio-selectivo de moléculas polares.<sup>23</sup>

También se pueden realizar estos derivados cíclicos mediante enlaces tipo amida, que además de ser más resistentes a la hidrólisis, ofrecen la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno.

Los cicocolatos son estructuras que contienen de 2 a 6 unidades esteroides unidos mediante un proceso de ciclación *cabeza-cola*. El procedimiento general de



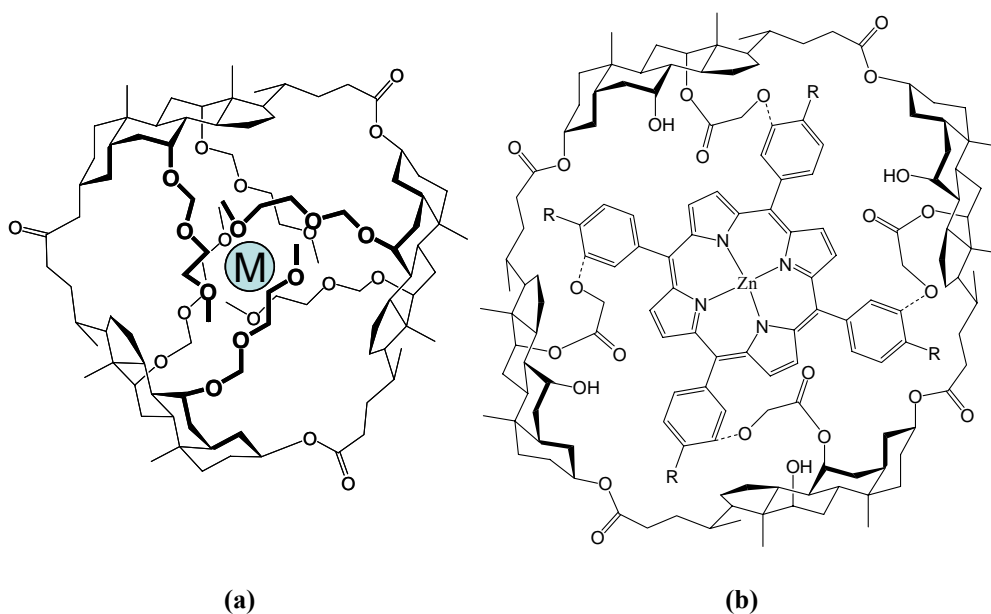
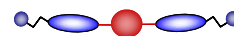
síntesis, al igual que para los colafanos, empieza con la preparación de los oligómeros monoméricos o diméricos lineales de ácidos biliares. Si la unión se realiza mediante enlaces amida, los compuestos se suelen denominar ciclocolanamidas.



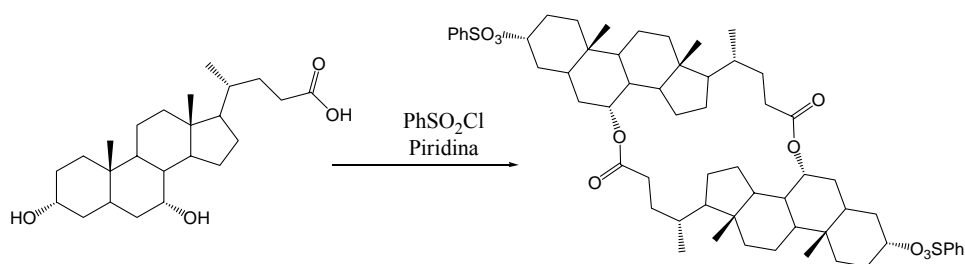
**Figura VI.7.-** Ejemplos de colafanos. **(a)** Cavidad totalmente apolar compuesta de unidades de litocólico. **(b)** Cavidad más polar debido a los grupos hidróxilo del ácido cólico, con dos tipos de enlace al puente: amida y éster. **(c)** Colafano trimérico dicíclico.

En estas moléculas, algunos oxígenos esteroides se pueden utilizar para construir macrolactonas, como la 3,24-lactona, 7,24-lactona o 12,24-lactona en función de los OH implicados. Estas lactonas ofrecen la posibilidad de poder realizar diferentes funciones. Por ejemplo, el trímero de la *figura VI.8.a* da lugar a una cavidad que puede hospedar iones metálicos, y si la cavidad es mayor, puede acomodar incluso un anillo porfirínico en su interior como muestra la *figura VI.8.b*.

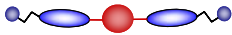
La ciclación no tiene por qué ser necesariamente a partir del anillo A, como se muestra en la *figura VI.9*, donde se ha usado el ácido quenodesoxicólico como elemento de partida y la ciclación se realiza a partir del grupo hidroxilo en posición 7.



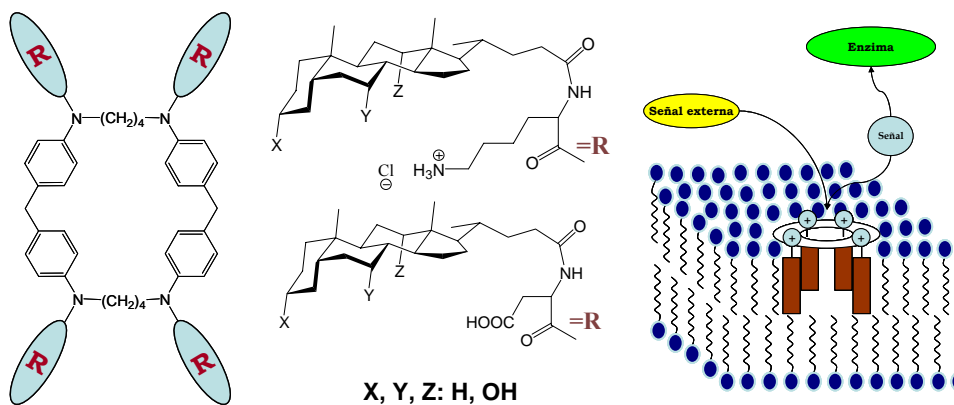
**Figura VI.8.-** (a) Ciclocolato trimérico que actúa de anfitrión de iones metálicos. (b) Ciclocolato tetramérico con un anillo porfirínico en su interior, lo que permite procesos de transferencia electrónica.



**Figura VI.9.-** Síntesis de un ciclocolato de cavidad reducida y con unión al anillo B.

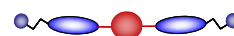


Otro grupo de derivados son aquellos en los que los esteroides se encuentran unidos a un macrociclo, bien sea un calixareno u otro tipo de macrociclos.<sup>24</sup> Los esteroides les confieren un carácter anfífilo que les permite agregarse en medio acuoso. La concentración de agregación crítica (*cac*) presenta unos valores de 6-35  $\mu\text{M}$  para los compuestos de la *figura VI.10*. Aunque el tipo de agregado al que dan lugar éstos no ha sido todavía esclarecido, se sabe por medio de técnicas de *Light Scattering* que los agregados presentan un diámetro hidrodinámico entre los 160 nm y 650 nm. A pesar de la complejidad de su agregación en agua estos ciclofanos esteroides presentan un comportamiento de complejación huésped-anfitrión 1:1 en un intervalo de concentraciones tanto mayores como menores a su *cac*. Esto indica que la hidrofobia de su cavidad tridimensional no esteroide es muy superior al espacio intermolecular hidrófobo que generan las moléculas de esteroides.<sup>25</sup>



**Figura VI.10.-** Ejemplo de la estructura típica de los ciclofanos de esteroides, representación esquemática del ciclofano embebido en la membrana celular y su posible colaboración con una enzima en función de una señal externa como, por ejemplo, un sacárido como la pentosa.

Teniendo en cuenta también que muchos procesos metabólicos que tienen lugar en las células se producen a través de procesos de activación mediante señales que reciben receptores específicos, nos encontramos con un grupo de

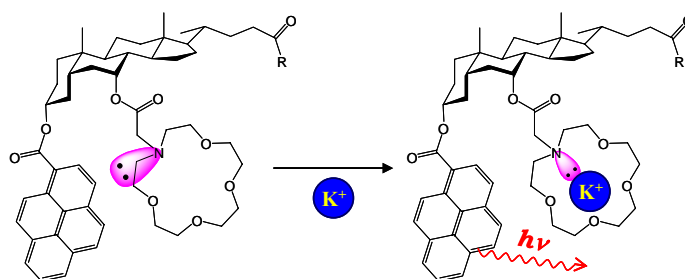


compuestos con una gran capacidad para ser usados como receptores superficiales de membrana o como canales de iones,<sup>26</sup> ya que cumplen los siguientes requisitos:

1. El receptor es capaz de reconocer una señal del medio.
2. El receptor es capaz de modificar su afinidad a un determinado compuesto en función de la señal anterior.

Este tipo de moléculas pueden actuar como canales catiónicos para  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , bien en forma de molécula *paraguas* tetra- o di-funcionalizadas.<sup>27,28</sup>

Una nueva aplicación de los derivados esteroides es su uso como sensores cuantitativos de cationes en disolución. Estas moléculas combinan un grupo fluoróforo (pireno) y un grupo receptor de cationes como un éter corona (*figura VI.11*).<sup>29</sup> El par de electrones no enlazante del nitrógeno de la sonda catiónica actúa de desactivador del grupo fluoróforo. Pero en presencia de iones potasio, ese par de electrones se ve comprometido con el catión con lo que la fluorescencia se ve aumentada, mediante un mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida. Estos sensores de iones potasio tienen un buen rendimiento en disolventes orgánicos, mientras que para mejorar sus características de sensor en medio acuoso necesitan ser fijados a una resina.<sup>30</sup>



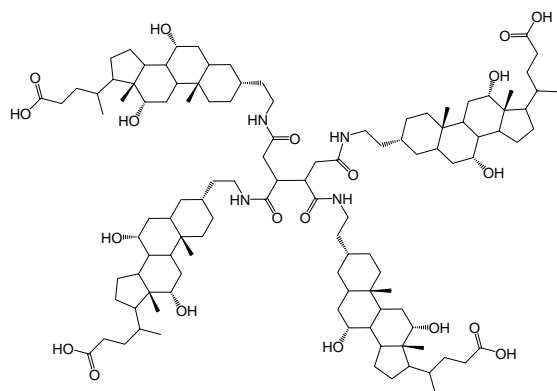
**Figura VI.11.-** Mecanismo de transferencia electrónica fotoinducida (PET) mediante ión potasio de un derivado del ácido quenodesoxicólico.

Por dendrímtero se entiende una estructura molecular monodispersa de tipo globular y altamente ramificadas. Hay ejemplos de moléculas generadas a partir de sales biliares tipo oligómeros, trímeros y tetrámeros cuya estructura recuerda a un núcleo dendrítico, pero no son dendrímteros reales debido a su bajo nivel de



ramificación (*figura VI.12*). Para poder considerar una molécula como dendrímero debe poseer tres regiones diferenciadas: un núcleo, las ramificaciones y los grupos finales.

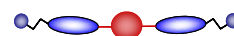
Existen dos tipos de rutas sintéticas que se usan para la generación de dendrímeros; una ruta divergente, en la que los monómeros se van añadiendo sucesivamente en diferentes capas o generaciones y, una ruta convergente donde las ramificaciones, llamadas dendrones, se crean de manera aislada y después se ensamblan al núcleo central obteniendo un dendrón con las generaciones deseadas.



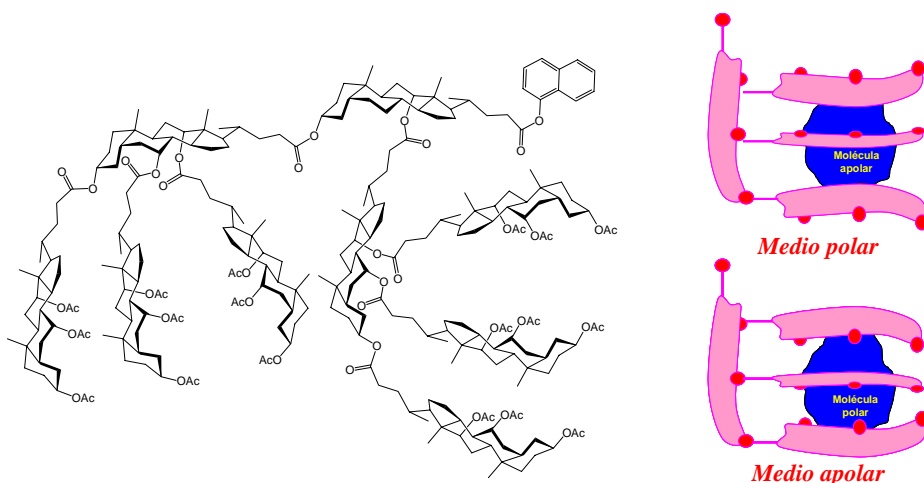
**Figura VI.12.-** Enhsen *et al*<sup>31</sup>. sintetizaron tetrámeros basados en el ácido cólico. Estos compuestos fueron diseñados como agentes para disminuir la concentración de colesterol en sangre.

Debido a su biocompatibilidad estas bases dendríticas formadas por derivados de ácidos biliares tienen potenciales aplicaciones como transportadores de medicamentos. Maitra *et al*<sup>32</sup> publicaron la síntesis de una base dendrítica usando las sales biliares en el año 1999. Se trata de un dendrón de segunda generación en la que el núcleo está formado por ácido desoxicólico y las ramificaciones son de ácido cólico (véase la *figura VI.13*). Con un dendrímero de estas características se obtienen estructuras micelares en todo el intervalo de concentraciones, en realidad, generan lo que se denomina micelas unimoleculares. Los dendrímeros podrán adoptar una conformación u otra dependiendo de la polaridad del medio<sup>33</sup> como sucede con las moléculas *paraguas*.

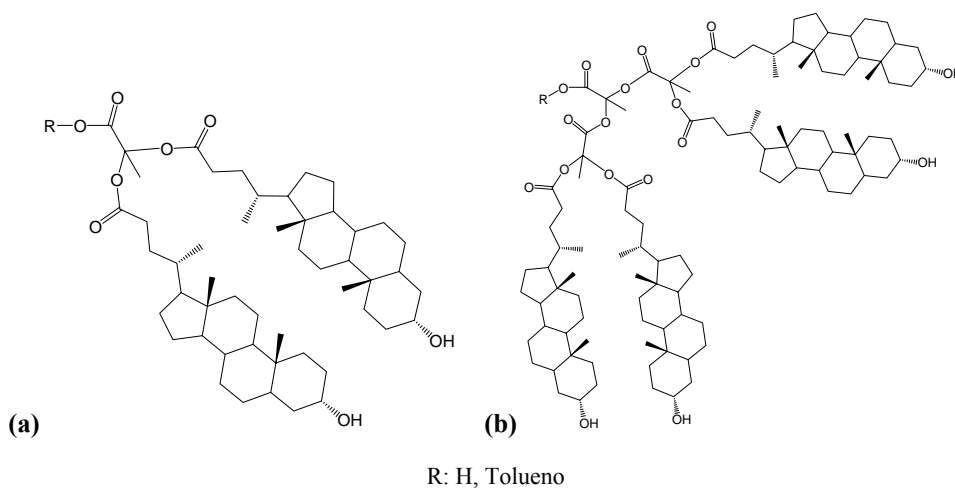
Otra clase de dendrones son los sintetizados por el grupo de investigación de Ropponen *et al*,<sup>34</sup> quienes han sintetizado dendrones de primera y segunda generación (*figura VI.14*), con una estructura muy semejante a la que presentan dendrímeros convencionales.<sup>35</sup> Victor H. Soto<sup>36</sup> ha sintetizado dendrímeros similares utilizando puentes amida para acoplar las distintas unidades. Todos estos



esteroides diméricos y oligoméricos están creando un campo emergente y prometedor en el campo de la arquitectura e ingeniería molecular.



**Figura VI.13.-** Base dendrítica sintetizada por Maitra *et al.*<sup>32</sup> Representación del modelo de inclusión de diferentes compuestos en función del medio.

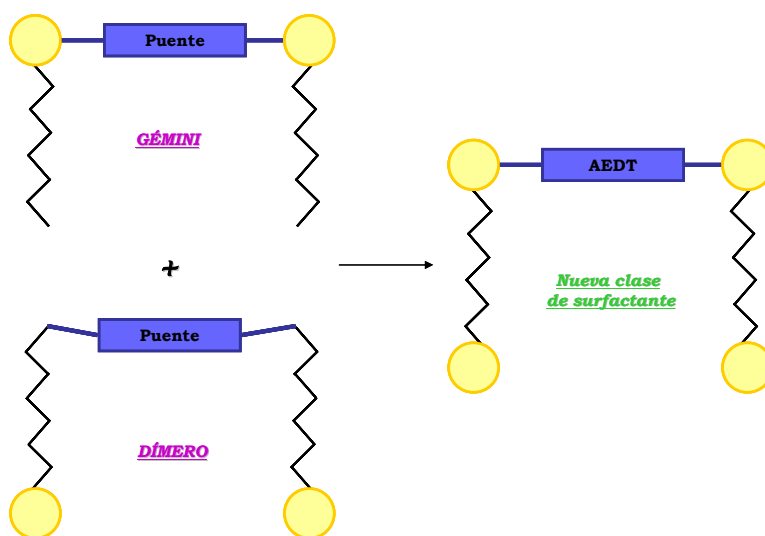


**Figura VI.14.-** (a) Dendrón de primera generación. (b) Dendrón de segunda generación, sintetizados por Ropponen *et al.*<sup>35</sup>



## VI.2.- NUEVOS SURFACTANTES DIMÉRICOS: $d\text{-}2\text{C}_3\text{-AEDT}$ y $d\text{-}2\text{DC}_3\text{-AEDT}$

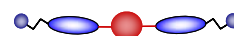
En este apartado describimos la síntesis de un nuevo tipo de dímero de sal biliar (*figura VI.15*). Se trata de una molécula híbrida entre un surfactante *gemini* (los monómeros se unen mediante un puente a través de las posiciones polares de los mismos) y un surfactante dimérico tipo “bolaform” (dímero constituido por la unión de los monómeros mediante un puente ligado a las posiciones apolares de la molécula).



**Figura VI.15.-** Esquema de la nueva clase de dímeros de sales biliares.

La síntesis de estos nuevos derivados se ha realizado mediante la activación de los ácidos carboxílicos del puente, en este caso el AEDT, mediante el agente DEPC. Este reactivo produce un anhídrido mixto de fósforo y carbono con el ácido carboxílico que es capaz de reaccionar de forma regioselectiva con aminas para la generación de enlaces amida. El procedimiento experimental puede verse en el *apéndice A*, y el esquema de reacción aparece en la *figura VI.16*.

La estructura de estos dímeros recuerda a la del tetrámero presentado en la *figura VI.12*. La arquitectura de estas moléculas es muy novedosa ya que presentan cuatro cabezas polares: dos grupos iónicos que forman parte del puente y otros dos



grupos polares de la sal biliar (cadena lateral en posición 17) que le debería conferir una mayor solubilidad en agua. Además, se conserva la peculiar estructura tridimensional de los grupos esteroides con lo que podría actuar como agente reductor de colesterol en sangre.

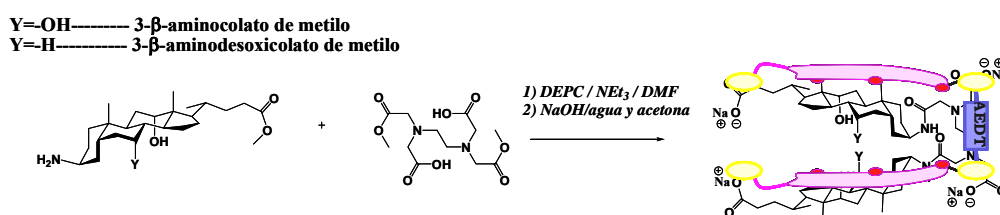


Figura VI.16.- Ruta sintética de los dímeros  $d-2C_3-AEDT$  y  $d-2DC_3-AEDT$ .

#### Determinación de la *cmc* de los dímeros $d-2DC_3-AEDT$ y $d-2C_3-AEDT$ por tensión superficial y fluorescencia

La determinación de la *cmc* para estos dos surfactantes se ha realizado mediante medidas de tensión superficial,  $\gamma$  ( $mN\ m^{-1}$ ), y a través de medidas de fluorescencia utilizando como sonda fluorescente el pireno.

Al diluir una disolución de tensioactivo, la tensión superficial aumenta hasta alcanzar el valor de la tensión superficial del disolvente. Este incremento no se produce de forma lineal, sino que puede sufrir ciertos cambios que dependen de las etapas de agregación que se producen dentro de la disolución al variar la concentración de surfactante (ver *apéndice B*). El valor de la tensión superficial nos da idea del estado en el que se encuentran las moléculas de tensioactivo, en forma de monómero, o formando diferentes tipos de agregados. En la *figura VI.17* se pueden ver las gráficas  $\gamma$ -LnC para los dos dímeros estudiados en este capítulo. La ausencia de mínimos en estas curvas evidencia la ausencia de impurezas superficialmente activas en las disoluciones utilizadas, hecho previsible debido al elaborado procedimiento de síntesis y purificación realizado hasta la obtención del producto final tal y como se indica en las técnicas de síntesis y caracterización que se muestran en el *apéndice A*. Es interesante hacer notar que la curva  $\gamma$ -LnC para el  $d-2C_3-AEDT$  muestra una zona que se podría llamar de preagregación.

Los valores obtenidos para la *cmc* de ambos dímeros son muy similares a los de la sal biliar de partida, siendo para el desoxicolato sódico  $10\ mM^{37}$  y  $6,74$



mM para el dímero *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT*. Igualmente para el colato sódico<sup>38</sup> la *cmc* alcanza valores en torno a 15-20 mM mientras que para el dímero *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* el valor es 19,62 mM (tabla VI.2). Sin embargo, si se compara la *cmc* del monómero colato-3-amino succinato de sodio (ver capítulo III), que posee la misma relación carga:núcleo esteroide que los dos dímeros aquí sintetizados, tiene lugar una reducción considerable en el valor de la *cmc* del dímero. La molécula de colato-3-amino succinato de sodio tiene dos cargas negativas en los dos extremos flexibles de la molécula, además de la cara  $\alpha$  hidrofílica del núcleo esteroide. Por lo tanto, comparativamente, la molécula presenta una superficie hidrófila mayor que el área hidrófoba que el ácido biliar de partida, lo que conduce a una mayor solubilidad en disolución acuosa y a una menor tendencia a la agregación.

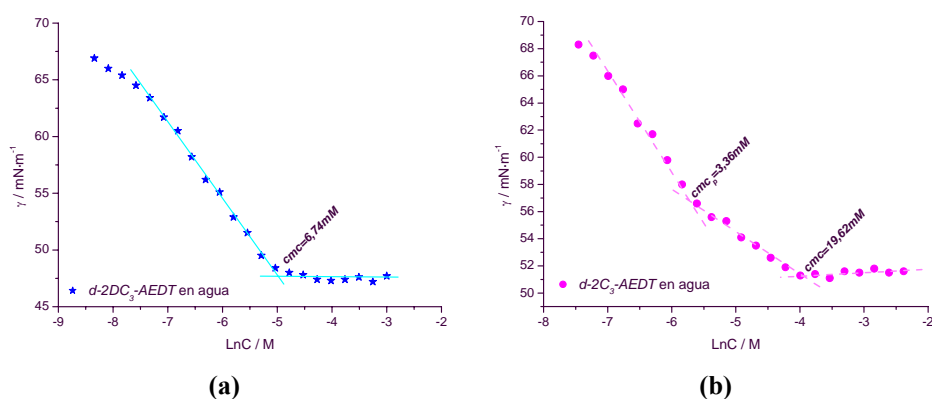
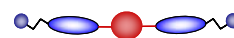


Figura VI.17.- Gráficas  $\gamma$ -LnC para el *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* (a) y el *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* (b) en agua ( $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

Tabla VI.2.- Datos experimentales obtenidos desde la curva  $\gamma$ -LnC. Experiencias realizadas a  $T=25,0\pm 0,5^\circ\text{C}$ . <sup>a</sup>Número de puntos experimentales; <sup>b</sup> $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ; <sup>c</sup> $\text{\AA}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$ ; <sup>d</sup>mM, <sup>e</sup> $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Tensión superficial en la *cmc*.

dímero	N <sup>a</sup>	$10^7\cdot\Gamma_1^b$	$a_1^c$	$cmc_p^d$	$\Gamma_2^b$	$a_2^c$	$cmc^d$	$\gamma_{cmc}^e$
<i>d-2DC<sub>3</sub>-AEDT</i>	22	5,63	295				6,74	47,3
<i>d-2C<sub>3</sub>-AEDT</i>	23	5,53	300	3,36	2,68	620	19,62	51,5

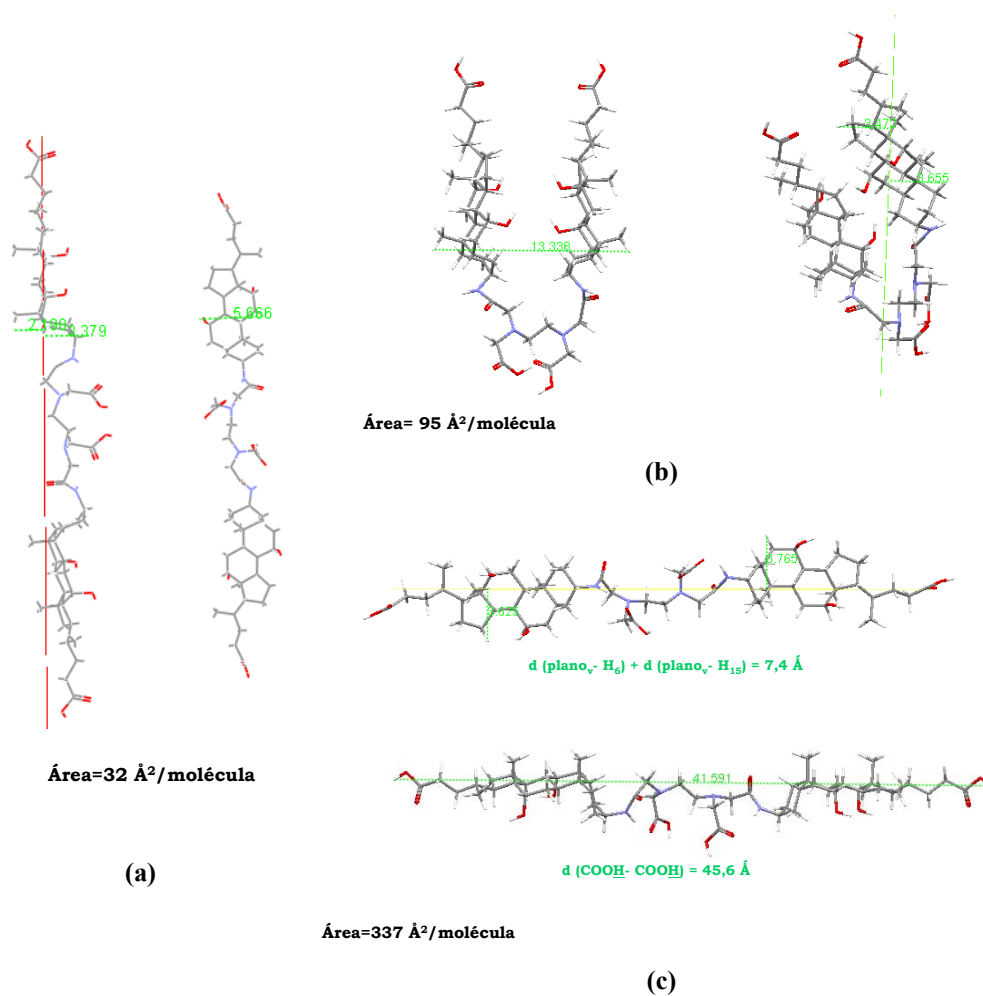


Las curvas de tensión superficial fueron realizadas en disolución acuosa sin ningún tipo de electrolito añadido y al pH natural de la disolución, en torno a 9,5. En la *tabla VI.2* aparecen los resultados de exceso superficial ( $\Gamma$ ), área superficial por molécula ( $a$ ) y el valor de concentración micelar crítica ( $cmc$ ). Para el cálculo, se ha tenido en cuenta el valor del número de especies posibles en la interfase de  $n=5$  para el que se han realizado las siguientes aproximaciones: (i) no formación de pares iónicos y, (ii) los nitrógenos centrales del puente AEDT no se encuentran protonados al pH de la disolución ( $pK_{a1}=3,6-4,2$  y  $pK_{a2}=7,1-8,1$ ).<sup>39</sup>

Previamente, se realizó una estimación del área de las moléculas utilizando modelos moleculares de los dímeros en diferentes posiciones en la interfase aire-agua (*figura VI.18*). Así, para una disposición apical se obtuvo un área estimada por molécula aproximada de  $32 \text{ \AA}^2$ , para una disposición en V, un valor de  $95 \text{ \AA}^2$  y por último, para una posición totalmente estirada resultó de  $337 \text{ \AA}^2$  (*figura VI.18*). Teniendo en cuenta los resultados de la *tabla VI.2*, se podría predecir que las moléculas de los nuevos derivados estarían muy cerca de una disposición completamente estirada en la interfase aire-agua. Estos valores concuerdan con los de las sales biliares convencionales recogidos en la bibliografía (*vide supra*).<sup>40,41</sup>

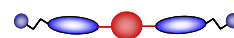
En el trabajo de Carnero-Ruiz *et al*<sup>42</sup> los valores reales de la  $cmc$  de un surfactante a partir del análisis Boltzmann de las curvas que representan la intensidad de las bandas de vibración 1 y 3 del pireno ( $I_1/I_3$ ) frente al  $\ln C$  son: si  $|x_0/\Delta X| < 10$ , se debería considerar como  $cmc_{\text{real}}$  el valor de  $cmc_2$  (ver *figura V.10* del capítulo V) mientras que si  $|x_0/\Delta X| > 10$  se tomaría como correcto el valor de  $x_0$  o punto de inflexión de la curva. Si se tiene en cuenta este supuesto, para ambos dímeros se tendría que considerar el valor  $cmc_2$  (véase la *tabla VI.3*), valores comprendidos en todas las experiencias realizadas en el intervalo 21-44 mM para el dímero del desoxicolato y entre 48-53 mM para el dímero del colato.

En este caso, esta hipótesis no parece la más adecuada para los dos dímeros, ya que al comparar los datos de  $cmc$  obtenidos mediante fluorescencia con los resultados experimentales de las medidas de tensión superficial, son los valores de  $cmc$  obtenidos a partir del punto de inflexión de la curva de fluorescencia los que muestran unos valores casi idénticos. Si tomamos como valor de  $cmc$  real el que se calcula a partir del punto de corte de las dos rectas a mayor concentración, el resultado que proporcionan las dos técnicas es muy dispar, siendo un orden mayor el valor obtenido por fluorescencia.



**Figura VI.18.-** Posibles disposiciones de las moléculas de dímeros *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* en la interfase aire-agua: **(a)** posición apical, **(b)** posición en forma de V, **(c)** posición totalmente estirada.

Es bien conocido que la relación de las intensidades de las bandas de vibración del pireno 1 y 3 solubilizado en una disolución micelar refleja la polaridad del microentorno del pireno. El valor de esta relación es 0,79 para el NaC<sup>43</sup> y de 0,73 para el NaDC,<sup>43</sup> valores muy similares a los experimentales para



los nuevos dímeros (tabla VI.3). Teniendo en cuenta que  $I_1/I_3$  es de 0,54 para el ciclohexano y de 1,70 para el agua se deduce que el interior de los agregados, donde se ubica la sonda fluorescente, es marcadamente apolar.

**Tabla VI.3.-** Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y del ajuste tipo Boltzmann para el *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y el *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* (T=25,0±0,5°C).

	T/°C	x <sub>0</sub>	Δx	r <sup>2</sup>	cmc <sub>0</sub> /mM	cmc <sub>2</sub> /mM	A <sub>2</sub>	A <sub>2exp</sub>	x <sub>0</sub> /Δx
<i>d-2DC<sub>3</sub>-AEDT</i>	10	-5,32	0,72	0,9997	4,89	20,69	0,75	0,77	7,36
	25	<b>-4,98</b>	<b>0,74</b>	<b>0,9993</b>	<b>6,85</b>	<b>28,61</b>	<b>0,75</b>	<b>0,79</b>	<b>6,75</b>
	40	-4,72	0,80	0,9994	8,92	43,89	0,75	0,77	5,89
<i>d-2C<sub>3</sub>-AEDT</i>	10	-4,54	0,87	0,9980	10,63	47,95	0,74	0,81	5,21
	25	<b>-4,41</b>	<b>0,76</b>	<b>0,9993</b>	<b>12,18</b>	<b>48,37</b>	<b>0,77</b>	<b>0,81</b>	<b>5,81</b>
	40	-4,24	0,71	0,9985	14,34	53,34	0,76	0,80	5,94

### Análisis termodinámico del *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y del *d-2C<sub>3</sub>-AEDT*

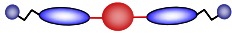
El análisis termodinámico requiere la determinación de la *cmc* a diferentes temperaturas. La técnica empleada ha sido la fluorescencia del pireno, tomando como *cmc<sub>real</sub>* el valor del punto de inflexión de la curva. Se prepararon muestras de diferente concentración de los dímeros *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* en disolución acuosa siendo la concentración de pireno empleada 6 μM (concentración muy inferior a la de tensioactivo).

A partir de los valores de *cmc* se pueden obtener los parámetros termodinámicos: energía libre estándar de micelización ( $\Delta G_m^0$ ), entalpía ( $\Delta H_m^0$ ) y entropía ( $\Delta S_m^0$ ), de acuerdo con el modelo de equilibrio visto en el capítulo V.<sup>44</sup> De acuerdo con este modelo, el proceso de agregación se puede describir como:

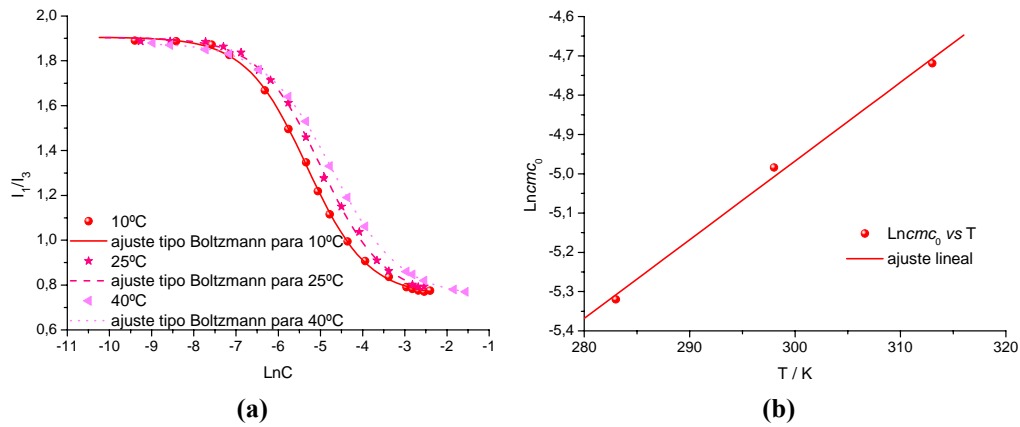


donde S<sup>-</sup> representa la concentración de surfactante, C<sup>+</sup> la concentración de contraiones y, M<sup>p</sup> el agregado formado por *n* monómeros con una carga efectiva *p*.

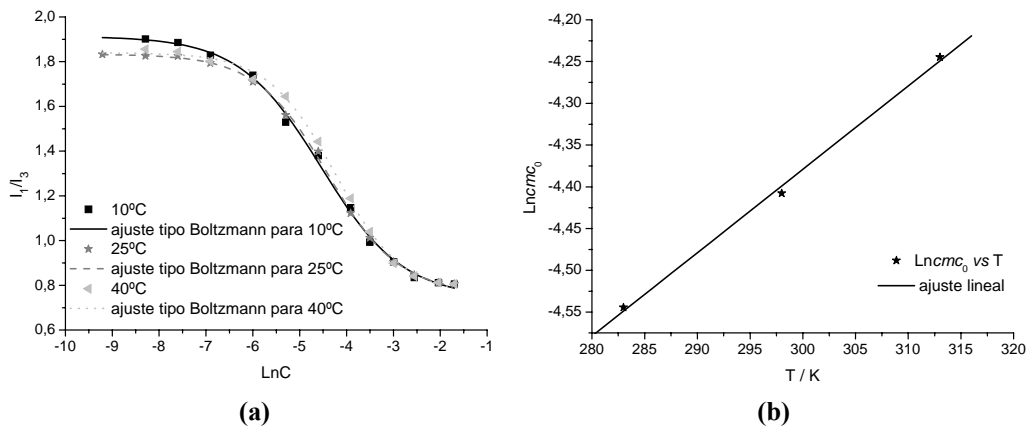
En las figuras VI.18 y VI.19 se representan las curvas  $I_1/I_3$  vs LnC para cada temperatura así como la variación del  $\text{Ln}cmc_0$  con la temperatura para los dímeros derivados de los ácidos 3-β-amino desoxicólico y 3-β-amino cólico,



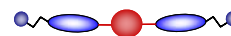
respectivamente. Los parámetros derivados del ajuste de las curvas  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$ , a cada temperatura, para los dos surfactantes, se pueden ver en la *tabla VI.3* y los parámetros termodinámicos del proceso de micelización se resumen en la *tabla VI.4*.



**Figura VI.18.-** (a) Gráficas  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  para cada temperatura para el sistema  $d-2DC_3-AEDT$  en agua. (b) Datos experimentales de la representación gráfica  $\text{Ln}cmc_0$  vs  $T$  para el sistema  $d-2DC_3-AEDT$  en agua.



**Figura VI.19.-** (a) Gráficas  $I_1/I_3$  vs  $\text{Ln}C$  para cada temperatura para el sistema  $d-2C_3-AEDT$  en agua. (b) Datos experimentales de la representación gráfica  $\text{Ln}cmc_0$  vs  $T$  para el sistema  $d-2C_3-AEDT$  en agua.



**Tabla VI.4.-** Parámetros termodinámicos obtenidos experimentalmente para los dímeros *d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT y *d*-2C<sub>3</sub>-AEDT en disolución acuosa:  ${}^a\Delta G_m^0$  (dímero) =  $RT \cdot (1,5-\alpha) \cdot Lncmc$  ( $\alpha=0,7^{45,\#}$ );  ${}^b\Delta H_m^0 = -RT^2 \cdot \partial(Lncmc)/\partial T$  y  ${}^c\Delta S_m^0 = (\Delta H_m^0 - \Delta G_m^0)/T$ .

dímero	T/K	$Lncmc_0$	${}^a\Delta G_m^0$ kJ·mol <sup>-1</sup>	${}^b\Delta H_m^0$ kJ·mol <sup>-1</sup>	${}^c\Delta S_m^0$ J·(mol·K) <sup>-1</sup>	$T\Delta S_m^0$ kJ·mol <sup>-1</sup>
<i>d</i> -2DC <sub>3</sub> -AEDT	283	-5,32	-10,01	-13,34	-11,74	-3,32
	298	<b>-4,98</b>	-9,88	-14,79	-16,48	-4,91
	313	-4,72	-9,82	-16,31	-20,74	-6,49
<i>d</i> -2C <sub>3</sub> -AEDT	283	-4,54	-8,55	-9,87	-4,67	-1,32
	298	<b>-4,41</b>	-8,74	-10,95	-7,42	-2,21
	313	-4,24	-8,84	-12,08	-10,36	-3,24

Existen datos bibliográficos para las sales sódicas del colato y del desoxicolato en ausencia y presencia de electrolito que nos van a permitir realizar una comparación entre estos nuevos dímeros y las sales biliares clásicas (véase la *tabla V.13* en el *capítulo V*).<sup>46,47</sup> El signo negativo de la energía libre de Gibbs nos indica que el proceso de agregación observado ocurre de manera espontánea, aunque éstos tienen unos valores de energía libre más positivos que el NaDC y NaC.

Del mismo modo que en el proceso de micelización de dímeros de surfactantes convencionales, para estos nuevos dímeros podemos asumir la presencia de cuatro factores energéticos:<sup>48</sup> transferencia de los esqueletos esteroide del dímero desde el agua al interior de las micelas (ambiente menos polar), cambio en la conformación de las cadenas laterales, interacciones electrostáticas y/o estéricas entre las cabezas polares y cambio en la solvatación del puente.

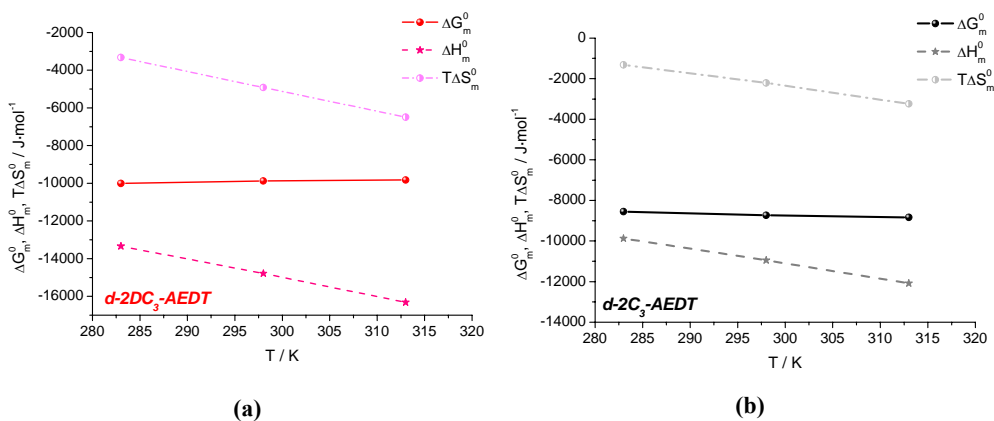
En el intervalo de temperaturas estudiado podemos observar que el efecto predominante del proceso de micelización es en todos los casos el entálpico, que aumenta con la temperatura al igual que el efecto entrópico, manteniéndose  $\Delta G_m^0$  prácticamente constante con un valor de aproximadamente -10 kJ/mol para el dímero *d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT y -8,7 kJ/mol para el dímero *d*-2C<sub>3</sub>-AEDT. Recordemos que

<sup>#</sup> $\alpha$  es la fracción de cargas de los iones surfactante del agregado no neutralizadas por los contraiones.



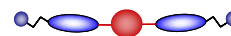
en las sales biliares de partida, NaDC y NaC, es el efecto entrópico el predominante, pero ocurre que el entálpico se hace más favorable al aumentar la temperatura, lo que sugiere una cierta importancia de las interacciones tipo London. Los valores entrópicos más negativos para los nuevos dímeros pueden entenderse como un grado de organización mayor al de las sales biliares monoméricas o que la movilidad molecular de estas micelas es inferior a la de las micelas de colato y desoxicolato.

La diferencia que existe entre los valores de la entalpía del proceso de micelización para los dímeros y para las sales biliares convencionales, puede ser una consecuencia de la sustitución de las interacciones de los segmentos esteroideos hidrófobos/disolvente por interacciones esteroide/esteroide y disolvente/disolvente, es decir, es energéticamente más favorable el paso del dímero en disolución a una pseudo-fase micelar mantenida mediante interacciones hidrófobas en su interior e hidrófilas en el exterior del agregado.



**Figura VI.20.-** Variación de los parámetros termodinámicos con la temperatura para ambos dímeros: **(a)** *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y **(b)** *d-2C<sub>3</sub>-AEDT*.

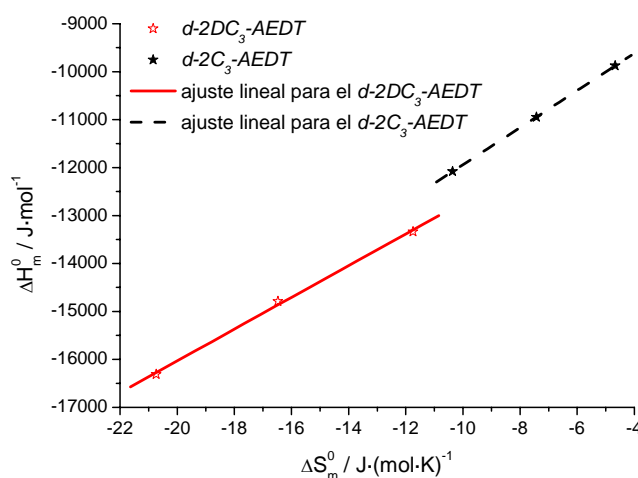
El factor entálpico es el que presenta una mayor contribución a la  $\Delta G_m^0$  en el proceso de micelización que conllevaría a un descenso de la estabilidad de las micelas al disminuir la temperatura. Pero es aquí donde interviene la compensación entálpico-entrópica,<sup>49</sup> es decir, la variación de  $\Delta H_m^0$  y  $\Delta S_m^0$  con la temperatura. Generalmente, para surfactantes iónicos, la variación de  $\Delta G_m^0$  con la temperatura es baja (véase la *figura VI.20*) de modo que el término  $T\Delta S_m^0$  compensa la



variación de  $\Delta H_m^0$  con la temperatura. Los dos dímeros aquí estudiados, como surfactantes iónicos que son, siguen este mismo comportamiento manteniendo un valor de  $\Delta G_m^0$  prácticamente constante a cada temperatura. Como podemos observar en la gráfica  $\Delta H_m^0$  vs  $\Delta S_m^0$  de la *figura VI.21* presentan una buena correlación lineal, que se puede ajustar a través de la ecuación empírica:

$$\Delta H_a^0 = \Delta H_a^* + T_c \Delta S_a^0 \quad [\text{VI.2}]$$

aquí  $\Delta H_m^*$  es el valor de entalpía (ordenada en el origen) que corresponde a una determinada temperatura,  $T_c$  (pendiente de la recta). Este último término se denomina temperatura de compensación y no tiene un significado físico claro, aunque se puede considerar como la media geométrica del intervalo de temperaturas para un determinado compuesto. Se ha encontrado empíricamente para varios surfactantes que el valor de  $T_c$  se encuentra en un intervalo de temperaturas entre 273K y 343K.<sup>50</sup>



**Figura VI.21.-** Gráfica de compensación entálpico-entrópica para los dímeros *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* en agua.

Del ajuste lineal de los datos experimentales de la gráfica de la *figura VI.21* obtenemos los valores de  $T_c$  de 331K (58°C) y de 387K (114°C) para el



*d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT y *d*-2C<sub>3</sub>-AEDT, respectivamente. Mientras el primero está dentro del intervalo de temperaturas experimental observado, el segundo no, y además los valores son considerablemente mayores que los obtenidos para las sales biliares clásicas. Los valores entálpicos son de  $\Delta H_m^* = -9,42 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  para el *d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT y de  $\Delta H_m^* = -8,07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  para el *d*-2C<sub>3</sub>-AEDT, inferiores a los de las sales biliares de partida (véase la *figura V.55* del *capítulo V*).

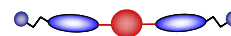
### ***Caracterización estructural de los agregados en disolución de los dímeros d-2DC<sub>3</sub>-AEDT y d-2C<sub>3</sub>-AEDT por medidas de Light Scattering***

Para estos dos nuevos dímeros, se han realizado medidas de *Light Scattering* en modo estático (SLS) y dinámico (DLS) con el fin de analizar el tamaño de los agregados a que dan lugar en disolución acuosa. Del mismo modo que para las sales biliares naturales, se asume que la disolución es isótropa y que las dimensiones de los agregados hacen que el factor de luz dispersada sea  $S(q)=1$ .

El método de preparación de cada muestra ha sido el seguido en el *capítulo III*. Se prepararon varias muestras de diferente concentración de los dos dímeros a fuerza iónica constante, y variando la fuerza iónica con cloruro sódico. Posteriormente cada una de las muestras fue filtrada y medida en el menor tiempo posible desde su preparación. Cada una de las muestras fue filtrada con filtros de  $\varnothing_{\text{poro}}=100 \text{ nm}$  para evitar la presencia de partículas no deseadas, como por ejemplo polvo, que conducirían a un resultado erróneo. Las muestras se siguieron con el tiempo, obteniéndose resultados idénticos. En las *tablas VI.5* y *VI.6* se resumen los resultados experimentales obtenidos a partir de las medidas de *Light Scattering* en modo dinámico y estático para los nuevos dímeros.

Para el dímero del desoxicolato, *d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT, a fuerza iónica constante, la relación  $I_{90}$  disminuye proporcionalmente a medida que las muestras se diluyen mientras que el tamaño hidrodinámico del agregado en disolución no varía sustancialmente (véase la *tabla VI.5*).

A partir del valor de *cmc* del *d*-2DC<sub>3</sub>-AEDT, 6,74 mM, se puede calcular la concentración de monómeros en disolución que nos permitirá a su vez determinar la masa molecular aparente, así como el número de agregación. A medida que la concentración de tensioactivo disminuye, la masa aparente y el número de agregación aumentan a las fuerzas iónicas de trabajo, aumento que en este caso no afecta al tamaño. Se asume que la *cmc* no cambia de manera significativa con la fuerza iónica. Tal y como se indica en la *tabla VI.5*, el  $Dh_{90}$  sufre un ligero



aumento con la fuerza iónica y apenas varía con la concentración del surfactante. Este aumento que se observa en la tabla podría ser ficticio y deberse a las interacciones intermicelares, como ya se explicó en el capítulo III. El diámetro hidrodinámico se encuentra en un intervalo comprendido entre 2,7-3,7 nm que nos indica la formación de agregados micelares típicos de sales biliares con un número de agregación que oscila entre 3 y 7 unidades de dímero.

**Tabla VI.5.-** Resultados experimentales de las medidas QELS y SLS realizadas para el *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* a 25°C y diferente fuerza iónica. <sup>a</sup>NaCl; <sup>b</sup>Dh<sub>90</sub>=diámetro hidrodinámico medido a  $\theta=90^\circ$ ; <sup>c</sup> $\sigma$ =polidispersidad; <sup>d</sup>I<sub>90</sub>= $I \cdot \text{Sen}(\theta=90^\circ)_{\text{muestra}} / I \cdot \text{Sen}(\theta=90^\circ)_{\text{decalina}}$ ; <sup>e</sup>M<sub>ap</sub>= $\Delta R / KC_{MA}$  ( $\Delta R = [(I_{90, \text{muestra}} - I_{90, \text{tampón}}) / c] / I_{90, \text{tolueno}} \cdot R_{\text{tolueno}}$ ;  $K = [(4\pi^2 n_0^2) / (N_A \lambda^4)] \cdot (dn/dc)^2$ ,  $C_{MA} = C_T - cmc$ ), <sup>f</sup>n=M<sub>ap</sub>/PM (n=número de agregación).

C/ mM	<sup>a</sup> F.I./ mM	<sup>b</sup> Dh <sub>90</sub> / nm	<sup>c</sup> $\sigma$	<sup>d</sup> I <sub>90</sub>	<sup>e</sup> M <sub>ap</sub> / g·mol <sup>-1</sup>	<sup>f</sup> n
28,4	200	2,7	0,33	5,51	3582	3,2
30,6	600	3,2	0,30	8,36	6684	5,9
30,8	1000	3,5	0,19	10,89	8770	7,8
106,1	1000	3,7	0,16	22,29	4450	4,0
78,32	1000	3,6	0,19	19,78	5464	4,8
55,77	1000	3,5	0,17	17,92	7206	6,4
40,48	1000	3,5	0,15	13,60	7889	7,0
29,72	1000	3,5	0,18	10,92	9202	8,2
105,0	600	3,0	0,14	13,80	2747	2,4
65,3	600	3,1	0,20	11,70	3885	3,4
47,7	600	3,0	0,22	9,50	4464	4,0
31,0	600	3,0	0,22	6,84	5303	4,7

En la *tabla VI.6* se pueden observar los datos obtenidos para el caso del dímero del colato, *d-2C<sub>3</sub>-AEDT*. El comportamiento es similar al del derivado del

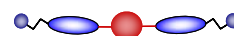


desoxicolato, tanto si se varía la fuerza iónica como la concentración. El tamaño de los agregados de ambos dímeros es prácticamente igual.

**Tabla VI.6.-** Resultados experimentales de las medidas QELS y SLS realizadas para el *d*-2C<sub>3</sub>-AEDT a 25°C y diferente fuerza iónica. <sup>(a-b-c-d-e-f)</sup>Véanse notas en la *tabla VI.5.*

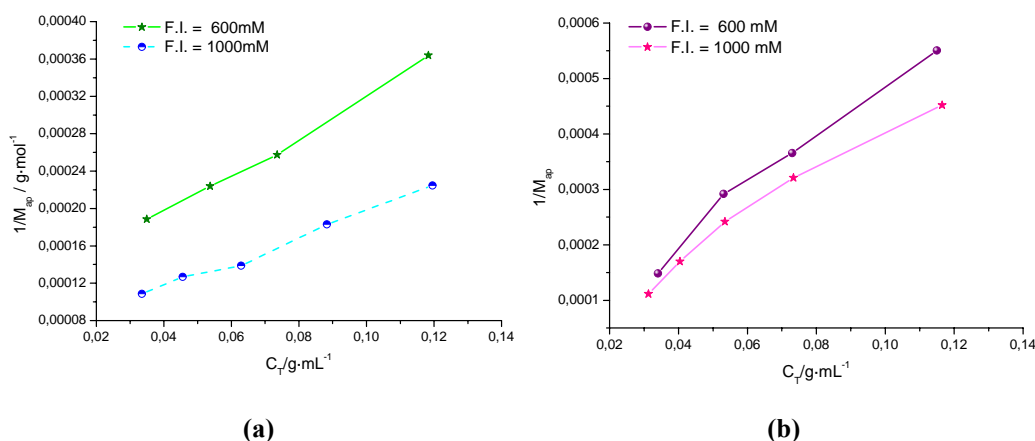
C/ mM	<sup>a</sup> F.I./ mM	<sup>b</sup> Dh <sub>90</sub> / nm	<sup>c</sup> σ	<sup>d</sup> I <sub>90</sub>	<sup>e</sup> M <sub>ap</sub> / g·mol <sup>-1</sup>	<sup>f</sup> n
52,9	300	3,2	0,29	5,02	2679	2,3
52,5	1000	3,5	0,18	7,11	3969	3,4
52,4	2000	3,9	0,16	12,31	7110	6,1
99,2	600	3,0	0,31	7,83	1817	1,6
63,0	600	3,0	0,22	6,51	2736	2,4
45,8	600	3,0	0,26	5,05	3426	3,0
29,3	600	3,1	0,25	3,81	6732	5,8
100,5	1000			9,57	2213	1,9
63,3	1000			7,40	3116	2,7
46,1	1000			6,06	4136	3,6
34,8	1000			5,04	5883	5,1
27,0	1000			3,84	8983	7,8

Este tipo de comportamiento es el típico para las micelas de sales biliares clásicas,<sup>51</sup> como en el caso del desoxicolato sódico que, por encima de un valor comprendido entre 24 y 48 mM, donde las micelas adquieren un mayor tamaño, el segundo y órdenes mayores del coeficiente del virial empiezan a ser notables. Asumiendo la formación de micelas como un modelo paso a paso en el que el número de agregación crece en función de la concentración, este aumento puede ser debido a dos efectos: las interacciones intermicelares y, un cambio en el tamaño micelar real. A la vista de los resultados obtenidos, el segundo efecto no tiene lugar en nuestro caso, siendo las interacciones intermicelares las que contribuyen al



“falso” aumento en el número de agregación. En la *figura VI.22* se representan los gráficos  $1/M_{ap}$  vs  $C_T$  de tensioactivo a diferentes fuerzas iónicas.

El cálculo del diámetro hidrodinámico se hace a través del coeficiente de difusión asumiendo el modelo de movimiento browniano. Aquí entran en juego el propio tamaño micelar y las interacciones entre partículas. En las disoluciones micelares, la polidispersidad puede complicar el análisis de estos coeficientes de difusión y, además, existen dos tipos de interacciones entre las partículas sometidas a movimiento browniano: interacciones hidrodinámicas transmitidas a través del disolvente, que dependen de la fricción de la disolución, y las interacciones directas de Debye-Hückel de largo alcance y al potencial de van der Waals. Para valores bajos de fuerza iónica el término que prevalece es el término repulsivo de Debye-Hückel ya que al aumentar la concentración de electrolito se apantalla cada vez más.<sup>52</sup>

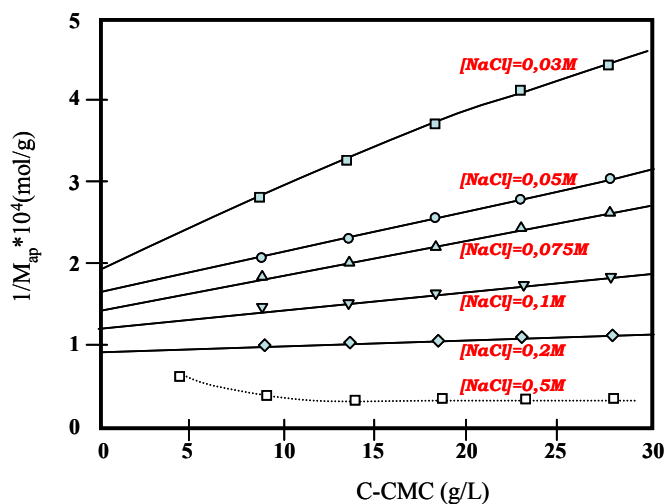


**Figura VI.22.-** Dependencia del inverso del peso molecular aparente (determinado por difusión de luz estática) con la concentración de **(a)** *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* y **(b)** *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* a diferentes concentraciones de NaCl y a 25,0±0,2°C.

En ambos casos la presencia de una mayor concentración de electrolito provoca un cambio en la pendiente. Esto no excluye la posibilidad de un crecimiento micelar con la concentración, sino sólo una disminución del mismo.



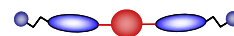
Esto es lo mismo que se obtiene para las sales biliares naturales, véase la figura VI.23.



**Figura VI.23.-** Inversa de la masa molecular aparente de las micelas de NaGDC en disolución acuosa a diferentes fuerzas iónicas a 25°C. Las líneas sólidas representan un ajuste simple de segundo orden. La línea de puntos es una simple conexión de guía visual.<sup>52</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

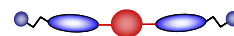
1. McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 809-11.
2. Li, Y.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 283-304.
3. Hsieh, H.-P.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12077-8.
4. Muller, J. G.; Ng, M. M.; Burrows, C. J. *J. Mol. Recognit.* **1996**, 9, 143-8.
5. Gouin, S.; Zhu, X. X. *Langmuir* **1998**, 14, 4025-9.
6. Gouin, S.; Zhu, X. X. *Steroids* **1996**, 61, 664-9.
7. Salunke, D. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Bhat, M. K.; Nahar, P. B.; Deshpande,



- M. V. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6.
8. Joachimiak, R.; Paryzek, Z. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2004**, *49*, 127-32.
  9. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640-7.
  10. Shawaphun, S.; Janout, V.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5860-4.
  11. Otto, S.; Janout, V.; DiGiorgio, A. F.; Young, M. C.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1200-4.
  12. Janout, V.; Jing, B.; Regen, S. L. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 351-6.
  13. D'Souza, L. J.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9494-502.
  14. Potluri, V. K.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7764-9.
  15. Maitra, U.; Rao, P.; Vijay Kumar, P.; Balasubramanian, R.; Mathew, L. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3255-8.
  16. Rao, P.; Maitra, U. *Supramol. Chem.* **1998**, *9*, 325-8.
  17. Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Lorusso, V.; Lux, G.; Morisetti, A.; Morosini, P.; Serleti, M.; Uggeri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3629-41.
  18. Holzinger, F.; Schteingart, C. D.; Ton-Nu, H.-T.; Eming, S. A.; Monte, M. J.; Hagey, L. R.; Hofmann, A. F. *Hepatology* **1997**, *26*, 1263-71.
  19. Pandey, P. S.; Rai, R.; Singh, R. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 918-23.
  20. Bhattarai, K. M.; Davis, A. P.; Perry, J. J.; Walter, C. J.; Menzer, S.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8463-73.
  21. Tamminen, J.; Kolehmainen, E. *Molecules* **2001**, *6*, 21-46.
  22. Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2979-96.
  23. Pandey, P. S.; Singh, R. B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5045-6.
  24. Kikuchi, J.-I.; Murakami, Y. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *32*, 209-21.
  25. Kikuchi, J.-I.; Inada, M.; Murakami, Y.; Egami, K.; Suehiro, K. *J. Org. Chem.* **1997**, *10*, 351-7.
  26. Boon, J. M.; Smith, B. D. *Current Opinion Chem. Biol.* **2002**, *6*, 749-56.



27. Kobuke, Y.; Nagatani, T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5094-101.
28. Yoshii, M.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2619-23.
29. Maitra, U.; Nath, S. *Arkivoc* **2005**, 133-43.
30. Nath, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3239-42.
31. Enhsen, A.; Glombik, H.; Kramer, W.; Wess, G. *Eur. Pat. Appl. EP 573848 A2*, **1993**.
32. Balasubramanian, R.; Rao, P.; Maitra, U. *Chem. Commun.* **1999**, 2353-4.
33. Ghosh, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 399-402.
34. Ropponen, J.; Tamminen, J.; Lahtinen, M.; Linnanto, J.; Rissanen, K.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 73-84.
35. Vinogradov, S. A. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1761-4.
36. Soto Tellini, V. H. *Tesis Doctoral*, **2006**.
37. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 9-15.
38. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10186-91.
39. Simonovic, B. R.; Momirovic, M. *Mikrochim. Acta* **1997**, *127*, 101-4.
40. Carey, M. C. *Bile Acids in Gastroenterology*. L. Barbara, R. H. Dowling, A. F. Hofmann, E. Roda. Lancaster. MTP Press Limited **1983**, 19-56.
41. Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, *12*, 2186-9.
42. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolivar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116-22.
43. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*, 1789-93.
44. Shinoda, K.; Hutchinson, E. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 577-82.
45. Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *246*, 182-90.
46. Paula, S.; Sues, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 11742-51.



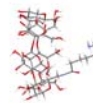
47. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5267-75.
48. Wettig, S. D.; Nowak, P.; Verrall, R. E. *Langmuir* **2002**, *18*, 5354-9.
49. Cornish-Bowden, A. *J. Biosci.* **2002**, *27*, 121-6.
50. Chen, L.-J.; Lin, S.-Y.; Huang, C.-C. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4350-6.
51. Corti, M.; Degiorgio, V. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 711-7.
52. Janich, M.; Lange, J.; Graener, H.; Neubert, R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 5957-62.



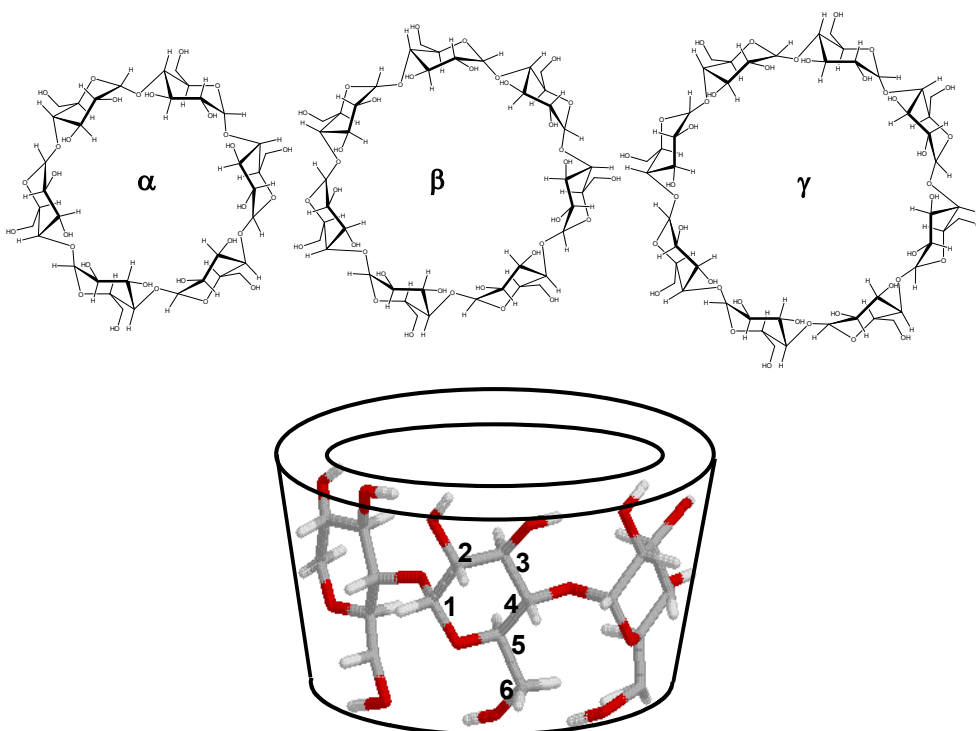
*CAPÍTULO VII.- ESTUDIO DEL ISOMERISMO “IN-OUT”  
DE UN DERIVADO DE  $\beta$ -CICLODEXTRINA*

---



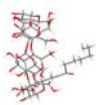


Las ciclodextrinas<sup>1</sup> son oligómeros cíclicos, de forma troncocónica, formadas por 6, 7 u 8 unidades de glucopiranosas unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1-4), conocidas respectivamente por  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -CD (*figura VII.1*).

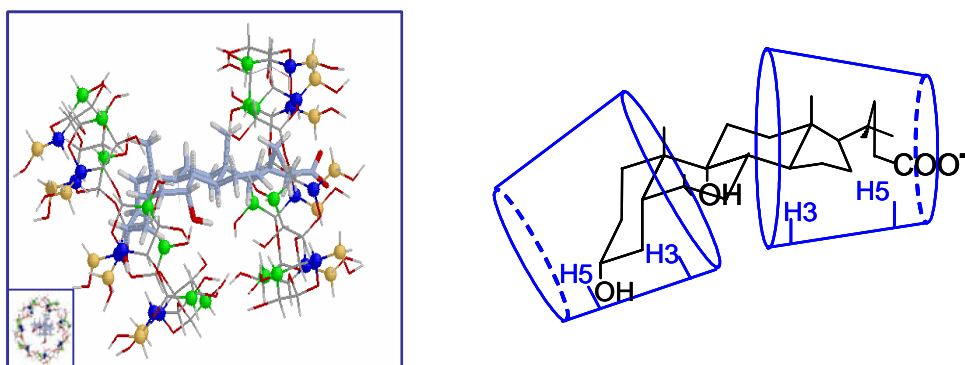


**Figura VII.1.-** Representación de las tres ciclodextrinas naturales  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD. En la imagen inferior se muestra la estructura tridimensional de la  $\beta$ -CD.

Una de sus propiedades fundamentales es que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas (*figura VII.2*). La formación de estos complejos genera un nuevo sistema en el que se produce una modificación sustancial de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas huésped que, sin embargo, no sufren cambios estructurales de importancia, solamente pequeños cambios conformacionales. Así, por ejemplo, muchas especies insolubles en agua, pueden ser solubilizadas si, previamente, forman un complejo

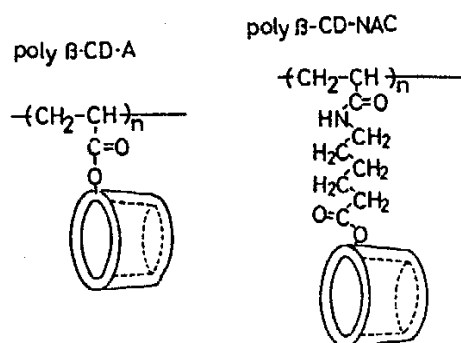
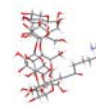


de inclusión con las ciclodextrinas. Por el contrario, es posible que una especie soluble pueda precipitar de una disolución acuosa al generar un complejo. Algunos de estos cambios, se han estudiado a fondo y han permitido dar a las ciclodextrinas aplicaciones industriales en campos diversos tales como tecnología de alimentos, tecnología farmacéutica o catálisis química, en los que se han empleado como estabilizadores, enmascarantes, agentes protectores, agentes de transferencia de fase, entre otras aplicaciones.

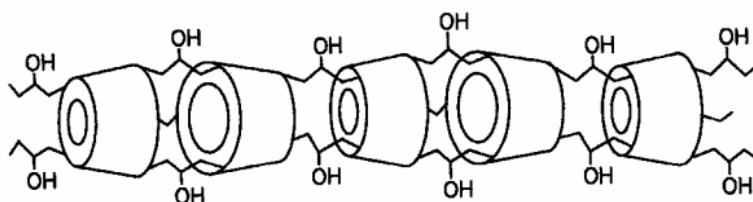


**Figura VII.2.-** Representación esquemática del complejo formado por la  $\beta$ -CD con desoxicolato sódico.<sup>2</sup>

Con la finalidad de potenciar esta capacidad de complejar sustratos y de encontrar nuevas aplicaciones de las ciclodextrinas, se ha sintetizado una enorme variedad de polímeros en los que, por ejemplo, las ciclodextrinas están enlazadas covalentemente a una cadena utilizando moléculas pequeñas como puentes de unión entre la ciclodextrina y la cadena polimérica. Dos ejemplos de polímeros sintéticos son el poliacriloil- $\alpha$ -ciclodextrina y el poli-N-acriloil-6-aminocaproil- $\alpha$ -ciclodextrina (*figura VII.3*).<sup>3</sup> A algún tipo de polímeros de esta naturaleza, se les ha dado un uso farmacológico debido a que son solubles en agua y a que aumentan la biodisponibilidad de productos farmacéuticos. También existen polímeros que implican exclusivamente anillos de ciclodextrina originando nanotubos (*figura VII.4*).<sup>4</sup>



**Figura VII.3.-** Polímeros portando residuos de  $\alpha$ -CD: (izquierda) poliacrililoil  $\alpha$ -CD; (derecha) poli-N-acrililoil-6-aminocaproil  $\alpha$ -CD.<sup>3</sup>

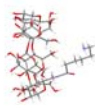


**Figura VII.4.-** Nanotubos de ciclodextrina.<sup>4-6</sup>

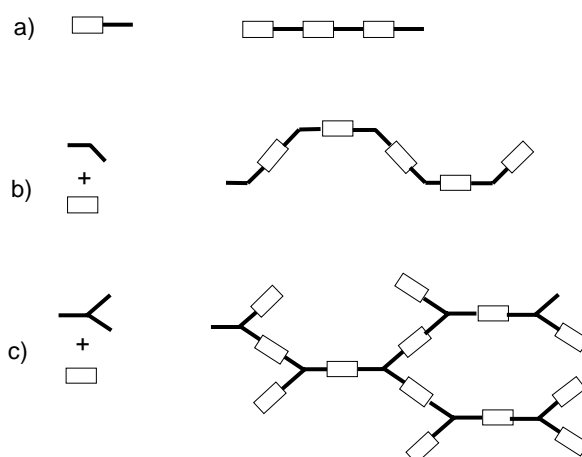
La capacidad de formar complejos de inclusión, permite a las ciclodextrinas generar otra clase de polímeros, los de tipo supramolecular o de inclusión, que poseen estructuras como las presentadas en la *figura VII.5*. En este tipo de polímeros las unidades que se repiten no se enlazan covalentemente entre sí sino que permanecen unidas gracias a la formación de complejos de inclusión. Los polímeros supramoleculares generados por ciclodextrinas pueden agruparse en cuatro clases:

i) Polímeros supramoleculares formados por unímeros entrelazables. En éstos el unímero que se replica porta simultáneamente el anfitrión (ciclodextrina) y el huésped, unidos por un puente de unión suficientemente corto como para evitar la autoinclusión (*figura VII.5.a*).

ii) Polímeros supramoleculares formados por dos tipos de monómeros. Como mínimo ambos monómeros han de tener naturaleza ditópica. Cuando ambos

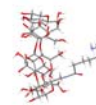


monómeros poseen solamente dos sitios capaces de interactuar, podrán resultar polímeros supramoleculares lineales (*figura VII.5.b*).<sup>2,7-24</sup> Sin embargo, cuando un huésped ditópico es complejado por un dímero de ciclodextrina puede surgir una interacción conocida como “quelato”, consistente en la formación de un complejo de estequiometría 1:1 entre ambos dímeros.<sup>25-29</sup> La situación anterior competirá con la formación del polímero supramolecular y ha de ser evitada. Las razones que definen la formación del quelato o el polímero supramolecular, no están muy claras, debido, probablemente, a la falta de medidas termodinámicas relacionadas con la generación de estructuras supramoleculares. Por otro lado, cuando al menos uno de los monómeros es tritópico, puede ser posible la generación de un polímero supramolecular ramificado de tipo dendrímero (*figura VII.5.c*).<sup>30</sup>



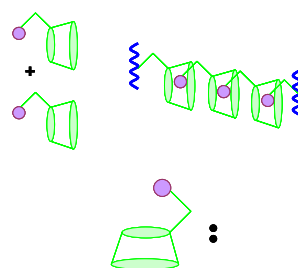
**Figura VII.5.-** (a) Polímero supramolecular lineal obtenido por ensamblaje de unímeros entrelazables; (b) Polímero de tipo lineal generado a partir de un receptor ditópico y un huésped también ditópico; (c) Polímero tipo Árbol de Cayley obtenido por ensamblaje entre un receptor ditópico y un huésped tritópico.

iii) También ha sido publicada la formación de estructuras supramoleculares a partir de huéspedes y anfitriones politópicos.<sup>31,32</sup> En algunos casos, se han observado valores de la viscosidad inusualmente altos cuando se generan macroestructuras entre polímeros con adamantano y polímeros con  $\beta$ -CD y también separación de fases.<sup>33</sup>

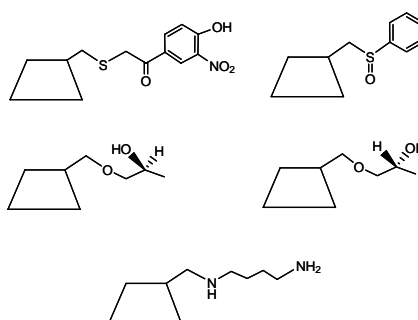


iv) Finalmente, pueden ser complejados polímeros covalentes con ciclodextrinas formando polirrotaxanos que también reciben el nombre de collares moleculares<sup>34</sup> y que están muy relacionados con los nanotubos de la *figura VII.4*.<sup>35</sup>

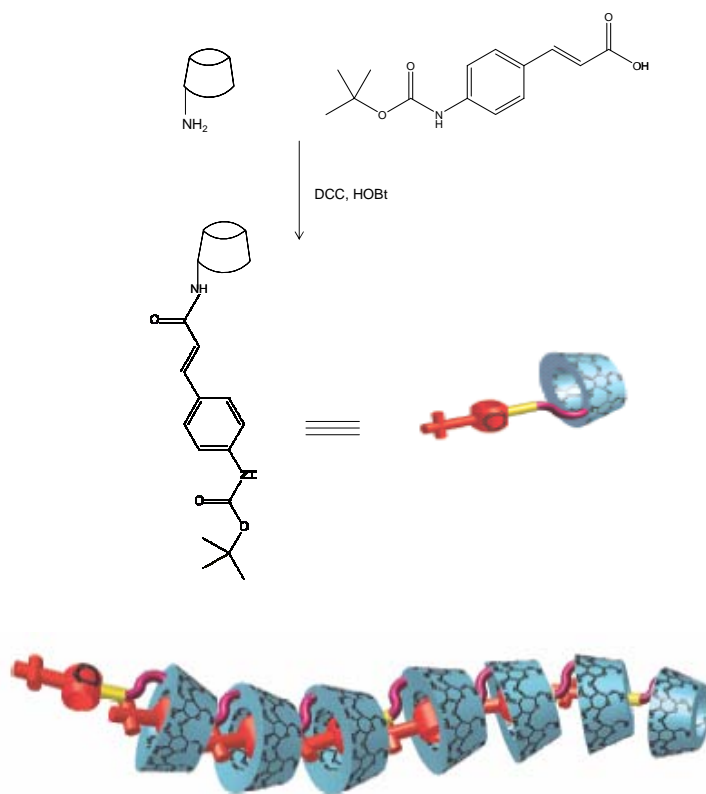
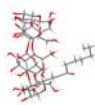
Los polímeros del tipo (i) han recibido, relativamente, poca atención. Se han descrito los cristales de algunas cadenas de este tipo, resumiendo en la *figura VII.6* algunos unímeros utilizados.<sup>36-39</sup> La generación de estas cadenas requiere de monómeros con grupos de tipo huésped con alta complementariedad con la ciclodextrina y con puentes cortos entre el anfitrión y el huésped con el fin de evitar la autoinclusión.



**Figura VII.6.-** Unímeros de ciclodextrina capaces de generar polímeros supramoleculares lineales.



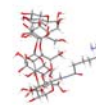
Harada *et al* han descrito otros ejemplos en los que se han empleado la  $\beta$ -CD y la  $\alpha$ -CD por la posiciones 3 y 6 y diversas técnicas para determinar la formación del polímero. Con el fin de generar polímeros supramoleculares y evitar la formación de estructuras de autoinclusión, estos autores diseñaron un derivado de  $\alpha$ -CD sustituido en la posición 3 con un grupo *tert*-BOC-cinamoil. A partir de medidas de RMN, dicroísmo circular y STM, propusieron que el agregado poseía una forma helicoidal y, por medidas de VPO y turbo ion spray TOF masas, que el grado de polimerización debía estar entre 15 y 20 mM (*figura VII.7*).<sup>21,23</sup>



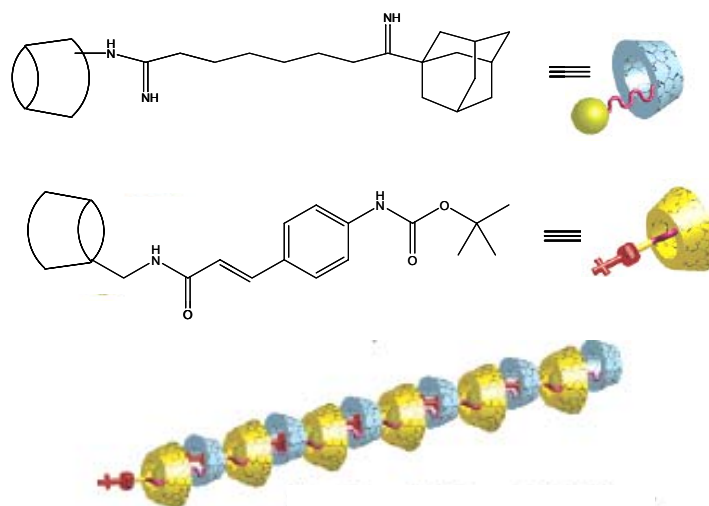
**Figura VII.7.-** Polímero supramolecular generado con un derivado aromático de  $\alpha$ -CD.<sup>21</sup>

Este mismo grupo de investigación preparó el derivado 3-(6-adamantanamidohexanocarboxi)- $\alpha$ -CD y el 6-(tert-BOC-cinamoil)- $\beta$ -CD. Dado que el adamantano no es complejado por la  $\alpha$ -CD, la especie supramolecular que se forma implica la inclusión del derivado de adamantano en la  $\beta$ -CD. La sección aromática del huésped, a su vez, se introduce en la cavidad de la  $\alpha$ -CD permitiendo que el polímero se caracterice por la alternancia de la  $\alpha$ -CD y la  $\beta$ -CD (*figura VII.8*).<sup>40</sup>

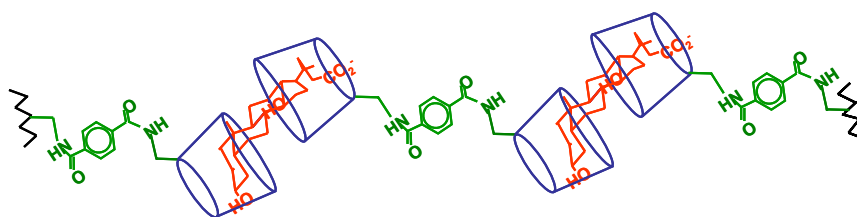
Recientemente, se han publicado una serie de polímeros lineales del tipo (ii). En primer lugar, debemos citar el trabajo pionero en el que se aportaron



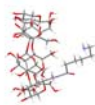
evidencias inequívocas de la formación de un polímero lineal entre el desoxicolato sódico (huésped ditópico) y un dímero de ciclodextrina (*figura VII.9*).<sup>2</sup> Este ha sido ampliado a diversos dímeros de ciclodextrina, habiendo analizado la influencia de factores estéricos y electrostáticos sobre la formación de este tipo de polímeros.<sup>10</sup> En estos ejemplos, la molécula huésped utilizada no muestra una ditopocidad asimétrica muy acusada, por lo que es de esperar que la utilización de moléculas huésped ditópicas más adecuadas, permita la obtención de polímeros supramoleculares más rígidos, estables, etc.<sup>23</sup>



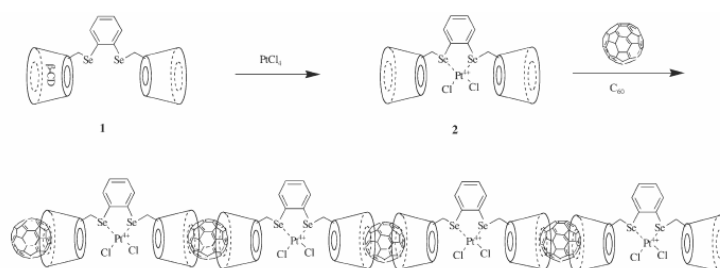
**Figura VII.8.-** Polímero supramolecular generado con derivados de  $\alpha$  y  $\beta$ -CD.<sup>40</sup>



**Figura VII.9.-** Primer polímero supramolecular lineal publicado por Parrilla *et al.*<sup>2</sup>

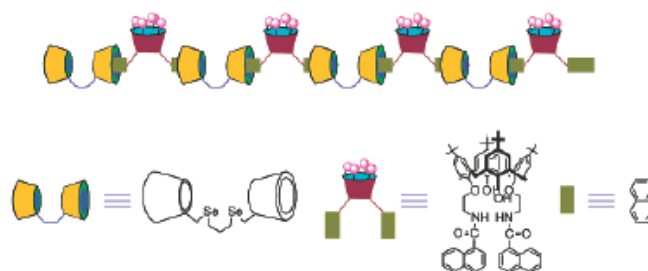


Liu *et al*<sup>17</sup> han preparado un polímero supramolecular que puede ser considerado del mismo género que el anterior. En este caso el huésped ditópico es un fullereno (*figura VII.10*). La estructura es de interés en aplicaciones biológicas y químicas pues posee una moderada solubilidad en agua y un efecto de ruptura del ADN bajo la irradiación de luz. El complejo fue generado en una mezcla de tolueno/DMF v/v = 4:6 con un rendimiento del 4% y caracterizado por RMN, TEM, y STM.

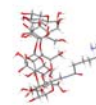


**Figura VII.10.-** Polímero supramolecular formado por un dímero de ciclodextrina con un centro metálico y un fullereno.<sup>17</sup>

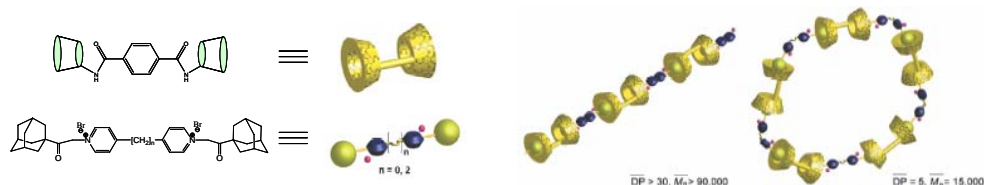
Otro de los derivados obtenidos por Liu *et al*<sup>11</sup> se ilustra en la *figura VII.11*. En este trabajo, son de destacar las imágenes SEM que rubricaron los datos obtenidos con otras técnicas. Efectivamente, se observa que la morfología de las superficies obtenidas para el dímero de ciclodextrina y el huésped es irregular, mientras que el polímero muestra una superficie regular consistente en macropilares cuadrados. Las medidas de TEM sirvieron para determinar la forma lineal y el tamaño del polímero que se estimó entre 400 y 900 nm.



**Figura VII.11.-** Polímero supramolecular obtenido a partir de un dímero de ciclodextrina con un centro de selenio y un dímero huésped basado en un calixareno.<sup>11</sup>



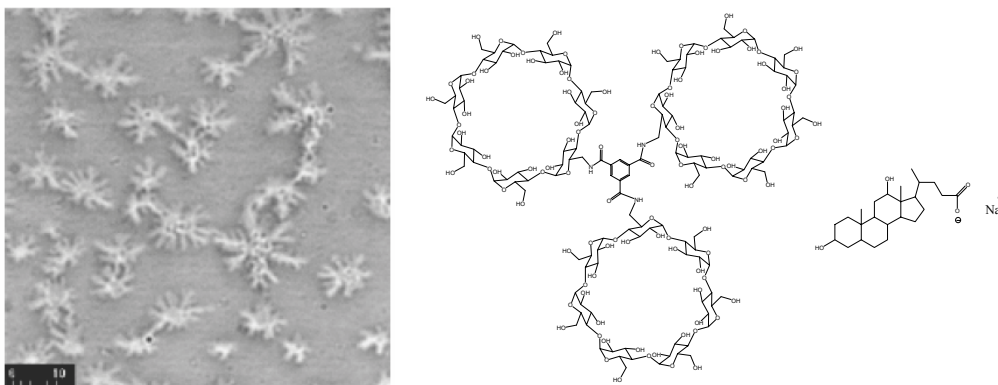
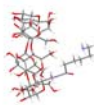
Muy recientemente, Harada *et al*<sup>41</sup> han preparado dos polímeros de carácter lineal con dímeros de ciclodextrina y dímeros de adamantano flexibles y rígidos. En la *figura VII.12* se pueden ver los dos primeros ejemplos, en los que se emplea inicialmente un dímero de ciclodextrina rígido y dos sondas, una flexible con la que se produce una estructura supramolecular cíclica, y otra rígida, que produce una especie lineal similar a las de Liu *et al*. Tanto las estructuras de los compuestos como las de los polímeros fueron caracterizadas por RMN. Las masas de los polímeros se obtuvieron por osmometría de presión de vapor.



**Figura VII.12.-** Polímero supramolecular obtenido muy recientemente por Harada *et al*<sup>41</sup> a partir de un dímero de ciclodextrina con puente rígido y dos dímeros de adamantano.

Estos mismos autores,<sup>24</sup> al utilizar polietilenglicol como puente en los huéspedes ditópicos (de adamantano) y dímeros de ciclodextrina observaron una estructura supramolecular menos soluble en agua que los casos anteriores. El ensamblaje fue caracterizado mediante osmometría de presión de vapor y especialmente por RMN, técnica por la cual obtuvieron la constante cinética del proceso de complejación y los coeficientes de difusión de las especies.

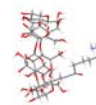
En contraste con las descripciones anteriores referidas a polímeros supramoleculares lineales, no hemos encontrado más que dos publicaciones, nacidas en nuestro grupo de investigación,<sup>30,42</sup> que hagan referencia a la formación de estructuras ramificadas del tipo Árbol de Cayley. Como ya hemos mencionado, la estructura dendrímica se produjo al complejar desoxicolato sódico<sup>30</sup> o un dímero de adamantano<sup>42</sup> con un trímero derivado de  $\beta$ -CD (*figura VII.13*). Las imágenes SEM muestran una morfología acorde con la disposición dendrítica de la superestructura.



**Figura VII.13.-** Polímero supramolecular de tipo Árbol de Cayley.<sup>30</sup>

La mayoría de complejos de ciclodextrina obedecen a condiciones de intercambio rápido dentro de la escala de tiempos de RMN. Bajo estas circunstancias, las señales químicas que se observan son un promedio de las señales químicas en ambos estados, libre y complejo, permitiendo la determinación de las constantes de equilibrio en la formación del complejo si se varía la relación de concentración anfitrión/huésped.<sup>43,44</sup> Sin embargo, cuando el fenómeno de la complejación tiene una velocidad de intercambio lenta comparada con la escala de tiempos RMN, las señales del anfitrión y del huésped libres y en el complejo aparecen a diferentes desplazamientos químicos. Hasta el momento se conocen muy pocos complejos intermoleculares de ciclodextrina que obedecen a una situación de intercambio lento.<sup>45,46</sup>

Para estudiar este fenómeno, se modificó la  $\beta$ -CD insertándole una cadena flexible de 6 carbonos y un grupo amina en el extremo en la posición 6.<sup>47</sup> La colocación de esta cadena puede conducir a dos procesos de inclusión diferentes: *a*) si las interacciones intermoleculares son las dominantes, la ciclodextrina modificada puede formar entidades supramoleculares dirigiendo a la formación de un polímero supramolecular;<sup>19,22-27,30-39,48,49</sup> *b*) mientras que si las interacciones intramoleculares son las que predominan, la autoinclusión de la cadena hidrófoba hacia el interior de la cavidad de la ciclodextrina origina un complejo de inclusión intramolecular. Este fenómeno se conoce como isomerismo “in-out”.<sup>50</sup> Este tipo de complejos tienen importantes aplicaciones ya que si el grupo en el extremo de la cadena es un fluoróforo, podrían usarse como sensores químicos.<sup>51,52</sup> Ambos



fenómenos, inter/intra, compiten entre sí, y uno de ellos prácticamente no tendrá lugar si el otro se ve favorecido.

El intercambio lento es ideal para la determinación del equilibrio intramolecular entre los dos conformeros puesto que las señales químicas (y otros parámetros RMN) de los núcleos en ambos estados, libre y complejoado, se determinan individualmente en el mismo espectro RMN.<sup>53,54</sup>

En disolución acuosa, el equilibrio entre los dos conformeros es un compromiso entre las interacciones del grupo unido a la cadena lateral con el ambiente hidrófobo que existe en el interior de la cavidad de la ciclodextrina y el ambiente hidrófilo que existe fuera. En consecuencia, una modificación fuerte de la polaridad del grupo de esta cadena tendría un elevado efecto en el isomerismo “in-out”, incluso pudiendo eliminarlo. Para estudiar esta hipótesis, se sintetizó y purificó el 6-(6-aminohexanamido)-6-desoxi- $\beta$ -CD (de aquí en adelante lo nombraremos como *P5*). Se ha elegido este derivado debido a que su naturaleza hidrofóbica/hidrófila se puede modificar fácilmente mediante cambios en el pH de la disolución. De modo que, las especies de amina no protonadas, menos hidrófilas, podrían residir en el interior de la cavidad de la ciclodextrina, mientras que si se encuentran protonadas tenderán hacia su exterior por encontrarse en un medio más polar. Esto es, un simple sistema dentro-fuera en el que su posición depende del pH y puede ser muy útil para la comprensión y diseño de otros complejos moleculares.

El *P5* fue sintetizado siguiendo la ruta sintética que se muestra en la *figura VII.14* y fue puesta a punto por Carrazana y Gancedo<sup>47</sup> en el grupo de investigación donde se desarrolló el presente trabajo. Los procedimientos pueden verse en la memoria del proyecto “Fin de Carrera de Gancedo”.

En el estudio de asociación intramolecular del *P5* por RMN, es importante tener en cuenta que el grupo amino de la  $\beta$ -CD sustituida en posición 6 estará cargado positivamente a pH ácido y en forma neutra a pH básico. Por ello se estudiaron los espectros de RMN de esta especie a una concentración de 10 mM y a dos valores de pH: 5,93 y 11,10. Las disoluciones fueron preparadas en tampón deuterado de fosfato y de carbonato a una fuerza iónica 0,2 M y se resolvieron los espectros monodimensionales,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y bidimensionales,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

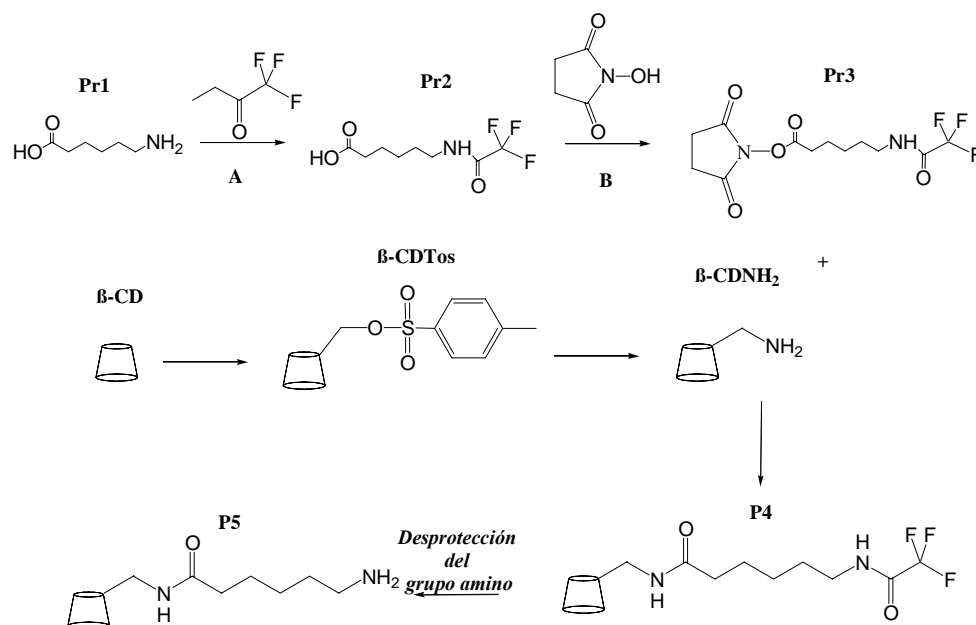
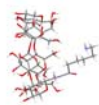
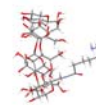


Figura VII.14.- Etapas de la ruta sintética del P5.

### Espectro mono y bidimensional de $^1\text{H}$ a pH 5,93

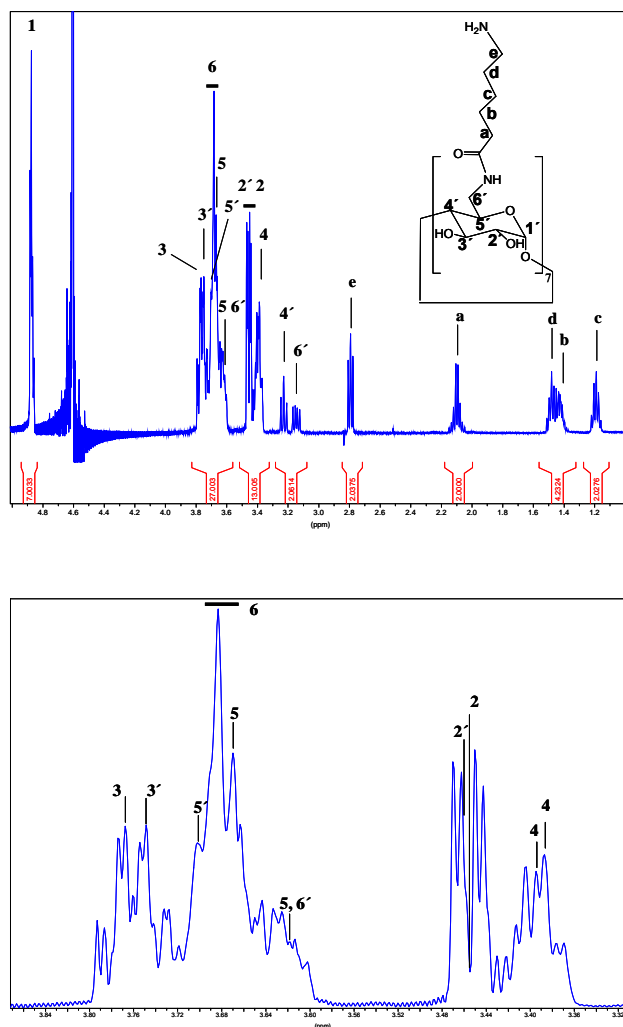
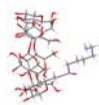
La asignación se hizo a partir del experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY a pH 5,93 (figuras VII.15 y VII.16), en el que se parte de la señal H-a, que aparece claramente separada de las demás señales a un desplazamiento similar al teórico, 2,09 ppm. La única interacción que muestra es una señal cruzada a un desplazamiento de 1,41 ppm con los protones H-b. La existencia de una señal cruzada única indica que tanto los dos protones situados en el carbono C-a como los del carbono C-b son equivalentes y aparecen al mismo desplazamiento químico. Si esto no fuera así, tendríamos que observar como mínimo tres señales (interacciones  $a1\text{-}a2$ ,  $a1\text{-}b1$  y  $a1\text{-}b2$ ), que en este caso no existen. Del mismo modo, los protones H-b interactúan con una única señal a  $\delta 1,20$  ppm correspondiendo a los dos protones equivalentes H-c, y éstos muestran otra señal única a un  $\delta 1,49$  ppm (protones equivalentes H-d), que correlacionan con los protones H-e a  $\delta 2,78$  ppm también



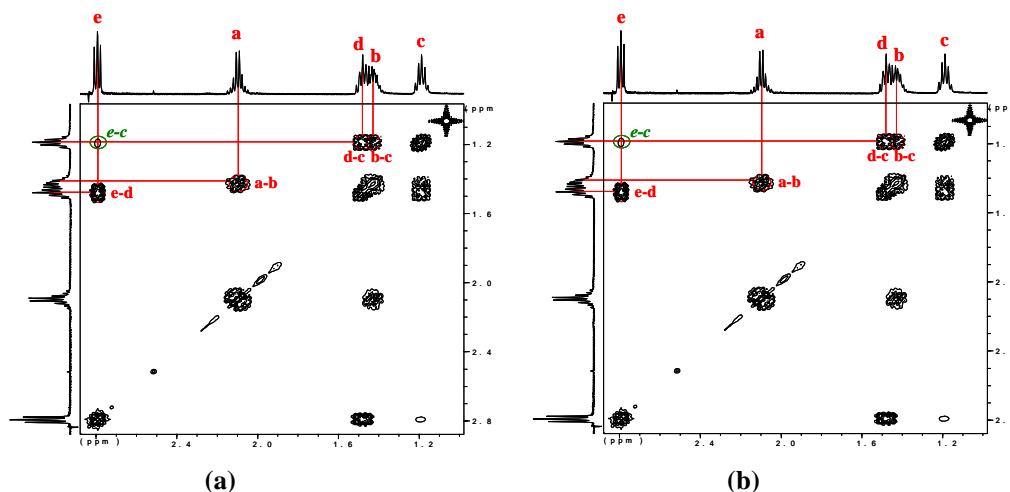
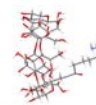
equivalentes entre sí. Cada una de estas señales integra por 2 confirmando la equivalencia de los protones situados en el mismo carbono.

Se realizó la asignación del fragmento de las glucosas correspondientes a la  $\beta$ -CD siguiendo un procedimiento semejante. En este caso el punto de partida son los protones H-1 y H-1' que aparecen a campos más bajos que el resto (la prima indica la unidad de glucosa sustituida). Como resultado de la resolución de los dos espectros de  $^1\text{H}$  mono y bidimensionales que se muestran en las *figuras VII.15* y *VII.16* se obtiene que:

- Los seis H-1 y el H-1' aparecen como un doblete a  $\delta 4,89$  ppm que integra por siete.
- Los seis H-2 y el H-2' aparecen como un doblete de dobletes a  $\delta 3,45$  ppm.
- Los seis H-3 aparecen a  $\delta 3,77$  y el H-3' a  $3,75$  ppm como un doblete de dobletes.
- La señal correspondiente a los seis protones H-4 aparece como un triplete a  $3,39$  ppm y la señal del H-4' aparece a campo más alto a  $3,25$  ppm.
- Los seis protones H-5 aparecen a dos desplazamientos diferentes,  $3,62$  y  $3,67$  ppm, mientras que el H-5' aparece a  $3,70$  ppm.
- Y por último, los doce protones H-6 aparecen como una señal ancha a  $3,69$  ppm, mientras que los dos H-6' aparecen a dos desplazamientos diferentes,  $3,16$  y  $3,62$  ppm.



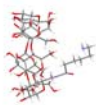
**Figura VII.15.-** Asignación detallada del espectro  $^1\text{H}$ -RMN para el P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 5,93, 750 MHz. (La prima indica los hidrógenos de la unidad de glucosa sustituida).



**Figura VII.16.-** (a) Espectro Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para el P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 5,93 de la unidad  $\beta$ -CD, 750 MHz; (b) espectro Cosy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para el P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 5,93 de la parte de la cadena lateral en la posición seis de la  $\beta$ -CD, 750 MHz.

### ***Espectro mono y bidimensional de $^1\text{H}$ a pH 11,10***

El espectro monodimensional de  $^1\text{H}$  a pH 11,10 (*figura VII.17*) se resuelve siguiendo el mismo patrón que a pH ácido. El punto de partida para las señales de la cadena lateral (*figura VII.17.b*) es de nuevo la señal de los protones H-a, que aparecen a un desplazamiento similar al teórico de 2,06-2,08 ppm. Esta señal se encuentra menos definida en el  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY que a pH 5,93, y si se observa detalladamente, se puede distinguir que realmente es el cómputo de dos señales ligeramente separadas en lugar de una única señal. Una explicación podría ser que la cadena adopta a este valor de pH una determinada conformación espacial en la que los dos protones H-a dejan de ser equivalentes. Si éste fuera el caso, se debería observar una señal cruzada entre las señales de los dos H-a ya que éstos son protones geminales, y esta señal no existe. Sin embargo, cada una de las dos interacciones exclusivas de cada H-a ( $\delta$ 2,06 y  $\delta$ 2,08 ppm) tiene una única interacción con un H-b ( $\delta$ 1,38 y  $\delta$ 1,39 ppm, respectivamente) (*figura VII.17*), no existiendo interacción entre estos dos H-b. A partir de cada H-b se llega a un H-c ( $\delta$ 1,12 y  $\delta$  1,14 ppm), y de cada H-c se llega a un H-d ( $\delta$ 1,28 y  $\delta$ 1,40 ppm), y



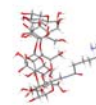
finalmente, de cada H-*d* se obtienen los dos H-*e* a  $\delta$ 2,83 y  $\delta$ 2,64 ppm respectivamente sin mostrar señales cruzadas entre los protones H-*c*, H-*d* y H-*e*.

Una situación idéntica se encuentra al resolver los protones de la parte de la  $\beta$ -CD (*figura VII.17.a*) obteniéndose los siguientes resultados:

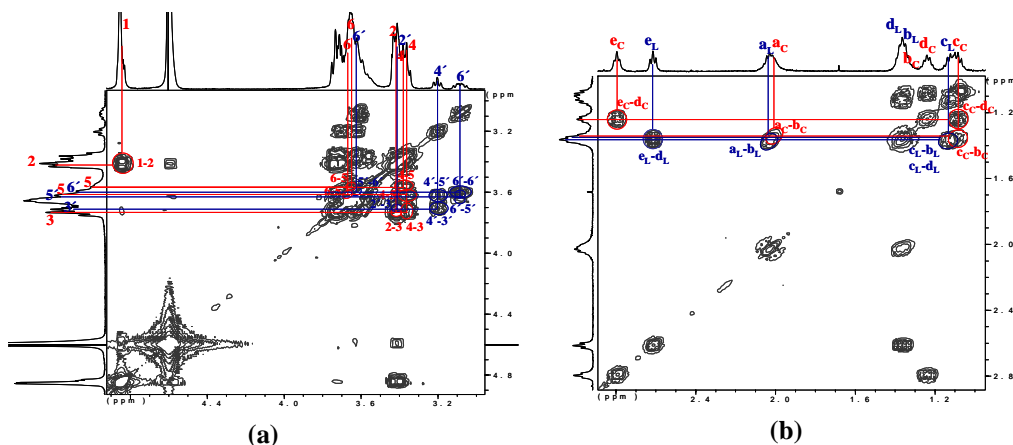
- $\delta$ 4,90 ppm aparece la señal correspondiente a los seis protones H-1 y el único protón H-1'.
- 3,46 y 3,45 ppm aparecen respectivamente las señales correspondientes a los seis H-2 y el único H-2'.
- Las dos señales que aparecen a  $\delta$ 3,77 y 3,75 ppm corresponden con los seis protones H-3 y el H-3'.
- Los seis protones H-4 salen a dos desplazamientos diferentes, 3,40 y 3,42 ppm, mientras que el único protón H-4' aparece como un triplete claro a  $\delta$ 3,24 ppm.
- De igual modo, los seis protones H-5 aparecen a dos desplazamientos diferentes, 3,59 y 3,66 ppm, el único protón H-5' aparece a 3,67 ppm.
- Y ya por último, los doce protones H-6 aparecen a 3,71 y 3,68 ppm, mientras que los dos protones H-6' aparecen como dos señales a diferentes ppm, 3,13 y 3,64.

En la *tabla VII.1* se pueden ver los desplazamientos químicos de protón del P5 a los dos pH 5,93 y a 11,10.

En resumen, los protones que a pH ácido se encuentran a un mismo desplazamiento aparecen a pH básico en dos señales a desplazamientos diferentes. Además, estos pares de protones no muestran una señal cruzada en el  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (se observa de una forma más clara en la cadena lateral y en el H-6' a  $\delta$ 3,13 ppm). Dicho fenómeno sólo se puede explicar si coexisten dos especies distintas en disolución con diferente entorno electrónico. Al comparar los dos espectros monodimensionales se pueden diferenciar las señales de la especie nueva



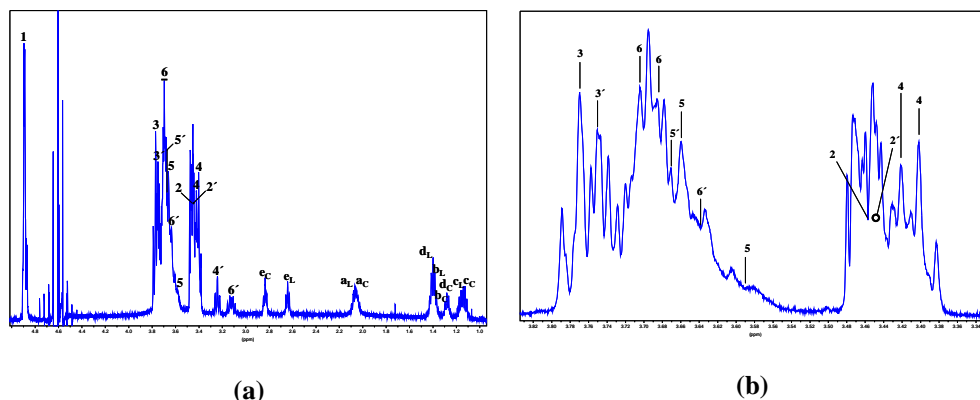
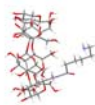
(subíndice C) de las señales correspondientes a la especie inicial (subíndice L), como se muestra en la figura VII.18.



**Figura VII.17.-** (a) Espectro Cosy  $^1\text{H}-^1\text{H}$  para el P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 11,1 de la parte de la  $\beta\text{-CD}$ , 750 MHz; (b) espectro Cosy  $^1\text{H}-^1\text{H}$  para el P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 11,1 de la parte de la cadena lateral en la posición seis de la  $\beta\text{-CD}$ , 750 MHz.

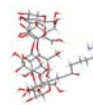
**Tabla VII.1.-** Desplazamientos químicos en ppm del P5 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 5,93 y 11,10, 750 MHz.

<b>P5 10 mM en <math>\text{D}_2\text{O}</math></b>							
$\delta_{\text{pH } 5,93} / \text{ppm}$			$\delta_{\text{pH } 11,10} / \text{ppm}$				
H-1	H-1'	4,89	H-1	H-1'	4,90		
H-2	H-2'	3,45	H-2	H-2'	3,46 3,45		
H-3	3,77	H-3'	3,75	H-3	3,77	H-3'	3,75
H-4	3,40-3,39	H-4'	3,25	H-4	3,40-3,42	H-4'	3,24
H-5	3,62-3,67	H-5'	3,70	H-5	3,66-3,59	H-5'	3,67
H-6	3,69	H-6'	3,16-3,62	H-6	3,71-3,68	H-6'	3,13-3,64
H-a		2,09	H-a <sub>L</sub>	2,08	H-a <sub>C</sub>	2,06	
H-b		1,41	H-b <sub>L</sub>	1,39	H-b <sub>C</sub>	1,38	
H-c		1,20	H-c <sub>L</sub>	1,14	H-c <sub>C</sub>	1,12	
H-d		1,49	H-d <sub>L</sub>	1,40	H-d <sub>C</sub>	1,28	
H-e		2,78	H-e <sub>L</sub>	2,64	H-e <sub>C</sub>	2,83	



**Figura VII.18.-** Asignación detallada del espectro  $^1\text{H}$ -RMN para el *P5* 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 11,1.

La existencia de dos especies en disolución se podría explicar, ya que en una disolución a pH ácido el grupo amino terminal de esta molécula se encuentra mayoritariamente en su forma monoprotonada ( $pK_{a1}=-1^{55-57}$  y  $pK_{a2}=10,53$  obtenido experimentalmente en este trabajo). De modo que, a pH=5,93, tenemos un  $3,3 \times 10^{-3}\%$  en forma neutra, prácticamente un 100,0% monoprotonada y un  $1,2 \times 10^{-5}\%$  diprotonada. Por otro lado, a pH 11,10 se encuentra mayoritariamente en forma neutra, aunque se puede encontrar una concentración apreciable de la forma monoprotonada (forma neutra 83%, monoprotonada 17%, diprotonada  $1,3 \times 10^{-11}\%$ ). Tendríamos por lo tanto a este valor de pH básico, dos especies en disolución en concentración apreciable. Teniendo en cuenta que el proceso de intercambio de un protón es muy rápido en comparación con los tiempos de medida de RMN, se traduciría en un desplazamiento de alguna señal en el espectro de  $^1\text{H}$ , nunca en la aparición de nuevas señales como consecuencia de un intercambio lento. Pueden existir otras especies diferentes en disolución si se tiene en cuenta que la cadena lateral de la molécula se puede incluir en el interior de la cavidad de la  $\beta$ -CD. Este proceso de autoasociación sí que podría dar lugar a un intercambio lento (cadena lateral dentro o fuera de la  $\beta$ -CD) que explicaría la aparición de las nuevas señales debidas a la especie complejada, ya sea intra- o intermolecularmente. La cavidad de la  $\beta$ -CD tiene carácter apolar, por ello, la cadena lateral de la molécula tiene mayor tendencia a incluirse cuando está en forma neutra (favorecida a un pH básico) que cuando está protonada (pH ácido).



## Capítulo VII

---

Teniendo en cuenta todos los datos expuestos, a pH ácido tendríamos únicamente una especie, la forma protonada, y por lo tanto la cadena estaría fuera de la cavidad. Mientras que a pH básico, se encontrarían dos especies en disolución: una donde la cadena neutra está incluida en la  $\beta$ -CD, y otra donde la cadena protonada está fuera de la misma. Para verificarlo se realizaron una serie de espectros  $^1\text{H}$ -RMN a pH intermedios entre 5,93 y 11,10. En la *figura VII.19* se pueden observar algunos de los espectros más representativos de esta serie. Se puede comprobar aquí que al aumentar el pH, entre 7,83 y 9,29, van apareciendo las nuevas señales manteniéndose todas ellas hasta pH 11,1, lo que indica que a medida que aumenta el valor de pH, las áreas de la molécula en el nuevo entorno (asociación intra- o intermolecular "C") van aumentando. Este aumento se produce en la misma proporción que la disminución de las áreas de las señales de la especie ya existente (molécula libre "L"). Se confirma así el intercambio lento debido a la inclusión de la cadena en la cavidad de la ciclodextrina. Llegado a este punto, se puede predecir que la constante de complejación de la cadena no tiene un valor elevado, porque cuando se tiene la especie en su mayor parte sin protonar (pH 11,1), se observa una proporción semejante de especie libre y complejada (integral de las señales desdobladas similar). El valor de esta constante se obtiene mediante un análisis cuantitativo de estas áreas.

La *figura VII.19* muestra además otro fenómeno que transcurre paralelamente: las señales correspondientes a la especie asociada aparecen siempre al mismo desplazamiento químico independientemente del valor de pH, sin embargo, las señales debidas a la especie libre se desplazan hacia campos más altos cuando el pH aumenta. Este desplazamiento se debe necesariamente a un cambio en el entorno electrónico a través de un proceso de intercambio rápido. Esta situación concuerda con el intercambio del protón del grupo amino terminal, y solamente debería ocurrir en la especie libre que se encuentra en contacto directo con el disolvente. La especie asociada no debería presentar contacto directo con el disolvente y, por lo tanto, sería lógico pensar que sus señales no presenten desplazamiento ya que se encuentra "encerrada" en un entorno más apolar e inalterable manteniéndose en forma neutra. Corroborando esta situación se encuentran las señales que corresponden a los protones de la cadena más alejados del grupo amino (*a*, *b* y *c*) que se desplazan ligeramente, mientras que las señales correspondientes a los protones *d* y *e* sufren desplazamientos mayores por estar cerca del grupo amino que se carga positivamente. Ajustando los valores de desplazamiento de estas señales a la ecuación<sup>58-60</sup>

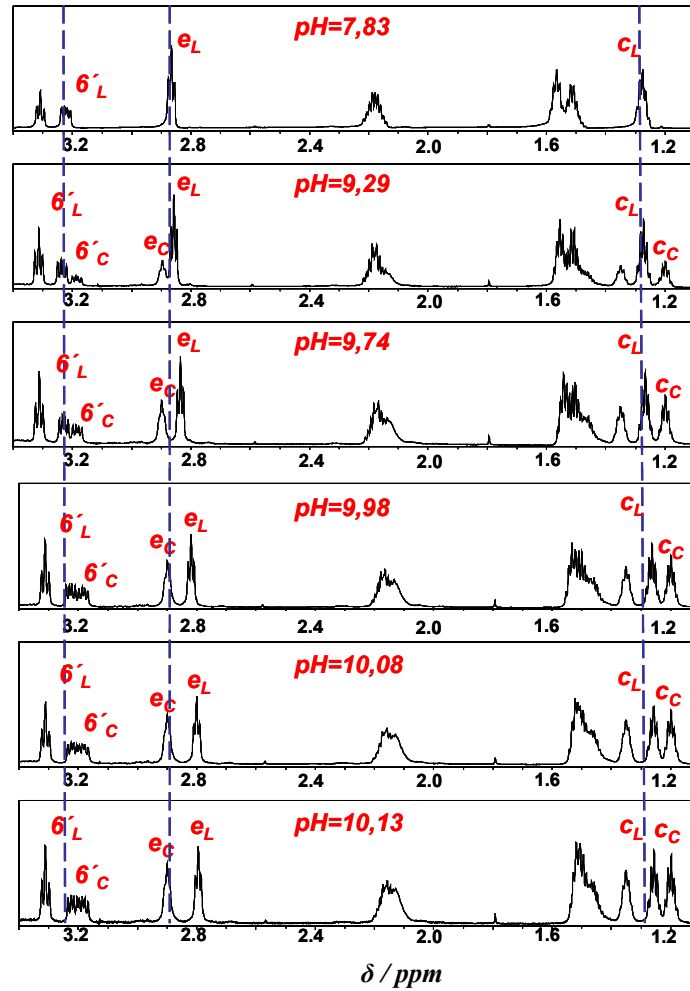
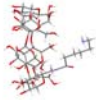
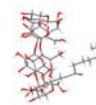


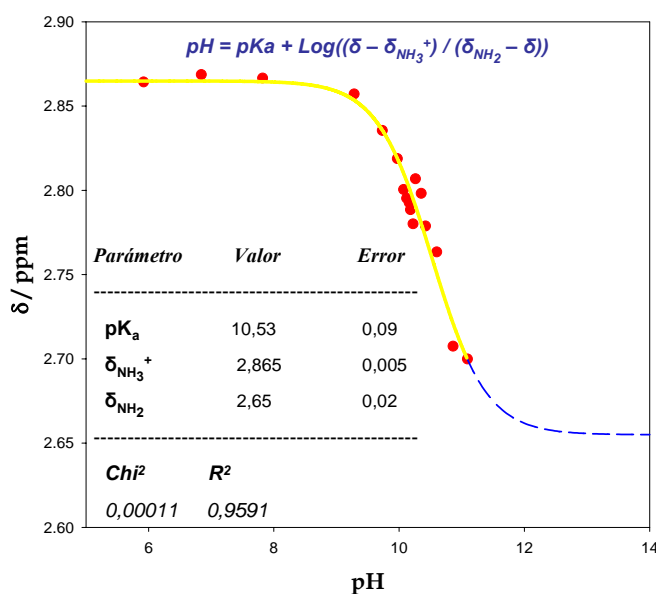
Figura VII.19.- Espectros de  $^1\text{H}$  del P5 a diferentes pH.  $[\text{P5}] = 10 \text{ mM}$  en  $\text{D}_2\text{O}$ , 750 MHz.

$$pH = pK_a + \text{Log} \frac{\delta - \delta_{\text{NH}_3^+}}{\delta_{\text{NH}_2} - \delta} \quad [\text{VII.1}]$$

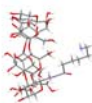


se obtiene un valor para el  $pK_{a2}$  de  $10,53 \pm 0,09$  (figura VII.20), muy similar con el valor de  $pK_a$  para aminas primarias obtenidas por May *et al.*<sup>61</sup>

Si se analizan con detenimiento las señales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY correspondientes a la  $\beta$ -CD a pH ácido y básico se observa que para las seis unidades de glucosa no sustituidas, en lugar de aparecer una única señal para el H-4 y una única señal para el H-5 (indicando que estas seis glucosas son equivalentes) aparecen dos señales muy claras a desplazamientos diferentes que no presentan interacción entre sí. La aparición de estas dos señales para cada protón indica que en cada anillo de  $\beta$ -CD existen dos grupos de glucosas diferenciadas por su entorno electrónico además de la glucosa sustituida. En la figura VII.21 se muestran las señales cruzadas tridimensionales 4-5 a pH ácido y básico. A pH ácido la intensidad de las dos interacciones es aproximadamente del mismo orden, sin embargo a pH básico se favorece mucho una de ellas frente a la otra.



**Figura VII.20.-** Dependencia de los desplazamientos químicos con el pH para la señal  $e_L$  utilizada por su proximidad al grupo amino terminal ionizable del P5. Los puntos rojos representan los puntos experimentales, la línea amarilla el ajuste y la línea de puntos la curva teórica.

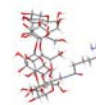


**Tabla VII.2.-** Composición en porcentaje calculada de las diferentes especies del *P5* en disolución en el intervalo de pH 5,93-11,10 ( $pK_{a1}=-1^{55-57}$  y  $pK_{a2}=10,53$  obtenido experimentalmente).

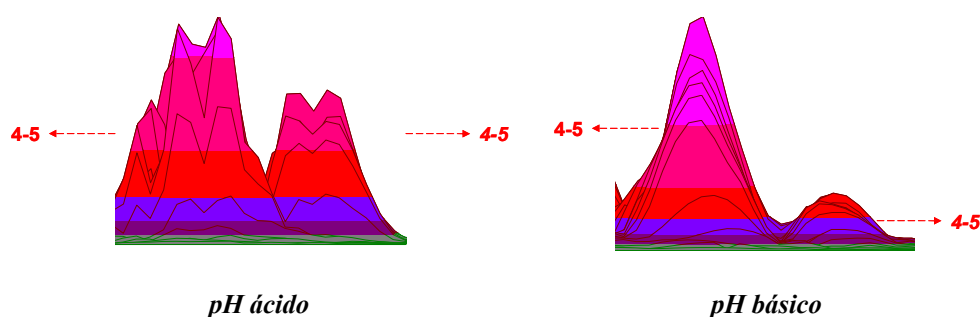
pH	Composición de <i>P5</i> en disolución/ %		
	<i>P5</i>	<i>P5H</i> <sup>+</sup>	<i>P5H</i> <sub>2</sub> <sup>2+</sup>
5,93	$3,3 \cdot 10^{-3}$	100,0	$1,2 \cdot 10^{-5}$
7,83	0,3	99,7	$1,5 \cdot 10^{-7}$
9,29	7,1	92,9	$4,8 \cdot 10^{-9}$
9,74	17,6	82,4	$1,5 \cdot 10^{-9}$
9,98	27,1	72,9	$7,6 \cdot 10^{-10}$
10,08	31,9	68,1	$5,7 \cdot 10^{-10}$
10,13	34,4	65,6	$4,9 \cdot 10^{-10}$
11,10	83,0	17,0	$1,3 \cdot 10^{-11}$

Teniendo en cuenta la distribución de especies que se muestra en la *tabla VII.2* se puede decir que, a pH ácido las moléculas de *P5* en disolución están en un 100% en forma monoprotonada, con la cadena lateral libre y con libertad de movimiento y por tanto debería existir únicamente una especie en disolución. La existencia de dos glucosas con entornos diferentes se puede explicar ya que la cadena estaría moviéndose con libertad hacia el disolvente, afectando únicamente al entorno de las glucosas más próximas a la glucosa sustituida y diferenciándolas de las más alejadas, que tendrán un entorno casi idéntico al de una  $\beta$ -CD sin sustituir. Sin embargo, a pH básico la cadena se encuentra en un 83% en forma neutra e incluida en la cavidad, aunque existe un 17% de la especie en forma monoprotonada. Es decir, la cadena tiende a incluirse en el interior de la cavidad. Es ahora, cuando se encuentra en un ambiente más apolar y uniforme, de manera que todas las unidades de glucosa se ven afectadas prácticamente por igual por la cadena, de ahí que una de las interacciones H4-H5 disminuya en favor del aumento de la otra.

Como ya se ha apuntado anteriormente existen dos posibilidades de inclusión de la cadena en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. Una de ellas sería un proceso intramolecular que denominaremos autoasociación,<sup>42,62</sup> y la otra posibilidad se daría entre distintas moléculas de manera que la cadena de una ciclodextrina se incluiría en otra molécula de ciclodextrina adyacente, formando un polímero supramolecular. El mejor modo de distinguir qué situación se da es obtener el peso molecular y el radio hidrodinámico del complejo a partir de medidas experimentales de luz dispersada (SLS y DLS). Los ensayos realizados de SLS generaron un peso molecular de  $1,1 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , muy cercano al valor del



peso molecular del monómero. Análogamente, el radio hidrodinámico se determinó a partir de experimentos DLS, se obtuvo un valor de 1,05 nm y polidispersidad 0,29. Este valor es semejante al tamaño de una molécula de P5 (la altura de un cono de ciclodextrina es aproximadamente de 8 Å).<sup>63</sup> Se demuestra así una asociación de tipo intramolecular o autoasociación.

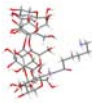


**Figura VII.21.-** Visión tridimensional de las dos interacciones H4-H5 que existen a pH 5,93 y 11,1.

### **Cálculo de la constante del equilibrio**

La autoasociación de la cadena lateral, en este caso, es un proceso de intercambio lento y por ello a partir del análisis de las áreas de las señales de  $^1\text{H}$  se puede obtener la constante de inclusión. El cálculo se puede realizar porque las áreas de las señales de  $^1\text{H}$  son directamente proporcionales a la concentración de las especies en disolución, ya sea especie libre o autoasociada.

El primer paso consistió en realizar una selección de las señales de los protones más apropiados para este análisis. Es necesario que las señales correspondientes a un mismo protón (asociado y libre) aparezcan suficientemente separadas en el espectro y, además, no deberían estar solapadas con otras señales. Las señales que cumplen estas características son las de los protones  $6'$ ,  $e$  y  $c$ . Cada una de ellas se desdobla en dos nuevas señales,  $6'_C$ ,  $6'_L$ ,  $e_C$ ,  $e_L$ ,  $c_C$ , y  $c_L$ , al aumentar el pH. Todas ellas se podrían utilizar para el cálculo de la constante de inclusión, aunque en algunas se produce una cierta superposición de otras señales que dificulta la integración normal brindada por los diferentes programas de análisis de



espectros de RMN disponibles comercialmente. Para obtener valores fiables de áreas, se utilizó un programa realizado en “Mathcad Profesional 2001”, que ajusta la intensidad ( $I_{\text{RMN}}$ )-ppm a una función compuesta por Lorentzianas que simula la zona del espectro que nos interesa mediante el método de Levenberg-Marquardt. Una vez se han obtenido los parámetros optimizables del ajuste de la función global, ésta se puede separar en funciones que describen cada una de las señales individuales, y que se integran por separado. Finalmente, para calcular la constante de asociación es necesario buscar una relación entre el área y la concentración del complejo (como referencia interna se toma un protón que da una señal aislada e inalterable durante todo el experimento). Se sabe que el área está directamente relacionada con la concentración inicial de nuestra ciclodextrina, y en nuestro caso, como protón de referencia se ha tomado la señal que en la *figura VII.19* se designa como  $a$  (engloba  $a_C$  y  $a_L$ ).

La *figura VII.22* recoge los equilibrios que pueden aparecer en la disolución. Este sistema de ecuaciones se puede simplificar al no existir evidencias de la especie  $P5_C H^+$  (en la *figura VII.19* no existen desplazamientos de las señales del  $P5$  asociado) y se puede afirmar que el valor de  $pK_a$  calculado mediante desplazamientos de RMN representa únicamente el equilibrio ácido-base del  $P5$  libre. Se puede llegar fácilmente a las ecuaciones que relacionan la concentración con las áreas de las señales de  $P5$  complejado y libre partiendo de las ecuaciones de la constante de acidez, balance de materia y de la constante de autoasociación:

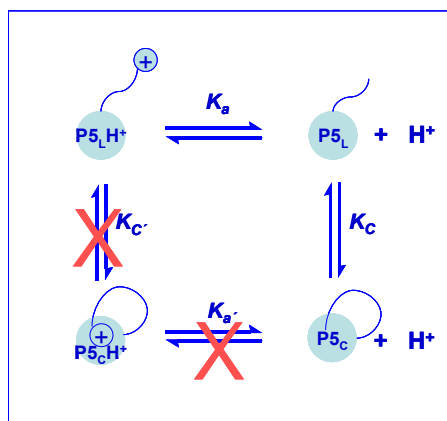
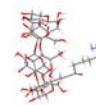
$$K_a = \frac{[P5_L][H^+]}{[P5_L H^+]} \quad K_C = \frac{[P5_C]}{[P5_L]} \quad \text{[VII.2]}$$

$$[P5]_0 = [P5_L H^+] + [P5_L] + [P5_C] \quad \text{[VII.3]}$$

Combinando las ecuaciones anteriores, y despejando la concentración de  $P5_C$  en función de la concentración inicial de  $P5$ , de la concentración de protones y de las constantes, se obtiene:

$$[P5_C] = \frac{k_C [P5]_0}{\frac{[H^+]}{K_a} + K_C + 1} \quad \text{[VII.4]}$$

La concentración de las diferentes especies se calcula usando el área de la señal de referencia ( $\text{área}_a$ ) que se define como:



**Figura VII.22.-** Equilibrios del *P5* en disolución.  $[P5_LH^+]$ =concentración de *P5* libre protonado en su grupo amino terminal;  $[P5_L]$ =concentración de *P5* libre;  $[P5_CH^+]$ =concentración de *P5* complejo protonado en su grupo amino terminal;  $[P5_C]$ =concentración de *P5* complejo;  $[P5]_0$ =concentración de *P5* total.

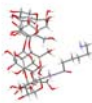
$$\text{área}_a = \frac{[P5]_a}{cte_a} = \frac{2}{cte_a} [P5]_0 \quad \text{[VII.5]}$$

y sabiendo que la ecuación que define el área relativa de las señales de *P5* autoasociado es función del área de la señal de referencia *a*,

$$\text{área relativa}_c = \frac{\text{área}_c}{\text{área}_a} = cte_{global} \frac{[P5]_c}{[P5]_0} \quad \text{[VII.6]}$$

se obtiene la ecuación del área relativa de cada una de las señales del *P5* complejo como una función de la concentración de protones y de  $K_a$ , pudiendo obtener así la constante de autoasociación,  $K_C$ .

$$\text{área relativa}_c = cte_{global} \frac{K_C}{\frac{[H^+]}{K_a} + K_C + 1} \quad \text{[VII.7]}$$

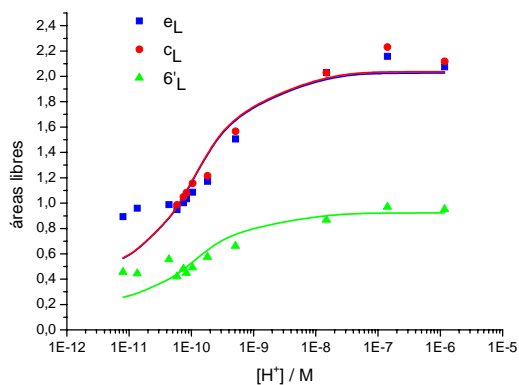
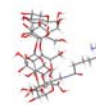


$$\text{área relativa}_L = cte_{global} \left[ 1 - \frac{K_C}{\frac{[H^+]}{K_a} + K_C + 1} \right] \quad [\text{VII.8}]$$

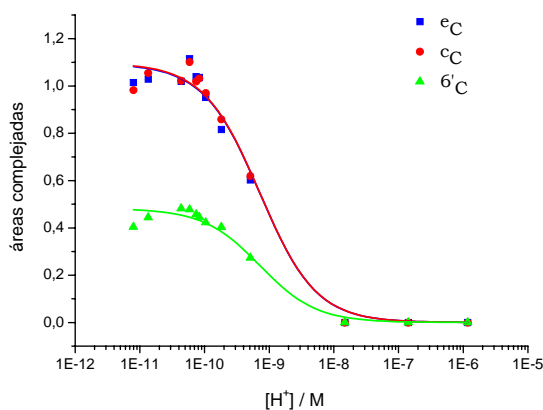
La figura VII.23 muestra los valores de las áreas de las distintas señales en función del pH y los resultados del ajuste obteniéndose un valor para la  $K_C$  que oscila entre  $3,3 \pm 0,3$  y  $23,2 \pm 2,8$  si se analiza el área de la molécula libre o autoasociada respectivamente. En estos ajustes se ha fijado el valor del parámetro  $K_a$  al valor determinado experimentalmente. El valor obtenido es similar a los valores obtenidos en disolución acuosa por Ikeda *et al*<sup>64</sup> y Matsumura *et al*<sup>65</sup> para derivados dansilo de la  $\beta$ -CD, a partir de medidas de fluorescencia.

El tautomerismo dentro-fuera implica el movimiento de la cadena lateral hacia el interior de la ciclodextrina cuando el grupo amino terminal está en forma neutra. Este mecanismo es diferente de aquéllos que implican el giro (en un determinado ángulo) de la glucosa a la que está unido el grupo que actúa de huésped.<sup>53,66</sup> El ejemplo más claro es el mecanismo citado por Yamada *et al*<sup>53,66</sup> que obliga a la unidad de glucosa a realizar un giro de  $360^\circ$ . Este giro debería justificar la alta energía libre de activación ( $=81 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) observada por Ellwood *et al*,<sup>66</sup> que provoca la velocidad de intercambio lento en la escala de tiempos de RMN.

Los valores para las dos constantes cinéticas,  $k_1$  y  $k_{-1}$ , fueron determinados por experimentos EXSY. Los valores obtenidos fueron  $0,174$  y  $0,161 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente ( $K_{intra}=k_1/k_{-1}=1,1$ ) y por tanto corroboran el valor de la constante de asociación obtenida desde el análisis de las áreas de las señales de RMN. La alta barrera energética que origina unos valores bajos de las constantes cinéticas, puede deberse a la pérdida necesaria de moléculas de agua de hidratación del grupo amino antes de entrar en la cavidad. Este fenómeno de deshidratación podría explicar procesos similares de intercambio lento para otros sistemas que engloben ciclodextrinas.<sup>67</sup>



Parámetro	Valor	Error
$K_a$	$2,95 \cdot 10^{-11}$	0
$K_C$	3,3	0,3
$\chi^2$	$R^2$	
0,02017	0,94145	

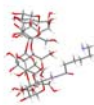


Parámetro	Valor	Error
$K_a$	$2,95 \cdot 10^{-11}$	0
$K_C$	23,2	2,8
$\chi^2$	$R^2$	
0,00202	0,9896	

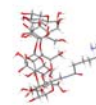
**Figura VII.23.-** Representación de los valores de las áreas de las señales  $e$ ,  $c$  y  $6'$  del  $P5$  libre y complejo en función de la concentración de protones en el medio.

### BIBLIOGRAFÍA

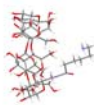
1. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, **1988**.
2. Ramos Cabrer, P.; Alvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 5489-95.



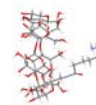
3. Harada, A.; Furue, M.; Nozakura, S. *Macromolecules* **1976**, *9*, 701.
4. Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1993**, *364*, 516-18.
5. Harada, A.; Kamachi, M. *J. Synthetic Org. Chem. Jpn.* **1994**, *52*, 831-8.
6. Tung, S.-H.; Huang, Y.-E.; Raghavan, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5751-6.
7. Harada, A.; Adachi, H.; Kawaguchi, Y.; Kamachi, M. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5181-2.
8. Hoshino, T.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9876-7.
9. Harada, A.; Kawaguchi, Y.; Hoshino, T. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *41*, 115-21.
10. Alvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Singh, A. P.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2002**, *14*, 397-404.
11. Liu, Y.; Li, L.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Wu, X.; Guan, X.-D.; Liu, S.-X. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 257-61.
12. Liu, Y.; Li, L.; Zhang, H.-Y.; Zhao, Y.-L.; Wu, X. *Macromolecules* **2002**, *35*, 9934-8.
13. Liu, Y.; Wang, H.; Zhang, H.-Y.; Wang, L.-H.; Song, Y. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 884-5.
14. Liu, Y.; Li, L.; Li, X.-Y.; Zhang, H.-Y.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3646-57.
15. Harada, A.; Miyauchi, M.; Hoshino, T. *J. Polymer Sci. A.* **2003**, *41*, 3519-23.
16. Liu, Y.; Wang, H.; Zhang, H.-Y.; Liang, P. *Chem. Commun.* **2004**, 2266-7.
17. Liu, Y.; Wang, H.; Liang, P.; Zhang, H.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2690-4.
18. Liu, Y.; Zhao, Y.-L.; Zhang, H.-Y.; Li, X.-Y.; Liang, P.; Zhang, X.-Z.; Xu, J.-J. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6362-9.
19. Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Harada, A. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2004**, *50*, 57-62.
20. Ohga, K.; Takashima, Y.; Takahashi, H.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 5897-904.



21. Miyauchi, M.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 104-5.
22. Miyauchi, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2984-9.
23. Miyauchi, M.; Hoshino, T.; Yamaguchi, H.; Kamitori, S.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2034-5.
24. Hasegawa, Y.; Miyauchi, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3724-30.
25. Breslow, R.; Belvedere, S.; Gershell, L.; Leung, D. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 333-42.
26. Zhang, B.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9353-4.
27. Breslow, R. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 493.
28. Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16224-30.
29. Hofmann, A. F.; Palmer, K. R.; Yoon, Y. B.; Hagey, L. R.; Gurantz, D.; Huijghebaert, S.; Converse, J. L.; Cecchetti, S.; Michelotti, E. *Falk Symposium* **1985**, *40*, 245-64.
30. Alvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Angew. Chem. Int., Ed.* **2000**, *39*, 2856-8.
31. Amiel, C.; Moine, L.; Sandier, A.; Brown, W.; David, C.; Hauss, F.; Renard, E.; Gosselet, M.; Sebille, B. *ACS Symp. Ser.* **2001**, *780*, 58-81.
32. Wenz, G.; Weickenmeier, M.; Huff, J. *ACS Symp. Ser.* **2000**, *765*, 271-83.
33. Gosselet, N. M.; Beucler, F.; Renard, E.; Amiel, C.; Sebille, B. *Colloids Surf. A* **1999**, *155*, 177-88.
34. Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1992**, *356*, 325.
35. Harada, A.; Okada, M.; Kawaguchi, Y.; Kamachi, M. *Polym. Adv. Technol.* **1999**, *10*, 3-12.
36. Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Fujita, K.; Ueda, T.; Shinoda, A.; Imoto, T.; Tabushi, I. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1143-4.
37. Kamitori, S.; Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Fujita, K.; Yamamura, H.; Imoto, T.; Tabushi, I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, 7-14.
38. Harata, K.; Rao, C. T.; Pitha, J. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 83-98.



39. Mentzafos, D.; Terzis, A.; Coleman, A. W.; deRango, C. *Carbohydr. Res.* **1996**, *282*, 125-35.
40. Miyauchi, M.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11418-9.
41. Ohga, K.; Takashima, Y.; Takahashi, H.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 320-1.
42. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Carrazana García, J.; Galantini, L.; Mejjide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5728-34.
43. Connors, K. A. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3. *Cyclodextrins* (Ed. Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F.), Chapter 6. Pergamon, **1996**.
44. Hirose, K. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *39*, 193-209.
45. Cameron, K. S.; Fletcher, D.; Fielding, L. *Magn. Res. Chem.* **2002**, *40*, 251-60.
46. Jover, A.; Budal, R. M.; Mejjide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18850-9.
47. Álvarez Alcalde, M.; Gancedo, G.; Jover, A.; Carrazana, J.; Soto, V. H.; Mejjide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13399-404.
48. Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Diao, C.-H. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 251-4.
49. Tellini, V. H. S.; Jover, A.; Galantini, L.; Mejjide, F.; Tato, J. V. *Acta Crystal.* **2004**, *B60*, 204-10.
50. McAlpine, S. R.; Garcia-Garibay, M. A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8307-9.
51. Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Oguma, N.; Nakamura, A.; Ikeda, T.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10980-8.
52. Ueno, A.; Ikeda, A.; Ikeda, H.; Ikeda, T.; Toda, F. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 382-7.
53. Yamada, T.; Fukuhara, G.; Kaneda, T. *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 534-5.
54. Park, J. W.; Lee, S. Y.; Song, H. J.; Park, K. K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9505-13.
55. Perrin, C. L. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 268-75.
56. Cox, R. A.; Druet, L. M.; Klausner, A. E.; Modro, T. A.; Wan, P.; Yates, K. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 1568-73.



## Capítulo VII

---

57. March, J. *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanism and Structure* Wiley, **1992**(4<sup>th</sup> ed.), New York.
58. Yarger, J. L.; Nieman, R. A.; Bieber, A. L. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 243-6.
59. Grunwald, E.; Loewenstein, A.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 641-2.
60. Grunwald, E.; Loewenstein, A.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 630-40.
61. Hall, H. K. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5441-4.
62. Zhang, W.; Nuckolls, C. 2nd Edition ed.; Ciferri, A., Editor; Taylor & Francis: Boca Raton, FL, **2005**; capítulo 16, pp 571-82.
63. Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M.; Takaha, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1787-802.
64. Ikeda, H.; Nakamura, M.; Ise, N.; Toda, F.; Ueno, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1411-8.
65. Matsumura, S.; Sakamoto, S.; Ueno, A.; Mihara, H. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1781-8.
66. Ellwood, P.; Spencer, C. M.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Zarzycki, R. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, *12*, 121-50.
67. Yonemura, H.; Kasahara, M.; Saito, H.; Nakamura, H.; Matsuo, T. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 5765.



## ***CONCLUSIONES***

---



## *Conclusiones*

---

Tanto las ciclodextrinas como las sales biliares se enmarcan dentro de dos campos que están en auge, como lo muestra el número de publicaciones en aumento que ha tenido lugar en las últimas décadas, aunque, hay que reconocer que resulta difícil aislar *el efecto que provoca el interés generado por estos campos del aumento generalizado del número de investigadores*. Este último efecto se puede minimizar si se tiene en cuenta un pequeño periodo de tiempo como puede ser el que va del año 2000 al año 2006 donde se produce un aumento del número de publicaciones de casi tres veces en lo referido a ciclodextrinas y el campo supramolecular.

En cuanto a las sales biliares, son las singularidades de su geometría esteroidal (es uno de los esqueletos estructurales quirales rígidos que tiene lugar en la naturaleza), y su capacidad superficial las características que están directamente relacionadas con su importancia en la Química Supramolecular. Todo esto se sobrepone al hecho del debate que todavía genera la determinación de sus propiedades superficiales y estructura micelar.

En el transcurso de la presente tesis doctoral se han llevado a cabo el estudio de diversos sistemas encuadrados dentro del desarrollo de nuevas arquitecturas supramoleculares, habiendo resumido en los capítulos precedentes los resultados más significativos. De tales resultados y la discusión de los mismos, hemos extraído las siguientes conclusiones:

### *Cristales de los epímeros derivados de los ácidos quenodesoxicólico y ursodesoxicólico*

Se han resuelto los cristales de los cuatro isómeros ( $3\alpha,7\alpha$ ;  $3\alpha,7\beta$ ;  $3\beta,7\alpha$  y  $3\beta,7\beta$ ) de estos ácidos dihidroxílicos, obtenidos por recristalización en *p*-xileno. Del análisis de los cristales se extraen las conclusiones: (i) Los dos isómeros que tienen una orientación  $\beta$  para el grupo hidroxilo O3H, muestran patrones de enlace de hidrógeno idénticos,  $*O7-O24a \rightarrow O7-O24b \leftarrow O3 \leftarrow O7*$ . (ii) Teniendo en cuenta que el O24a es siempre donante y el O24b es siempre aceptor, las secuencias de enlace de hidrógeno se pueden comprender en función de la interacción entre los dos grupos hidroxilo. La comparación para los cuatro isómeros es compleja debido a la existencia de dos moléculas en la unidad asimétrica del cristal del ácido ursodesoxicólico que obliga a que el mismo sitio de enlace de hidrógeno sea donante hacia diferentes aceptores (O7 u O24b). Para los otros epímeros la “regla del ácido desoxicólico” es obedecida ya que la secuencia es  $O7 \rightarrow O3$  cuando O3H

es  $\beta$  y O3→O7 cuando es  $\alpha$ . (iii) Se han introducido dos planos  $h$  y  $v$ , que permiten una mejor visualización de la orientación de la cadena alquílica lateral, portando el grupo carboxílico, con respecto al núcleo esteroide. Las distancias del grupo carboxílico al plano vertical son cortas y sólo el ácido quenodesoxicólico muestra una desviación positiva hacia la parte hidrófoba de la molécula (cara  $\beta$ ).

### *Nuevos monómeros diácidos derivados del ácido cólico*

Se han sintetizado dos nuevos derivados del ácido cólico al unirle dos grupos orgánicos que le otorgan un ácido carboxílico adicional en el extremo del anillo A. La introducción de estos grupos rompe claramente el balance hidrófilo/hidrófobo característico del ácido cólico natural a favor de una mayor hidrofiliia. Esto queda reflejado en el valor obtenido por medidas de la relación  $I_1/I_3$  del pireno solubilizado en estos sistemas de 1,08, claramente superior al 0,79 del ácido cólico, lo que muestra que la sonda fluorescente se ubica en una posición más polar, menos hidrófoba. Esta menor hidrofobia queda patente en un cambio en el valor de la *cmc* del derivado colato-3-amino succinato de sodio cuyo valor es 69,90 mM, que es muy superior al del colato sódico. La presencia de un grupo aromático, como puente entre el esqueleto esteroide y el nuevo ácido carboxílico, hace disminuir este valor de *cmc* desde el valor anterior hasta 11,3 mM, valor semejante al del ácido cólico. Ambos derivados se agregan en disolución acuosa, siendo tales agregados de carácter micelar con un diámetro hidrodinámico en torno a 2,7-3,0 nm y con un número de agregación entre 4-9 para el derivado alifático y 8-10 para el derivado aromático.

También se han obtenido los cristales de estos nuevos derivados, a partir de los que no se puede extrapolar un modelo de agregación al medio acuoso fundamentalmente por dos motivos: (i) el cristal obtenido corresponde a las formas ácidas y se han obtenido en metanol y, (ii) la existencia de una red cristalina en zig-zag que dispone a los esteroides con diferentes entornos. En el cristal del ácido cólico-3-amino succínico se resalta la posición del oxígeno del enlace amida con el succínico, que adopta la misma disposición que el 3OH del ácido cólico natural jugando un papel importante en la red de enlaces de hidrógeno. En cuanto a la estructura cristalina del derivado aromático, el átomo de oxígeno del enlace amida no presenta esa orientación, implicando que el grupo aromático no pueda originar un acoplamiento  $\pi$ - $\pi$ . No obstante la existencia del grupo aromático debe ser crítica en la agregación, ya que se produce un claro descenso de la *cmc* respecto al derivado alifático.

## *Conclusiones*

---

### *Sondas fluorescentes*

Se han sintetizado dos nuevas sondas fluorescentes resultado de unir mediante un enlace amida el grupo pirenilo en la posición 3 de los ácidos cólico y litocólico. Para ambas sondas, la relación de las señales vibracionales ( $I_1/I_2$ ) del espectro de emisión muestra una clara dependencia con la polaridad de los disolventes, siguiendo una pauta de comportamiento similar a la sonda fluorescente original. Esto las hace útiles a la hora de estudiar la polaridad del microentorno que las rodea tal y como muestran los estudios realizados con surfactantes bien caracterizados en la bibliografía (SDS, CTAB, NaC y NaDC). Así, confirman que el desoxicolato es más apolar que el colato.

### *Nuevos derivados gemini de sales biliares*

Se han obtenido cuatro nuevos derivados anfífilos de sales biliares con estructura de *gemini*, dos de ellos unidos mediante un puente rígido aromático (piromielítico) y dos a través de un puente flexible (AEDT). Dos de ellos tienen como residuo biliar al ácido cólico y los otros dos al ácido desoxicólico. La unión a los puentes se hace a través de la posición 24 del ácido biliar previamente transformado en su derivado amina.

Se concluye que todos los nuevos derivados presentan un comportamiento típico de surfactante *gemini* en cuanto a la reducción del valor de *cmc*, como mínimo dos ordenes de magnitud, y de la tensión superficial respecto al ácido cólico o desoxicólico de partida. Los derivados unidos por el AEDT, presentan valores de *cmc* de 30  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  para el *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT* y *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*, respectivamente. La *cmc* del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* resultó ser de 0,1-0,2 mM, siendo para el *g-2C<sub>24</sub>-PIR* superior, 0,3-1 mM. La relación  $I_1/I_3$  del pireno en estos sistemas es similar a la relación del pireno en micelas de colato o desoxicolato sódico, concluyéndose que el pireno se encuentra en un entorno de polaridad similar.

Las medidas de tensión superficial realizadas muestran dos puntos de ruptura claros en la pendiente de los puntos experimentales. Se concluye que cuando el *gemini* se disuelve en agua, las moléculas se ubican en la interfase aire-agua en una disposición en  $\nabla$  (el área por molécula de tensioactivo en la interfase es aproximadamente 100  $\text{Å}^2$ ). En ausencia de sales inertes añadidas, los *gemini* se ubican en la interfase en forma de  $\nabla$  con los grupos hidroxilos dirigidos hacia el interior de la  $\nabla$  estabilizando la estructura por medio de enlaces de hidrógeno

intermoleculares. En presencia de otras sales, el área por molécula se reduce hasta  $30 \text{ \AA}^2$  correspondiéndose con la formación de multicapas en la superficie.

Resumamos otras conclusiones para cada *gemini* por separado:

× ***g-2DC<sub>24</sub>-AEDT***

Este es el primer derivado de sal biliar del que se tiene constancia que da lugar a una transición vesícula-micela al aumentar la concentración. Se concluye que ello es debido a que en el intervalo de concentraciones previo a la *cmc* tiene lugar la incorporación de parte de la multicapa, generada en la interfase, al interior de la disolución, plegándose y dando lugar a vesículas espontáneas. Por medidas de dispersión de la luz dinámica se determinó el radio hidrodinámico de tales vesículas y mediante la dispersión de luz estática el radio de giro y la masa molecular. De esta última se deduce un número de agregación del orden de  $6 \times 10^4$ . El valor obtenido para el parámetro  $\rho = R_g/R_h$  es congruente con la formación de vesículas. A concentraciones elevadas tiene lugar la formación de micelas y, adicionalmente, se produce la disolución de las vesículas. El número de agregación de estas micelas es de 12 y su radio hidrodinámico  $R_h=2,5 \text{ nm}$ .

× ***g-2C<sub>24</sub>-AEDT***

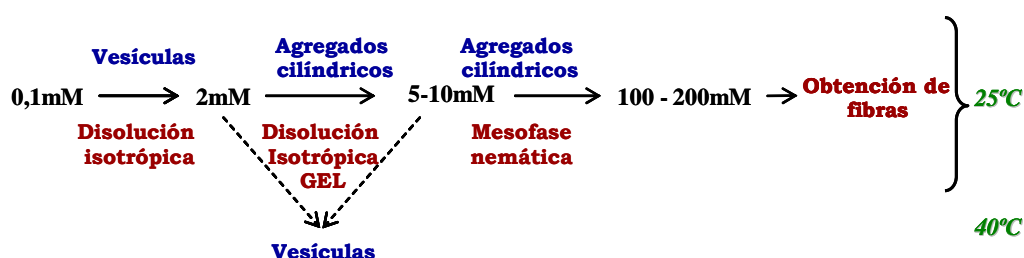
El cambio de ácido biliar en la estructura del *gemini* produce un cambio drástico en el comportamiento de agregación. La característica de este *gemini* en disolución es la cinética de crecimiento de los agregados iniciales hasta la precipitación de los mismos, fenómeno debido a un proceso de coalescencia donde las fuerzas atractivas superan la elasticidad de la vesícula. El hecho de que el aislamiento de las micelas, de características similares a las del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*, no implique un posterior crecimiento de las mismas, permite concluir que el crecimiento de los agregados está catalizado por las vesículas presentes en la disolución.

× ***g-2DC<sub>24</sub>-PIR***

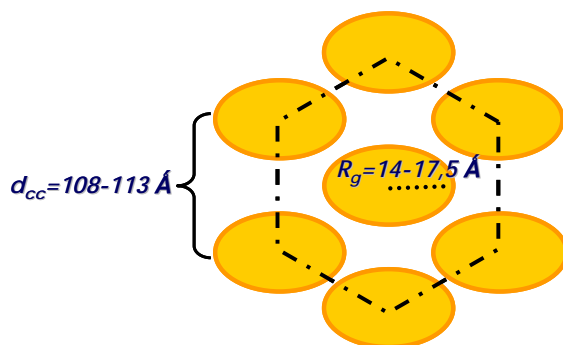
La introducción de un puente rígido piromiéltico entre los dos residuos biliares da lugar a un comportamiento totalmente diferente a los anteriores. El *gemini* derivado del ácido desoxicólico da lugar a estructuras vesiculares con un tamaño en torno a los 100 nm a bajas concentraciones. El proceso es fundamentalmente entálpico. Los agregados iniciales se transforman en estructuras tipo “gusano” o cilíndricas que provocan un cambio en las propiedades reológicas

## Conclusiones

de la disolución, aumentando la viscosidad de la misma, originando finalmente una mesofase nemática. Aunque algunas sales biliares forman cristales líquidos liotrópicos, la peculiaridad de este *gemini* está en que esta fase se obtiene a concentraciones muy inferiores y de un modo casi instantáneo. Por simplicidad de explicación, el *esquema 1* recoge las distintas regiones del diagrama de fases. Los estudios de Rayos X a bajo ángulo (SAXS) indican un orden bajo en la mesofase, recogiendo el *esquema 2* los datos derivados de tal estudio.



Esquema 1.- Diagrama de fases básico para el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*.



Esquema 2.- Resultados SAXS obtenidos para la disolución anisotrópica.

Se ha observado la formación de esferulitas por parte de la di-imida del desoxicólico (que en reacciones sucesivas deriva en el *gemini g-2DC<sub>24</sub>-PIR*) en una mezcla MeOH/CHCl<sub>3</sub>.

× *g-2C<sub>24</sub>-PIR*

El cambio del residuo biliar, en relación al *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*, conduce a un proceso de agregación diferente. En disoluciones de concentración por encima de la *cmc*, se observan agregados cilíndricos y no se detecta un cambio visual en el comportamiento reológico ni un cambio anisotrópico. La técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión nos ha proporcionado imágenes donde se observaron agregados cilíndricos con un diámetro de 20-30 nm y una longitud de 180-240 nm. Por medidas de *Light Scattering* se determinó el número de agregación de ~3000 unidades de *gemini*. La agregación en disolución está controlada principalmente por el factor entálpico.

*Nuevos dímeros derivados del ácido cólico y desoxicólico*

Se sintetizaron dos nuevos dímeros *cola-cola* derivados del ácido 3β-cólico y 3β-desoxicólico. Estas moléculas se caracterizan por poseer doble carga respecto al número de unidades esteroide, localizadas en los extremos de cada sal biliar. Esta estructura viene siendo como un dímero del colato-3-amino succinato de sodio, puesto que también en su estructura existe una carga doble.

La determinación de la *cmc* a distintas temperaturas ha permitido concluir que este tipo de dímeros presenta un modelo de agregación micelar en el que domina el efecto entálpico frente al entrópico, dominante en el proceso de agregación de las sales biliares naturales.

El diámetro hidrodinámico de los agregados en disolución de los dos dímeros es similar al de las sales biliares de partida, ~3,2 nm. El dímero del desoxicólico presenta un número de agregación ligeramente superior al del derivado del cólico. Teniendo en cuenta la escala de polaridad del pireno, las nuevas micelas presentan un ambiente de polaridad semejante a las del colato y del desoxicolato, respectivamente.

Si comparamos el *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* con el colato-3-amino succinato de sodio, se observa un descenso considerable en el valor de *cmc*, no debiendo resultar extraño este fenómeno ya que el mismo ha sido observado en la dimerización de surfactantes convencionales.

Otra peculiaridad de estos nuevos dímeros viene impuesta por el puente y los valores de *pKa* del mismo, dos unidades inferiores a los valores para ácidos carboxílicos como por ejemplo el ácido acético, esto nos lleva a pensar que puedan

## *Conclusiones*

---

presentar valores de *cm<sub>pH</sub>* bajos, favoreciendo su solubilidad a pH entre 5,5-7, valor de pH en el intestino delgado, lo que les otorga ciertas perspectivas biológicas.

### *Isomerismo in-out*

Se ha sintetizado un nuevo derivado aminado de la  $\beta$ -ciclodextrina, 6-(6-aminohexanamido)-6-desoxi- $\beta$ -ciclodextrina, que da lugar a un proceso de inclusión intramolecular, que ha sido estudiado mediante técnicas de RMN.

El proceso de desprotonación/protonación del grupo amino terminal estimula el movimiento “in-out” de la cadena lateral hacia o desde la cavidad de la ciclodextrina. Cuando el grupo amino terminal está protonado, la cadena lateral tiende hacia fuera de la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina. Por otro lado, a valores altos del pH, donde el grupo amino está desprotonado, la cadena reside interna y externamente de la cavidad. En la escala de tiempos de RMN, la protonación del grupo amino es rápida y el movimiento de la cadena lateral es lento. Se determinaron las constantes de equilibrio para ambos procesos y las constantes cinéticas para el proceso de inclusión.



*APÉNDICE A.- SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE DERIVADOS DE SALES BILIARES*

---



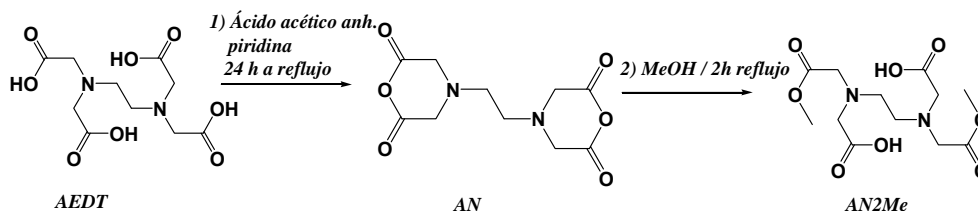
### **A.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL PUENTE DE UNIÓN DERIVADO DEL ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO (AEDT)**

La ruta sintética<sup>1,2</sup> se divide en las dos etapas que se representan en la *figura A.1*:

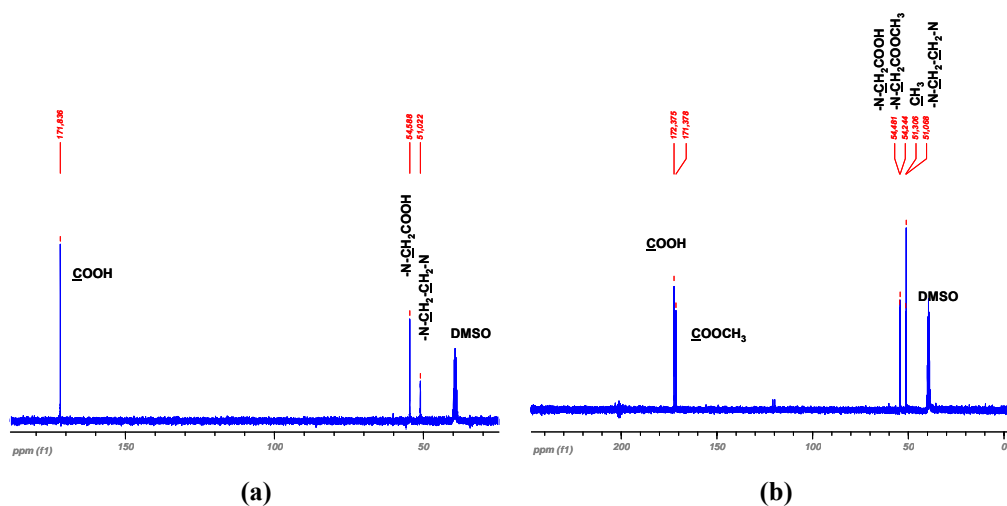
***Etapas 1) Síntesis del anhídrido de AEDT.*** Para ello se pesan 3,64 gramos de AEDT (12,45 milimoles) y 6,12 mL de piridina (75,85 milimoles) disueltos en 4,78 mL de anhídrido acético (50,84 milimoles). La reacción se pone a reflujo a 65°C durante 24 horas. En la parte superior del refrigerante se coloca una trampa de CaCl<sub>2</sub> para garantizar una atmósfera de reacción completamente seca. Transcurridas las 24 horas, se filtra el producto obtenido y se lava el residuo con 25 mL de anhídrido acético y con 50 mL de éter etílico respectivamente. Finalmente se deja en estufa a vacío durante 12 horas a 60°C.

***Etapas 2) Doble reacción de esterificación.*** Para ello se parte inicialmente de 4,68 gramos del anhídrido de AEDT sintetizado en la etapa 1 (18,27 milimoles) a los que se añaden 45 mL de metanol de calidad para HPLC y se calienta a reflujo constante a 80-90°C durante dos horas. Después de aproximadamente 90 minutos de iniciado el reflujo, el anhídrido de AEDT se disuelve por completo, indicio claro de que la reacción de esterificación de los grupos ácidos ya ha tenido lugar. Sin embargo, se deja que la reacción transcurra durante otros 30 minutos más. El punto final de la reacción se determina mediante cromatografía en capa fina. Las placas se desarrollan en una mezcla metanol: acetato de etilo 1:1 y se revelan con yodo. Una vez terminada la reacción, se lleva a temperatura ambiente y se concentra hasta la aparición de un característico aceite amarillento. A continuación se añaden 200 mL de metanol y se reduce su volumen hasta que aparece una leve turbidez. Se precipita a baja temperatura (después de tres horas aproximadamente ya se observa la formación de una buena cantidad de precipitado), se filtra y se lava con metanol (calidad para HPLC). Finalmente se seca en estufa a vacío durante 12 horas y se pesa. El rendimiento de la reacción fue del 50%. En la *figura A.2* se pueden ver los espectros <sup>13</sup>C del AEDT y del derivado diéster.

Recientemente se ha encontrado en la bibliografía un método de purificación que resulta en un mayor rendimiento (del 98%) con sólo una purificación en acetato de etilo.<sup>3</sup>



**Figura A.1.-** Ruta sint\u00e9tica del puente bidentado derivado del \u00e1cido etilendiaminotetraac\u00e9tico.



**Figura A.2.-** Espectros del  $^{13}\text{C}$  del AEDT **(a)**, y del di\u00e9ster del AEDT **(b)**. DMSO deuterado, 300MHz.

## A.2.- S\u00cdNTEsis DEL PUENTE DE UNI\u00d3N DERIVADO DEL \u00c1CIDO PIROMIEL\u00cdTICO (PMA)

Esta ruta consta de tres etapas tal y como se representa en la *figura A.3*:

**Etapa 1) Cristalización del anhídrido piromielítico comercial.** Se llevan a ebullición aproximadamente 50 mL de anhídrido acético a los que se añaden, a medida que se va disolviendo, pequeñas cantidades del anhídrido piromielítico comercial. Cuando la disolución está saturada, se tapa el recipiente y se observa como el anhídrido piromielítico va cristalizando al alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se filtra y se seca en estufa a vacío.

**Etapa 2) Apertura de los dos grupos anhídrido.** Se pesan 4,39 gramos del anhídrido piromielítico cristalizado en la etapa anterior (20,10 milimoles) y se añaden 40 mL de metanol (calidad para HPLC). La reacción tiene lugar a reflujo durante dos horas bajo atmósfera de argón siguiéndose mediante cromatografía en capa fina (eluyente: metanol:acetato de etilo 1:1 y revelado en yodo). Finalizada la reacción, se enfría a temperatura ambiente y se añaden 100-150 mL de agua destilada, se concentra hasta que se observa la aparición de una leve turbidez y se pone la mezcla de reacción a baja temperatura durante 24-48 horas. En primer lugar precipita el *p*-diésterpiromielítico: transcurridas 48 horas en la nevera se filtra (reservando la disolución filtrada) y se lava con agua el precipitado obtenido que se seca a vacío a 60-70 °C durante 24 horas. El rendimiento de la reacción fue del 35%. La disolución guardada (*meta*-diésterpiromielítico) se concentra en rotavapor hasta formación de un sólido blanquecino. Se añade metanol (calidad para HPLC) y se disuelve. Se concentra nuevamente hasta la obtención de una especie de aceite. Se añade de nuevo un poco de agua y se guarda a temperatura baja. Transcurridas 24 horas se forma un nuevo precipitado que es en su mayoría el ácido *meta*-piromielítico, mientras que en disolución queda una mezcla al 50% de ambos, *p*, *m*-piromielítico. Se consigue separar así satisfactoriamente ambos isómeros, *meta* y *para*.<sup>4</sup>

**Etapa 3) Obtención del dicloruro *p*-diésterpiromielítico.** Se ponen a reflujo 0,18 gramos de *para*-diésterpiromielítico (0,627 milimoles) en 25 mL de SOCl<sub>2</sub> durante aproximadamente una hora. Transcurrido este tiempo, se evapora completamente el disolvente en un rotavapor y se pone a vacío en un baño de silicona a 50°C durante dos horas para eliminar completamente cualquier resto de SOCl<sub>2</sub>. El rendimiento de esta reacción es prácticamente el 100%. En la *figura A.4* pueden verse los espectros <sup>13</sup>C de los dos isómeros.

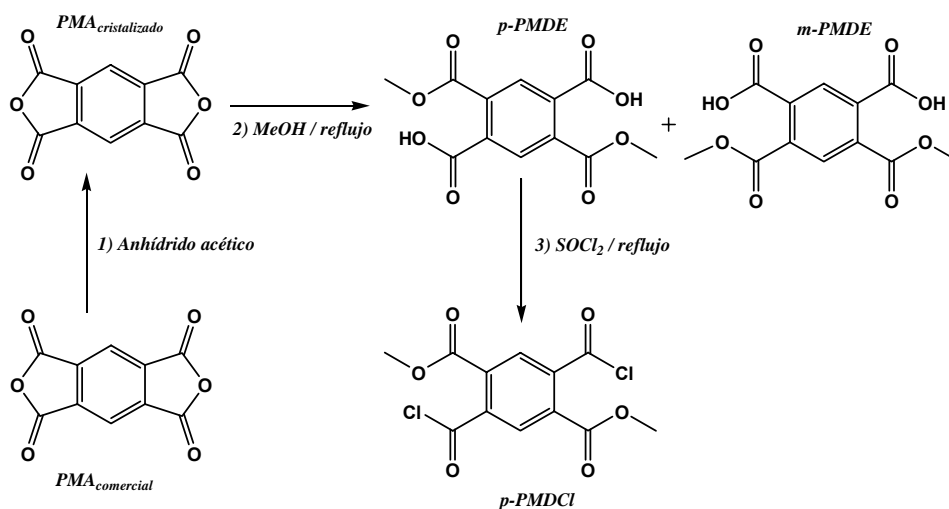


Figura A.3.- Ruta sintética del puente piromielítico.

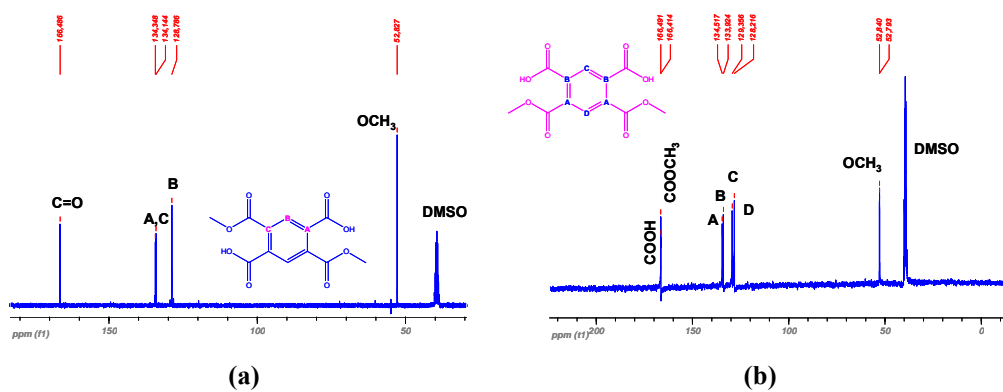


Figura A.4.- Espectros del <sup>13</sup>C del *p*-diésterpiromielítico (a), y del *m*-diésterpiromielítico (b). DMSO deuterado, 300MHz.

### A.3.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS 24-AMINODERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO, DESOXICÓLICO, QUENODESOXICÓLICO Y URSODESOXICÓLICO

- (3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantreno-3,7,12-triol (24-aminocolato)
- (3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantreno-3,12-diol (24-aminodesoxicolato)
- (3R,5S,7R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantreno-3,7-diol (24-aminoquenodesoxicolato)
- (3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantreno-3,7-diol (24-aminoursodesoxicolato)

La síntesis de compuestos de tipo 24-aminoderivados a partir de los ácidos correspondientes comprende dos etapas importantes como puede verse en la *figura A.5*:

#### *Etapas 1) Preparación de los 24-amidoderivados a partir de los ácidos comerciales:*

- (R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,7,12-trihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidocolato)
- (R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,12-dihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidodesoxicolato)
- (R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,7-dihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidoquenodesoxicolato)
- (R)-4-((3R,5S,7S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,7-dihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[ $\alpha$ ]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidoursodesoxicolato)

En esta etapa tiene lugar la amidación del grupo ácido de la posición 24 de los distintos ácidos. Para ello, se pesan 4,17 gramos del ácido comercial correspondiente (0,01 moles) y se disuelven en 50 mL de dioxano. Cuando está totalmente disuelto se enfría en un baño de agua-hielo a 10°C. A continuación se añade 1 mL de etil-cloro-formiato (0,01 moles) y 1,4 mL de trietilamina (0,01 moles), esta mezcla se agita durante 10 minutos antes de añadir 0,025 moles (17 mL) de una disolución de amoníaco en metanol 2 M. Durante 30 minutos se deja que la disolución tenga lugar a 10°C y durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se concentra el volumen del líquido a 50°C, y a continuación se le añade agua hasta que se forma una buena cantidad de precipitado de color blanco que se deja reposar durante al menos cuatro horas a baja temperatura. Se filtra a vacío el precipitado, se lava con agua y se seca en una estufa a vacío durante 12 horas. El rendimiento de la reacción fue del 94%.

Un método alternativo consiste en hacer burbujear una corriente de  $\text{NH}_3(\text{g})$  en el balón de reacción durante 30 minutos a 10°C, y a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. Es entonces cuando se retira el dispositivo de amoníaco y se deja que la reacción transcurra durante otra hora. Se obtiene así el 24-amidoderivado con un rendimiento similar al del otro método, del 88%. De hecho, éste ha sido el método más aplicado debido a su menor coste.

***Etapa 2) Preparación de los 24-aminoderivados a partir de las correspondientes amidas.***<sup>5,6</sup> En esta etapa tiene lugar la reducción del grupo amida de la posición 24 a amina y se emplea como agente reductor el hidruro de litio aluminio,  $\text{LiAlH}_4$ , el equipo de reflujo debe estar perfectamente limpio y seco (con una pistola de aire caliente se seca perfectamente hasta que ya no se observe condensación y se purga el equipo con argón). El primer reactivo que se añade es el 24-amidoderivado (0,41 gramos; 1milimol) y a continuación se añaden 80 mL de tetrahidrofurano seco y destilado, THF. Se añaden después bajo agitación y con mucho cuidado 5 gramos de  $\text{LiAlH}_4$  previamente pesado. La reacción tiene lugar durante las 24 horas siguientes a reflujo suave. Cada 4 horas es muy conveniente añadir una dosis pequeña de agente reductor (0,5-1 gramos). Finalizada la reacción, se deja que alcance temperatura ambiente y se le añade gota a gota una mezcla de  $\text{THF}_{\text{comercial}}$ : agua (30:15) pues se forma bastante efervescencia; cuando cesa, se añade agua con mucho cuidado. La disolución se vuelve blanca por la formación de sales de litio, que se filtran a gravedad. La disolución filtrada se extrae con una mezcla éter etílico: acetato de etilo (1:1). Finalmente se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro. El filtrado se concentra hasta sequedad y se disuelve en cloroformo para poder purificarlo por cromatografía en columna, primero en una mezcla hexano:

## Apéndice A

acetato de etilo 1:1, y después se cambia la polaridad utilizando una mezcla metanol: trietilamina 95:5, con la que se extrae el 24-aminoderivado puro. La reacción se sigue por capa fina con la mezcla de disolvente ya citada. En las *figuras* A.6 y A.8 pueden verse los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-amidocolato y del 24-amidodesoxicolato; en las *figuras* A.7, A.9, A.10 y A.11, los espectros de los 24-aminoderivados; en la *tabla* A.1, los desplazamientos  $^{13}\text{C}$  en metanol deuterado.

X, Y, Z= $\alpha$ -OH----- ácido cólico  
 X, Z= $\alpha$ -OH; Y=H----- ácido desoxicólico  
 X= $\alpha$ -OH; Y= $\beta$ -OH; Z=H----- ácido ursodesoxicólico  
 X, Y= $\alpha$ -OH; Z=H----- ácido quenodesoxicólico

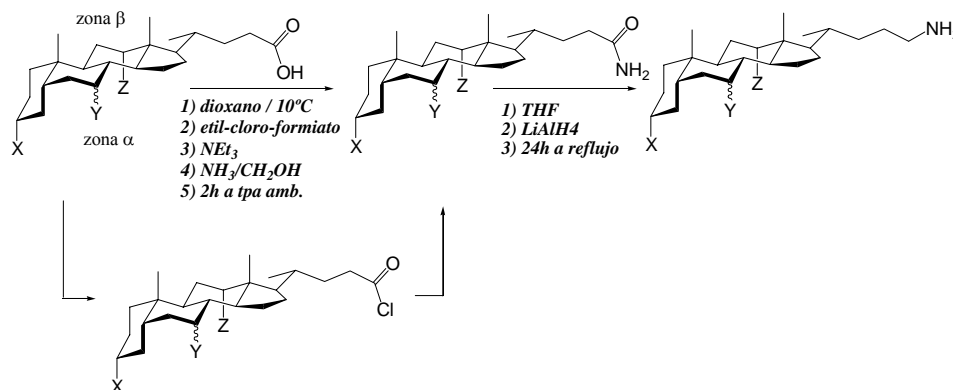


Figura A.5.- Ruta sintética de los 24-aminoderivados.

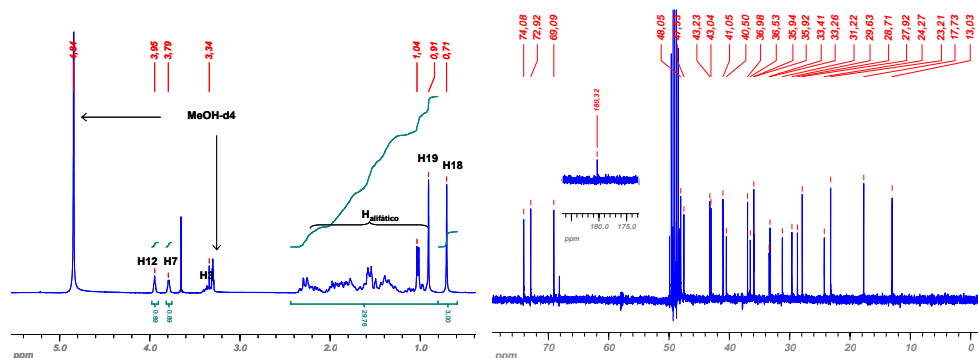


Figura A.6.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-amidocolato. Metanol deuterado, 300MHz.

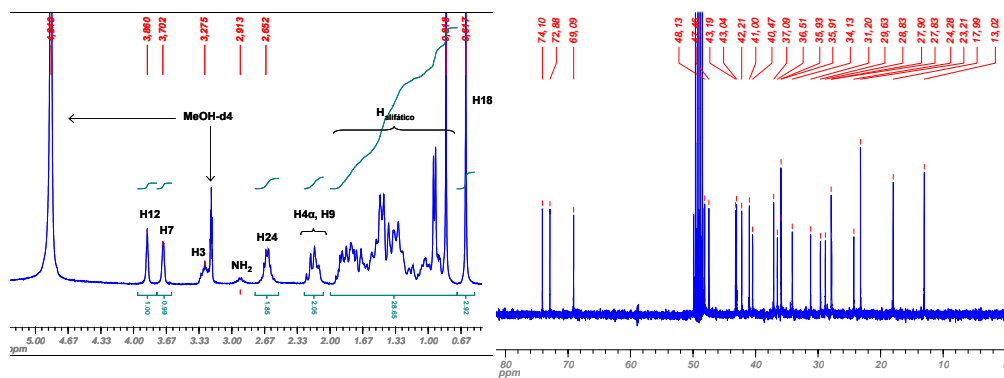


Figura A.7.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-aminocolato. Metanol deuterado, 300MHz.

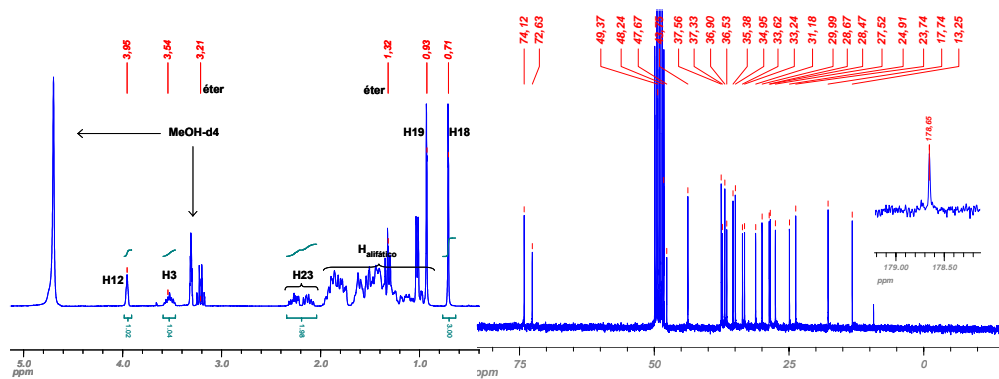


Figura A.8.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-amidodesoxicolato. Metanol deuterado, 300MHz.

Apéndice A

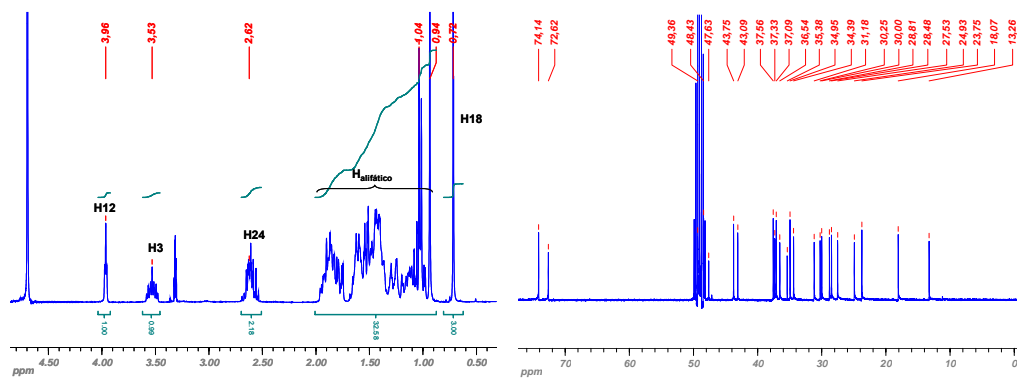


Figura A.9.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-aminodesoxicolato. Metanol deuterado, 300MHz.

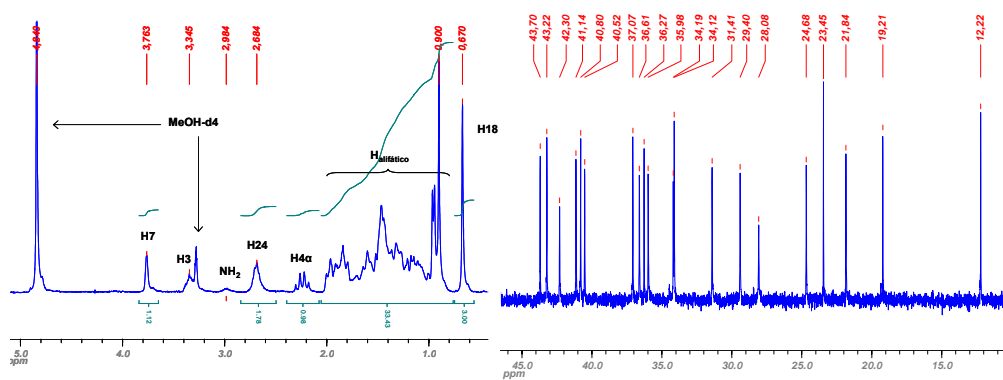


Figura A.10.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-aminoquenosodesoxicolato. Metanol deuterado, 300MHz.

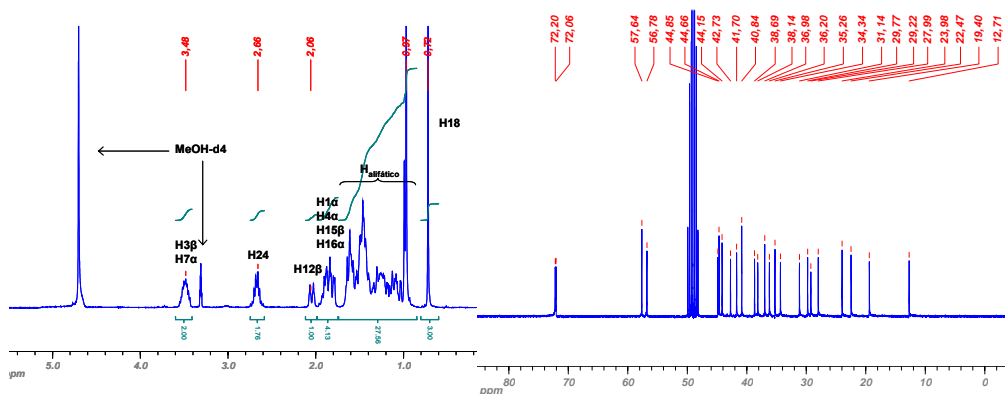


Figura A.11.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 24-aminoursodesoxicolato. Metanol deuterado, 300MHz

Tabla A.1.- Desplazamientos químicos de los 24-amido y 24-aminoderivados. Disolvente: metanol deuterado. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

	24-amidocolato		24-aminocolato		24-amidodesoxicolato		24-aminodesoxicolato		24-aminoquenosodesoxicolato		24-aminoursodesoxicolato	
	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$
1	$\text{CH}_2$	36,53	$\text{CH}_2$	40,47	$\text{CH}_2$	36,53	$\text{CH}_2$	36,54	$\text{CH}_2$	36,61	$\text{CH}_2$	36,20
2	$\text{CH}_2$	31,22	$\text{CH}_2$	31,19	$\text{CH}_2$	31,18	$\text{CH}_2$	31,18	$\text{CH}_2$	31,41	$\text{CH}_2$	31,14
3	$\text{CH}$	72,92	$\text{CH}$	72,88	$\text{CH}$	72,63	$\text{CH}$	72,62	$\text{CH}$	72,88	$\text{CH}$	72,06
4	$\text{CH}_2$	40,50	$\text{CH}_2$	40,47	$\text{CH}_2$	37,33	$\text{CH}_2$	37,33	$\text{CH}_2$	40,52	$\text{CH}_2$	38,69
5	$\text{CH}$	43,23	$\text{CH}$	43,19	$\text{CH}$	43,75	$\text{CH}$	43,75	$\text{CH}$	43,22	$\text{CH}$	42,73
6	$\text{CH}_2$	35,92	$\text{CH}_2$	35,91	$\text{CH}_2$	28,47	$\text{CH}_2$	28,48	$\text{CH}_2$	35,98	$\text{CH}_2$	38,14
7	$\text{CH}$	69,09	$\text{CH}$	69,09	$\text{CH}_2$	27,52	$\text{CH}_2$	27,53	$\text{CH}$	69,08	$\text{CH}$	72,20
8	$\text{CH}$	41,05	$\text{CH}$	41,00	$\text{CH}$	37,56	$\text{CH}$	37,56	$\text{CH}$	40,80	$\text{CH}$	44,15
9	$\text{CH}$	27,92	$\text{CH}$	27,9	$\text{CH}$	34,95	$\text{CH}$	34,94	$\text{CH}$	34,12	$\text{CH}$	40,84
10	$\text{C}$	35,94	$\text{C}$	35,93	$\text{C}$	35,38	$\text{C}$	35,38	$\text{C}$	36,27	$\text{C}$	35,26
11	$\text{CH}_2$	29,63	$\text{CH}_2$	29,63	$\text{CH}_2$	29,99	$\text{CH}_2$	30,00	$\text{CH}_2$	21,84	$\text{CH}_2$	22,47
12	$\text{CH}$	74,08	$\text{CH}$	74,10	$\text{CH}$	74,12	$\text{CH}$	74,14	$\text{CH}_2$ ( $\text{H}_\beta$ )	41,14	$\text{CH}_2$ ( $\text{H}_\alpha$ )	41,70

## Apéndice A

	24- amidocolato		24- aminocolato		24- amidodesoxicolato		24- aminodesoxicolato		24- aminoquenosodesoxicolato		24- aminoursodesoxicolato	
13	C	47,53	C	47,45	C	47,67	C	47,63	C	43,70	C	44,85
14	CH	43,04	CH	43,04	CH	49,37	CH	49,36	CH	51,06	CH	56,78
15	CH <sub>2</sub>	24,27	CH <sub>2</sub>	24,28	CH <sub>2</sub>	24,91	CH <sub>2</sub>	24,93	CH <sub>2</sub>	24,68	CH <sub>2</sub>	27,99
16	CH <sub>2</sub>	28,71	CH <sub>2</sub>	28,70	CH <sub>2</sub>	28,67	CH <sub>2</sub>	28,49	CH <sub>2</sub>	29,40	CH <sub>2</sub>	29,77
17	CH	48,05	CH	48,13	CH	48,24	CH	48,43	CH	57,43	CH	57,64
18	CH <sub>3</sub>	13,03	CH <sub>3</sub>	13,00	CH <sub>3</sub>	13,25	CH <sub>3</sub>	13,26	CH <sub>3</sub>	12,21	CH <sub>3</sub>	12,71
19	CH <sub>3</sub>	23,21	CH <sub>3</sub>	23,21	CH <sub>3</sub>	23,74	CH <sub>3</sub>	23,75	CH <sub>3</sub>	23,45	CH <sub>3</sub>	23,98
20	CH	36,98	CH	37,09	CH	36,53	CH	36,54	CH	37,07	CH	36,98
21	CH <sub>3</sub>	17,73	CH <sub>3</sub>	17,98	CH <sub>3</sub>	17,74	CH <sub>3</sub>	18,07	CH <sub>3</sub>	19,21	CH <sub>3</sub>	19,40
22	CH <sub>2</sub>	33,41	CH <sub>2</sub>	34,13	CH <sub>2</sub>	33,62	CH <sub>2</sub>	34,39	CH <sub>2</sub>	34,19	CH <sub>2</sub>	34,34
23	CH <sub>2</sub>	33,26	CH <sub>2</sub>	27,83	CH <sub>2</sub>	33,24	CH <sub>2</sub>	30,25	CH <sub>2</sub>	28,08	CH <sub>2</sub>	29,22
24	C	180,32	CH <sub>2</sub>	42,21	C	178,66	CH <sub>2</sub>	43,09	CH <sub>2</sub>	42,30	CH <sub>2</sub>	44,65

### A.4.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS 3-AMINODERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO, DESOXICÓLICO Y LITOCÓLICO

- [(3 $\beta$ , 5 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ )-3-amino-7,12-dihidroxicolan-24-oico ácido metil éster] (3- $\beta$ -aminocolato de metilo)
- [(3 $\beta$ , 5 $\beta$ , 12 $\alpha$ )-3-amino-12-hidroxicolan-24-oico ácido metil éster] (3- $\beta$ -aminodesoxicolato de metilo)
- [(3 $\beta$ , 5 $\beta$ )-3-amino-colan-24-oico ácido metil éster] (3- $\beta$ -aminolitolocolato de metilo)

La incorporación del grupo amino se realizó en dos procesos "one pot", es decir, se ejecutan en el mismo balón de reacción sin aislar ningún intermedio (véase la *figura A.12*). El primero de ellos se conoce como reacción de Mitsunobu<sup>7,8</sup> y su mecanismo consta de las siguientes etapas: 1) *activación de la trifenilfosfina* mediante la formación de un aducto de tipo zwitterion; 2) *activación del alcohol*, vía un dialquiloilfosforano, ya que no hay un ácido en el medio lo que favorecería la ruta 2; 3) *desplazamiento de tipo SN2* que genera el producto final de reacción, la azida. La azida obtenida se reduce por la adición posterior de una mayor cantidad de trifenilfosfina y agua (reacción de Staudinger).<sup>9</sup> La adición de trifenilfosfina promueve la formación de un intermedio de tipo iminofosforano que

se hidroliza en presencia de ácidos, o bien con un exceso de agua, generando el óxido de trifenilfosfina y la amina de interés.

***Etpa 1) Protección del grupo ácido terminal por formación de un grupo éster.*** En un balón de 250 mL se agregan 67 milimoles (27,4 gramos) de ácido cólico, 125 mL de metanol de calidad para HPLC y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se pone a reflujo durante una hora y se enfría a temperatura ambiente. Después se deja en el congelador durante doce horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se filtran los cristales del producto y se secan durante 30 minutos al aire. Finalmente se dejan en estufa a vacío a una temperatura de 60°C. El producto se utiliza sin purificaciones adicionales para el resto de la secuencia.

***Etapa 2) Preparación de los 3-aminoderivados.*** En un balón de tres bocas de volumen adecuado con agitación, embudo de adición de presión compensada y entrada de argón, se prepara una disolución de 21 g del éster obtenido en la primera etapa en 500 mL de THF seco. Se agregan 13 gramos de trifenilfosfina, PPh<sub>3</sub>, y 10 mL de di-isopropilazodicarboxilato. Posteriormente se prepara en el embudo una disolución de azida difenilfosfina (11 mL) en 50 mL de THF. Esta disolución se debe añadir en 30 minutos. A continuación la mezcla se agita durante 24 horas. Se añaden ahora 13 g de PPh<sub>3</sub> y otros 10 mL de diisopropilazodicarboxilato, se agita durante 4 horas y finalmente se añaden otros 13 gramos de PPh<sub>3</sub> y 30 mL de agua, para reducir el grupo amino. Se agita durante 4 días. Transcurrido este tiempo se adsorbe la mezcla de reacción en una cantidad suficiente de gel de sílice y se elimina el THF en el rotavapor. Para un secado completo se incorpora a la bomba de vacío hasta que la cabeza de columna se observe totalmente suelta. Finalmente, se distribuye la cabeza en dos columnas cromatográficas que se empaquetan con una mezcla 1:1 acetato de etilo: metanol. Se eluye alrededor de un 1L de esta mezcla para eliminar los productos secundarios que se han formado durante la reacción, y posteriormente el producto puro se arrastra con una mezcla 95:5 metanol: trietilamina. Se realizan placas de capa fina en la misma mezcla de disolventes y como revelador se emplea el ácido fosfomolibdico. En las *figuras A.13, A.14 y A.15* pueden verse los espectros <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de los 3-aminoderivadas. Y en la *tabla A.2* pueden consultarse los desplazamientos químicos de las señales <sup>13</sup>C en ppm de estos derivados en dimetilsulfóxido.

Apéndice A

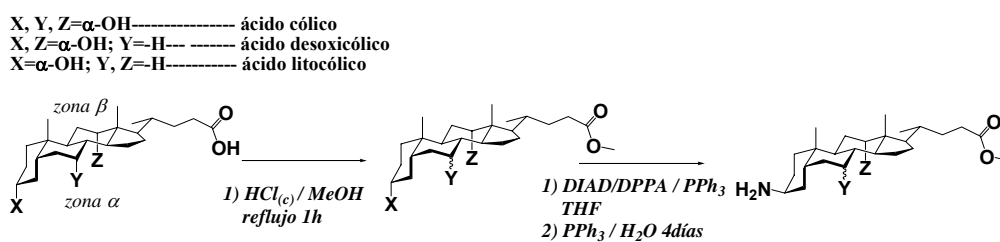


Figura A.12.- Ruta sintética de los 3-aminoderivados.

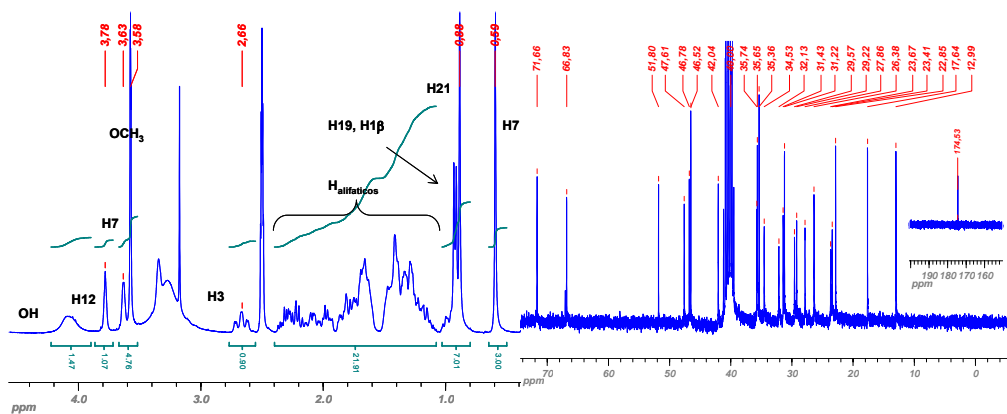


Figura A.13.- Espectros del  $^1H$  y  $^{13}C$  del 3-β-aminocolato de metilo. DMSO, 300MHz.

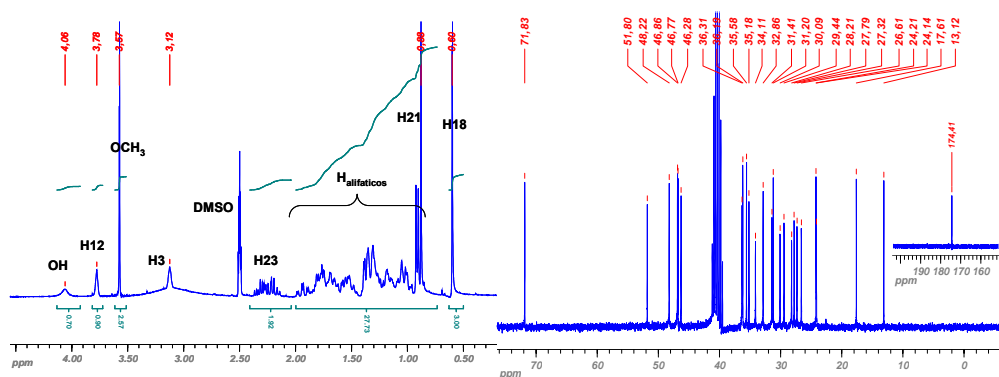


Figura A.14.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 3- $\beta$ -aminodesoxicolato de metilo. DMSO, 300MHz.

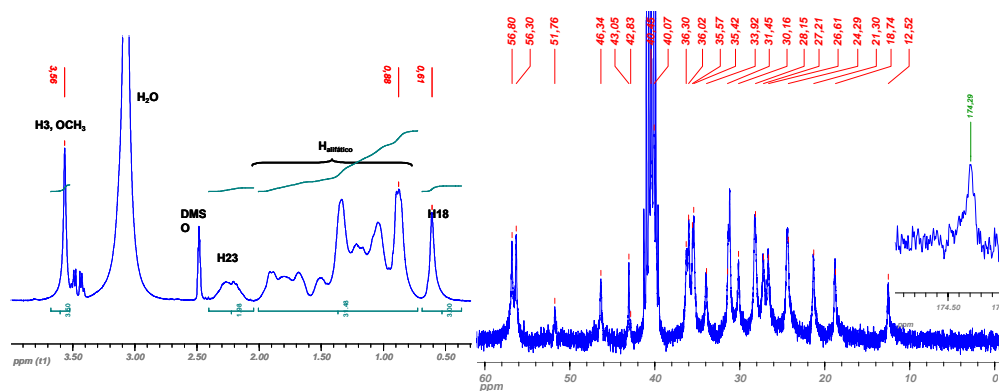


Figura A.15.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del 3- $\beta$ -aminolitolcolato de metilo. DMSO, 300MHz.

## Apéndice A

**Tabla A.2.-** Desplazamientos químicos de los 3-aminoderivados. Desplazamientos en dimetilsulfóxido deuterado. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

	3- $\beta$ -aminocolato de metilo		3- $\beta$ -aminodesoxicolato de metilo		3- $\beta$ -aminolitocolato de metilo	
	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$
1	CH <sub>2</sub>	32,13	CH <sub>2</sub>	32,86	CH <sub>2</sub>	35,42
2	CH <sub>2</sub>	23,66	CH <sub>2</sub>	26,61	CH <sub>2</sub>	30,15
3	CH	47,61	CH	46,77	CH	46,34
4	CH <sub>2</sub>	29,58	CH <sub>2</sub>	30,09	CH <sub>2</sub>	36,30
5	CH		CH	34,11	CH	42,83
6	CH <sub>2</sub>	34,53	CH <sub>2</sub>	28,21	CH <sub>2</sub>	27,19
7	CH	66,82	CH <sub>2</sub>	27,32	CH <sub>2</sub>	26,70
8	CH	40,00	CH	36,31	CH	36,02
9	CH	26,38	CH	35,19	CH	40,07
10	C	35,36	C	35,58	C	33,92
11	CH <sub>2</sub>	29,22	CH <sub>2</sub>	29,44	CH <sub>2</sub>	21,27
12	CH	71,66	CH	71,83	CH <sub>2</sub>	40,45
13	C	46,52	C	46,28	C	43,05
14	CH	42,04	CH	48,22	CH	56,80
15	CH <sub>2</sub>	23,41	CH <sub>2</sub>	24,14	CH <sub>2</sub>	24,46
16	CH <sub>2</sub>	27,86	CH <sub>2</sub>	27,79	CH <sub>2</sub>	28,21
17	CH	46,78	CH	46,86	CH	56,30
18	CH <sub>3</sub>	12,99	CH <sub>3</sub>	13,12	CH <sub>3</sub>	12,55
19	CH <sub>3</sub>	22,85	CH <sub>3</sub>	24,21	CH <sub>3</sub>	24,46
20	CH	35,74	CH	36,19	CH	35,57
21	CH <sub>3</sub>	17,63	CH <sub>3</sub>	17,61	CH <sub>3</sub>	18,77
22	CH <sub>2</sub>	31,43	CH <sub>2</sub>	31,20	CH <sub>2</sub>	31,34
23	CH <sub>2</sub>	32,13	CH <sub>2</sub>	31,41	CH <sub>2</sub>	31,17
24	C		C	174,51	C	174,29

### A.5.- SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS R-BS

- colato-3-amino-benzoato de sodio
- colato-3-amino-succinato de sodio
- ácido 3-pirenocólico
- ácido 3-pirenolitocólico

### A.5.a.- Síntesis del derivado aromático, colato-3-amino-benzoato de sodio

La ruta sintética del monómero colato-3-amino-benzoato de sodio se divide en dos etapas: la síntesis del monómero derivado en forma ácida y la obtención en forma de sal disódica.

**Etapa 1) Obtención del monómero en forma ácida.** En un balón de 100 mL se dispersan 0,9 gramos (5 milimoles) de ácido 4-metoxicarboxilbenzoico en 15 mL de DMF seca mediante agitación y bajo atmósfera de argón. Posteriormente se adicionan 0,7 mL (5,95 milimoles) de DEPC. Una vez disuelto el sólido en suspensión se añaden en porciones de 2,3 gramos (5,5 milimoles) de 3 $\beta$ -aminocolato de metilo (preparado como se describe en el apartado A.4) y se agita durante 10 minutos. Se enfría a continuación a 0°C y se añaden 8 mL (5,25 milimoles) de trietilamina gota a gota. El baño se mantiene durante 30 minutos y se retira para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora la DMF a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en 200 mL de acetato de etilo y se lava con 3 porciones de 50 mL de agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro. La purificación del producto se realiza mediante cromatografía de columna en gel de sílice con una mezcla de disolventes 9:1 acetato de etilo: metanol. Purificado ya el producto, se hidrolizan los grupos éster como sigue: 1 gramo del producto protegido con el grupo éster se añade en 50 mL de una disolución de KOH 1 M en metanol y se pone a reflujo durante 1 hora. Se evapora el disolvente y el concentrado que se obtiene se añade a 150 mL de agua, y se neutraliza con HCl concentrado hasta su completa precipitación. El producto se filtra y se lava 5 $\times$ 20 mL de agua, se seca y se recrystaliza en metanol (ver *figura A.16*). El rendimiento de esta reacción fue del 75%.

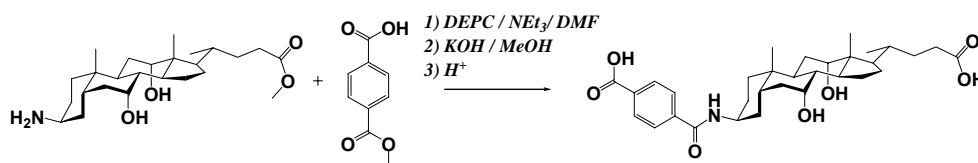


Figura A.16.- Ruta sintética del derivado aromático del colato.

**Etapa 2) Obtención de la sal disódica.** 1 gramo (18 milimoles) del diácido se disuelve con un equivalente de hidróxido sódico (0,07 gramos) en la mínima cantidad de agua (aproximadamente 5 mL). El ácido se añade lentamente sobre aproximadamente 200 mL de acetona sobre la que precipita, se espera a que se evapore cierta cantidad de acetona para conseguir un mejor precipitado y una mayor cantidad del mismo. Finalmente se filtra y se seca en estufa a vacío a 80°C durante el tiempo necesario para garantizar la ausencia de disolvente orgánico ocluido en el sólido (ver figura A.17).

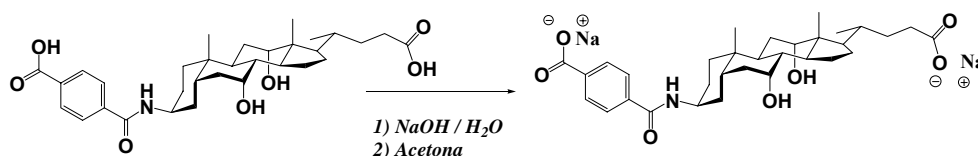


Figura A.17.- Ruta sintética del colato-3-amino-benzoato de sodio.

#### A.5.b.- Síntesis del derivado alifático, colato-3-amino-succinato de sodio

La ruta sintética del monómero colato-3-amino-succinato de sodio se puede dividir también en dos etapas: la síntesis del monómero derivado en forma ácida y la obtención de la sal disódica.

**Etapa 1) Obtención del monómero en forma ácida.** Una disolución de 6,15 gramos (15 milimoles) del 3-β-aminocolato de metilo (preparado tal y como se describe en el apartado A.4) en 85 mL de THF y 17mL de trietilamina se añade con 1,5 gramos de anhídrido succínico (15 milimoles). Después de 4 horas a temperatura ambiente la mezcla de reacción se vierte en 200mL de HCl 1M y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con agua, se seca y se evapora. El residuo se purifica por cromatografía en columna con una mezcla de elución 6:4 acetato de etilo: MeOH (ver figura A.18). El rendimiento final es del 82%.

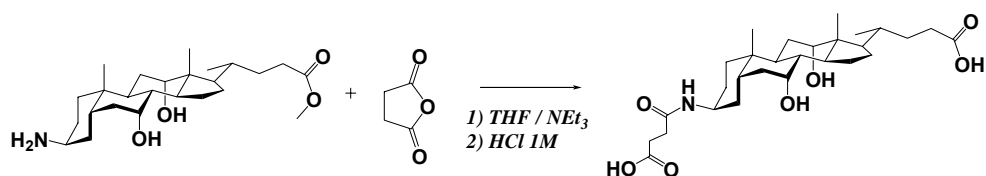


Figura A.18.- Ruta sintética del derivado alifático del colato.

**Etapa 2) Obtención de la sal disódica.** Se obtiene del mismo modo que el derivado aromático (ver figura A.19).

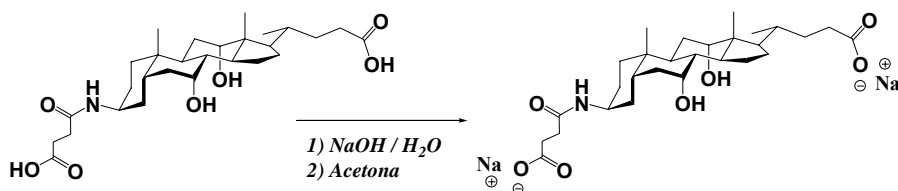
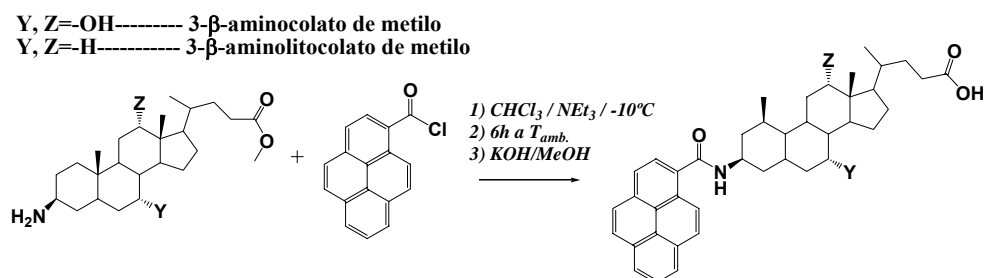


Figura A.19.- Ruta sintética del colato-3-amino-succinato de sodio.

### A.5.c.- Síntesis del derivado ácido 3-pirenocólico

El esquema de síntesis puede verse en la *figura A.20*. La reacción tiene lugar bajo atmósfera de argón. Se pesan 3 gramos de 3-β-aminocolato de metilo que se disuelven en 25 mL de cloroformo y 5 mL de trietilamina; se agita hasta su completa disolución y posteriormente se enfría en un baño agua-hielo-sal a -10°C. A continuación se añade gota a gota sobre una disolución previamente preparada en otro balón de 1,70 gramos del cloruro de 1-carboxipirenoilo disuelto en 5 mL de cloroformo. Se retira el baño de hielo y se deja que tenga lugar la reacción durante las horas siguientes. El producto final se purifica en cromatografía en columna (R<sub>f</sub>=0,62 en una mezcla 10:1 acetato de etilo: metanol). El rendimiento de la reacción es del 65%.



**Figura A.20.-** Ruta sintética del ácido 3-pirenocóico y del ácido 3-pirenolitocóico.

#### A.5.d.- Síntesis del derivado ácido 3-pirenolitocóico

El esquema de síntesis puede verse en la *figura A.20*; el procedimiento es el mismo que el que se describe en el apartado anterior. El producto final se purifica en cromatografía en columna, teniendo este derivado un  $R_f$  de 0,58 en una mezcla 6:4 hexano: acetato de etilo. El rendimiento de la reacción fue del 60%.

#### A.5.e.- Caracterización espectral. Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ resueltos

Los cuatro derivados *R-BS* han sido caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear. A continuación aparecen representados los espectros monodimensionales  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los cuatro monómeros; así como, en la *tabla A.3* pueden verse los desplazamientos de las señales de  $^{13}\text{C}$  correspondientes al grupo esteroide y a la cadena alifática o aromática respectivamente según el caso, y en la *tabla A.4* los desplazamientos correspondientes al grupo esteroide y al grupo pireno.

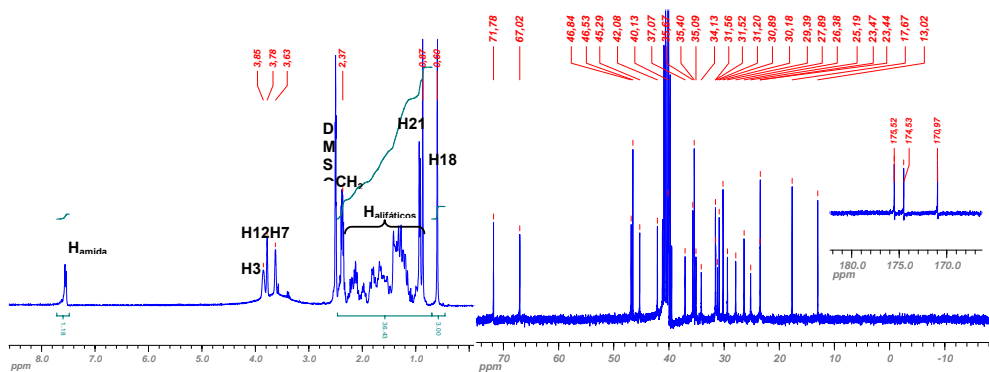


Figura A.21.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del colato-3-amino-succínico. DMSO, 300MHz.

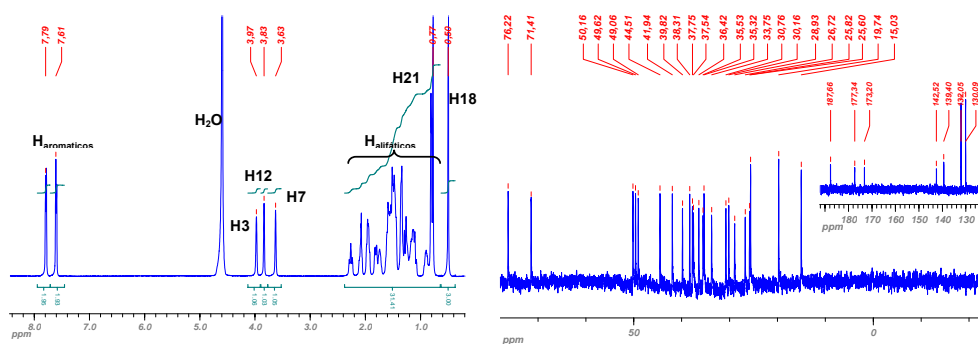


Figura A.22.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del colato-3-amino-benzoato de sodio.  $\text{D}_2\text{O}$ , 300MHz.

Apéndice A

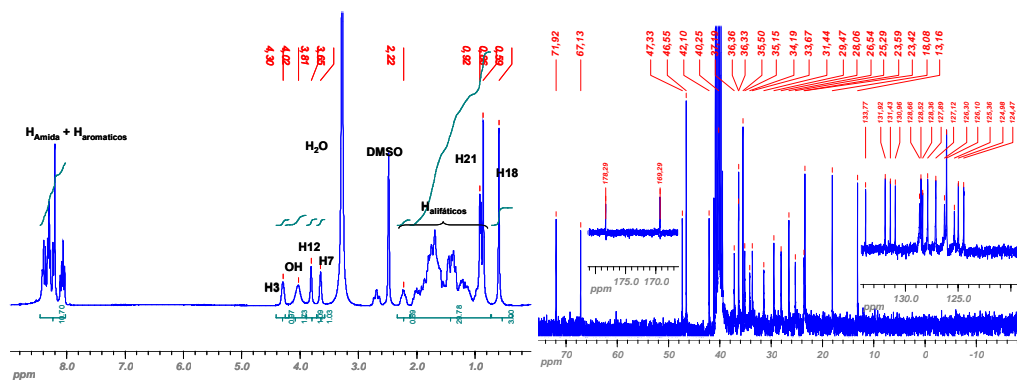


Figura A.23.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del ácido 3-pirenocólico. DMSO, 300MHz.

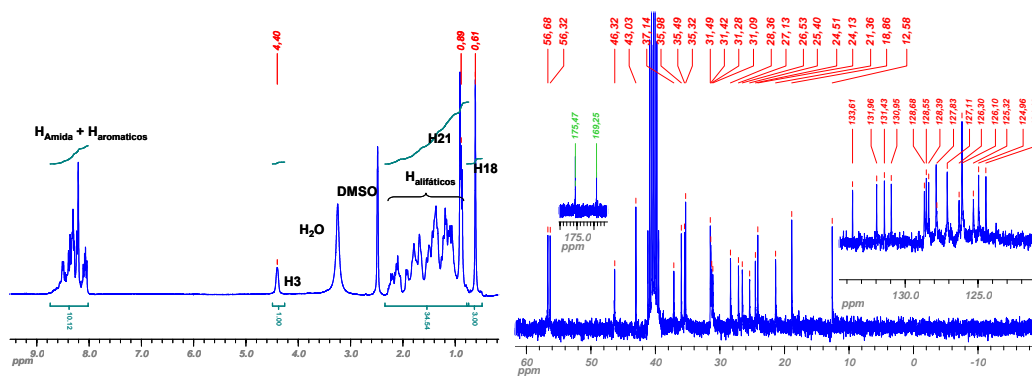


Figura A.24.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del ácido 3-pirenoliticólico. DMSO, 300MHz.

**Tabla A.3.-** Desplazamientos químicos de los monómeros colato-3-amino-succinato de sodio y colato-3-amino-benzoato de sodio. Desplazamientos en dimetilsulfóxido deuterado y D<sub>2</sub>O.

	colato-3-amino-succinico (DMSO)		colato-3-amino-succinato de sodio (D <sub>2</sub> O)		colato-3-amino-benzoato de sodio (D <sub>2</sub> O)	
	tipo	<sup>13</sup> C	tipo	<sup>13</sup> C	tipo	<sup>13</sup> C
1	CH <sub>2</sub>	31,20	CH <sub>2</sub>	33,21	CH <sub>2</sub>	33,75
2	CH <sub>2</sub>	25,18	CH <sub>2</sub>	26,29	CH <sub>2</sub>	26,72
3	CH	45,29	CH	49,07	CH	50,16
4	CH <sub>2</sub>	35,09	CH <sub>2</sub>	35,58	CH <sub>2</sub>	35,53
5	CH	37,07	CH	39,15	CH	49,62
6	CH <sub>2</sub>	34,13	CH <sub>2</sub>	36,43	CH <sub>2</sub>	36,42
7	CH		CH	71,65	CH	71,41
8	CH	40,13	CH	41,86	CH	41,94
9	CH	23,78	CH	28,85	CH	28,92
10	C	35,40	C		C	37,74
11	CH <sub>2</sub>	29,39	CH <sub>2</sub>	30,67	CH <sub>2</sub>	30,76
12	CH		CH	76,44	CH	76,22
13	C	46,53	C	49,07	C	49,06
14	CH	42,08	CH	44,63	CH	44,51
15	CH <sub>2</sub>	23,44	CH <sub>2</sub>	25,76	CH <sub>2</sub>	25,82
16	CH <sub>2</sub>	27,89	CH <sub>2</sub>	30,14	CH <sub>2</sub>	30,16
17	CH	46,84	CH	49,82	CH	39,82
18	CH <sub>3</sub>	13,02	CH <sub>3</sub>	14,85	CH <sub>3</sub>	15,03
19	CH <sub>3</sub>	23,44	CH <sub>3</sub>	25,27	CH <sub>3</sub>	25,60
20	CH	35,67	CH	38,22	CH	38,31
21	CH <sub>3</sub>	17,63	CH <sub>3</sub>	19,68	CH <sub>3</sub>	19,74
22	CH <sub>2</sub>	31,56	CH <sub>2</sub>	35,30	CH <sub>2</sub>	35,32
23	CH <sub>2</sub>	31,52	CH <sub>2</sub>	37,64	CH <sub>2</sub>	37,54
24	C		C	187,62	C	187,63
	<u>-CH<sub>2</sub>COO</u> <sup>-</sup>	<u>-CH<sub>2</sub>CONH</u> -	<u>-COONa</u>	<u>-CONH</u> -	<u>-CHCOO</u> <sup>-</sup> 142,52	<u>-COONa</u> 177,32
	35,81	36,32	184,16	178,24	<u>-CHCONH</u> - 139,39	<u>-CONH</u> - 173,19
	<i>grupo succinil en posición 3</i>				<i>grupo tereftalato en posición 3</i>	

**Tabla A.3.-** Desplazamientos químicos de los monómeros ácido 3-pirenocólico y ácido 3-pirenolitocólico. Desplazamientos en dimetilsulfóxido deuterado. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

	ácido 3-pirenocólico		ácido 3-pirenolitocólico	
	tipo	<sup>13</sup> C	tipo	<sup>13</sup> C
1	CH <sub>2</sub>	35,14	CH <sub>2</sub>	31,28
2	CH <sub>2</sub>	25,31	CH <sub>2</sub>	25,40
3	CH	46,60	CH	46,32
4	CH <sub>2</sub>	31,41	CH <sub>2</sub>	31,09
5	CH	37,18	CH	37,14
6	CH <sub>2</sub>	34,19	CH <sub>2</sub>	27,13
7	CH <sub>2</sub>		CH <sub>2</sub>	26,53
8	CH	40,19	CH	35,98
9	CH	26,55	CH	40,05
10	C	35,49	C	
11	CH <sub>2</sub>	29,44	CH <sub>2</sub>	21,36
12	CH <sub>2</sub>		CH <sub>2</sub>	40,37
13	C	46,58	C	
14	CH	42,13	CH	56,68
15	CH <sub>2</sub>	23,51	CH <sub>2</sub>	24,51
16	CH <sub>2</sub>	27,93	CH <sub>2</sub>	28,36
17	CH	46,88	CH	56,31
18	CH <sub>3</sub>	13,04	CH <sub>3</sub>	12,58
19	CH <sub>3</sub>	23,41	CH <sub>3</sub>	24,13
20	CH	35,71	CH	35,49
21	CH <sub>3</sub>	17,70	CH <sub>3</sub>	18,86
22	CH <sub>2</sub>	31,61	CH <sub>2</sub>	31,49
23	CH <sub>2</sub>	31,56	CH <sub>2</sub>	31,42
24	C		C	

## A.6.- SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DÍMEROS DE ÁCIDOS BILIARES UNIDOS MEDIANTE UN PUENTE DE AEDT

- *d-2C<sub>3</sub>-AEDT*
- *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT*

### A.6.a.- Síntesis y purificación del *d-2C<sub>3</sub>-AEDT*

Se disuelven 1,0 gramos (3,1 milimoles) del puente bidentado derivado del ácido etilendiaminotetraacético en aproximadamente 10 mL de DMF seca. A continuación se añaden 1,1 mL de DEPC y se agita a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se añaden 3,0 gramos (7,1 milimoles) de 3-β-aminocolato de metilo disueltos en 5 mL de DMF seco y 2,2 mL de trietilamina. Se deja agitando durante 30 minutos a 0°C y finalmente 24 horas a temperatura ambiente. El producto así obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla 9:1 acetato de etilo:metanol. Aislado el producto ya puro, se hidrolizan los dos grupos ésteres que se encuentran en la posición 24 del esteroide en una reacción a reflujo con una disolución de KOH 1M en metanol. Terminada la reacción se precipita el dímero añadiendo HCl concentrado y se lava con agua hasta pH 5-6. Finalmente, sobre el dímero ácido se añade la cantidad equivalente de NaOH para hidrolizar los cuatro grupos ácidos y posteriormente se precipita con acetona (véase la *figura A.25*). El rendimiento fue del 73%.

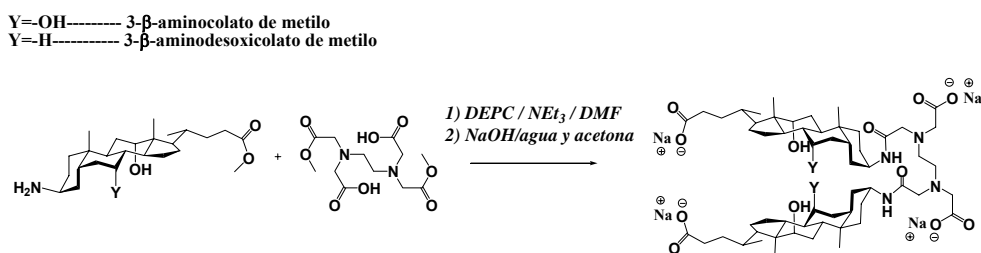


Figura A.25.- Ruta sintética de los dímeros *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* y *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT*.

### A.6.b.- Síntesis y purificación del *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT*

El esquema de síntesis puede verse en la *figura A.25*; el procedimiento es el mismo que el que se describe en el apartado anterior. El producto final se

## Apéndice A

purifica en cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla 9:1 acetato de etilo: metanol. El rendimiento de la reacción es del 78%.

### A.6.c.- Caracterización espectral. Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ resueltos

Los dos dímeros derivados han sido caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear. A continuación aparecen representados los espectros monodimensionales  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ; y en la *tabla A.4* pueden verse los desplazamientos de las señales de  $^{13}\text{C}$  correspondientes al grupo esteroide y al puente AEDT en DMSO.

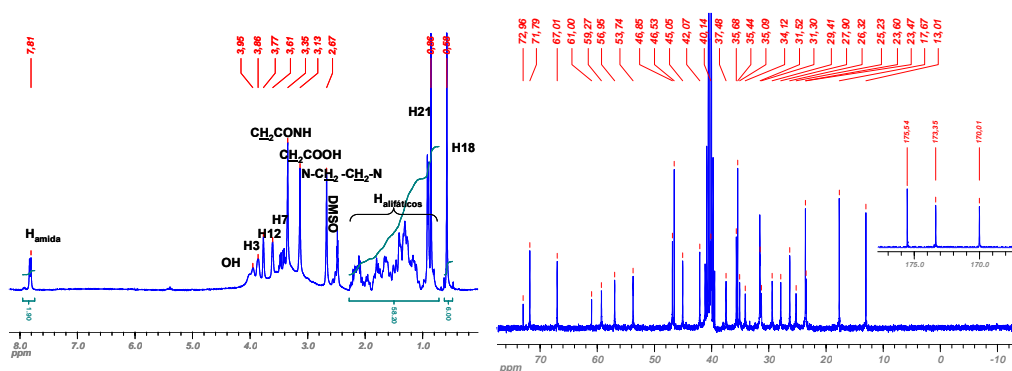


Figura A.26.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del  $d\text{-}2\text{C}_3\text{-AEDT}$ . DMSO, 300MHz.

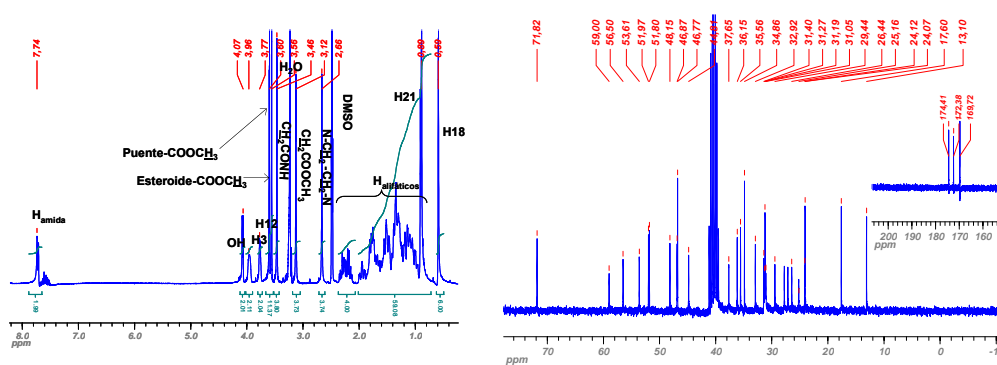


Figura A.27.- Espectros del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del  $d\text{-}2\text{DC}_3\text{-AEDT}$  (diéster). DMSO, 300 MHz.

**Tabla A.4.-** Desplazamientos químicos de los dímeros *d-2C<sub>3</sub>-AEDT* y *d-2DC<sub>3</sub>-AEDT* (diéster). Desplazamientos en dimetilsulfóxido deuterado. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

	<i>d-2C<sub>3</sub>-AEDT</i> (DMSO)		<i>d-2DC<sub>3</sub>-AEDT</i> <sub>diéster</sub> (DMSO)	
	tipo	<sup>13</sup> C	tipo	<sup>13</sup> C
1	CH <sub>2</sub>	31,30	CH <sub>2</sub>	31,26
2	CH <sub>2</sub>	25,23	CH <sub>2</sub>	25,20
3	CH	45,05	CH	44,81
4	CH <sub>2</sub>	35,09	CH <sub>2</sub>	31,40
5	CH	37,48	CH	32,92
6	CH <sub>2</sub>	34,12	CH <sub>2</sub>	27,77
7	CH	67,00	CH <sub>2</sub>	26,44
8	CH	40,14	CH	37,65
9	CH	26,32	CH	35,56
10	C	35,44	C	34,86
11	CH <sub>2</sub>	29,41	CH <sub>2</sub>	29,44
12	CH	71,79	CH	71,82
13	C	46,53	C	46,77
14	CH	42,07	CH	46,87
15	CH <sub>2</sub>	23,47	CH <sub>2</sub>	24,12
16	CH <sub>2</sub>	27,90	CH <sub>2</sub>	27,13
17	CH	46,85	CH	48,14
18	CH <sub>3</sub>	13,01	CH <sub>3</sub>	13,11
19	CH <sub>3</sub>	23,60	CH <sub>3</sub>	24,07
20	CH	35,68	CH	36,15
21	CH <sub>3</sub>	17,67	CH <sub>3</sub>	17,61
22	CH <sub>2</sub>	31,52	CH <sub>2</sub>	31,05
23	CH <sub>2</sub>	31,57	CH <sub>2</sub>	31,19
24	C	175,54	C	174,41
		-CH <sub>2</sub> COOH 56,95		-CH <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub> 56,50
	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N-	-CH <sub>2</sub> CONH- 59,27	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N-	-CH <sub>2</sub> CONH- 58,99
	53,74	-COOH 170,01	53,61	-COOCH <sub>3</sub> 169,71
		-CONH 173,35		-CONH 172,37
	<b>PUENTE AEDT</b>		<b>PUENTE AEDT</b>	

### A.7.- SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *GEMINI* DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES

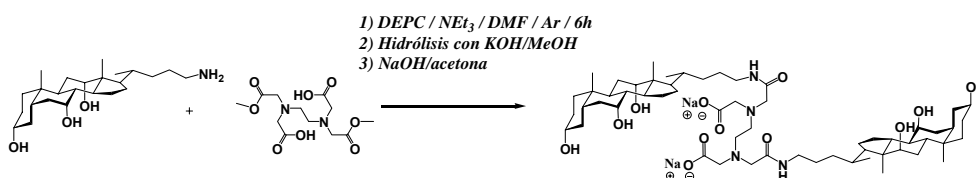
- N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(2-((3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)-2-oxoetilglicina] (*g-2C<sub>24</sub>-AEDT*)
- N,N'-1,2-etanodiilbis[N-(2-((3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)-2-oxoetilglicina] (*g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*)
- Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 12 $\alpha$ )-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-benzenodicarboxílico (*g-2DC<sub>24</sub>-PIR*)
- Ácido 2,5-bis[(((3 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-benzenodicarboxílico (*g-2C<sub>24</sub>-PIR*)

#### A.7.a.- Síntesis y purificación del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*

En un balón de fondo redondo provisto de barra agitadora se pesan 0,60 gramos del puente bidentado derivado del ácido etilendiaminotetraacético (1,87 milimoles) y se disuelven en 6 mL de DMF seca y 10 mL de THF seco. Una vez disuelto el sólido en suspensión se adicionan 0,65 mL de DEPC (4,28 milimoles). Mientras, en otro balón se pesan 1,55 gramos de 24-aminocolato (3,94 milimoles), y se disuelven en 8 mL de DMF seca y 7 mL de THF seco (pues la amina del colato no es muy soluble en THF). Una vez disuelta la amina se añaden 0,6 mL de trietilamina (4,30 milimoles). Transcurridos aproximadamente 30 minutos desde la adición del DEPC sobre el diéster del anhídrido se enfría en un baño de agua-hielo a 0°C y se añade la disolución de la amina lentamente con una jeringa de vidrio. El baño de agua-hielo se retira a los 90 minutos y se deja que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 6 horas. Finalizada la reacción, se evapora la DMF lo máximo posible y sobre el crudo de reacción se realiza un proceso de extracción. Se añaden 200 mL de cloroformo, y se realizan dos extracciones con 50 mL de agua. Se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro y se concentra finalmente hasta sequedad. El objetivo de los procesos de extracción es la eliminación total de la DMF. Finalmente, el producto de reacción se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se purifica en una columna cromatográfica, acetato de etilo: metanol 7:3. El *gemi* sintetizado tiene un R<sub>f</sub> de 0,41, mientras que el de la amina de partida es de 0,06 en esta mezcla de disolventes, por ello es muy conveniente para su purificación en columna. El rendimiento de la reacción fue del 40%.

El paso siguiente es la reacción de desesterificación en una disolución de potasa 1 M en metanol a reflujo durante una hora a 80°C. Una vez finalizada la

reacción, se concentra a sequedad y se disuelve en 200-300 mL de agua. Se añade ácido clorhídrico concentrado hasta pH próximo a uno. Se deja en refrigerante tres horas hasta que se forma una buena cantidad de precipitado, se filtra, se lava hasta pH 6-7 y finalmente se seca en estufa a vacío. Este compuesto es más interesante en forma de sal disódica; para ello, debemos disolver el compuesto en una cantidad de NaOH equivalente y disuelta en la menor cantidad de agua posible para conseguir un buen rendimiento. Posteriormente se filtra si fuera necesario, y se precipita en acetona (véase la *figura A.28*).



**Figura A.28.-** Ruta sintética del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT*.

#### A.7.b.- Síntesis y purificación del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*

En un balón de fondo redondo se pesan 0,61 gramos del puente bidentado derivado del ácido etilendiaminotetraacético en forma diéster (1,90 milimoles) y se disuelven en 5 mL de DMF seca y 15 mL de THF seco. Una vez disuelto el sólido en suspensión se añaden 0,65 mL de DEPC (4,28 milimoles); mientras, en otro balón se pesan 1,51 gramos del 24-aminodesoxicolato (4,00 milimoles) que se disuelven en 20 mL de THF seco. Una vez disuelta la amina se añaden 0,6 mL de trietilamina (4,30 milimoles). Transcurridos aproximadamente 30 minutos desde la adición del DEPC sobre el diéster del anhídrido, se enfría el balón de reacción en un baño de agua-hielo a 0°C y se añade la disolución de la amina lentamente con una jeringa de vidrio. El baño de agua-hielo se retira a los 90 minutos y se espera a que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 6 horas (se sigue por cromatografía en capa fina). Finalizada la reacción, se evapora la DMF lo máximo posible y sobre el crudo de reacción se realiza un proceso de extracción: se añaden aproximadamente 200 mL de cloroformo, y se realizan dos extracciones con 50 mL de agua. Se seca la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra finalmente en rotavapor hasta sequedad. El objetivo de los procesos de extracción es la

## Apéndice A

eliminación total de la DMF. Finalmente, el producto de reacción se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se purifica en una columna cromatográfica con acetato de etilo: metanol 7:3. El dímero sintetizado tiene un  $R_f$  de 0,51, mientras que la amina de partida sale con un  $R_f$  de 0,08 en esta mezcla de disolventes, por ello es muy conveniente para su purificación en columna. El rendimiento de la reacción es del 45%.

El paso siguiente es la hidrólisis de los dos grupos ésteres del *gemini* en una disolución de KOH 1 M en metanol a reflujo durante una hora a 80°C. Una vez terminada la reacción de desesterificación de los dos grupos ésteres se concentra a sequedad y se disuelve en aproximadamente 200-300 mL de agua y se añade HCl concentrado hasta pH próximo a uno. Se pone a baja temperatura tres horas hasta que se forma una buena cantidad de precipitado, se filtra y se lava hasta conseguir un pH~6. Finalmente se seca en una estufa a vacío toda la noche. Para trabajar con este compuesto conviene pasarlo a su forma de sal disódica; para ello, debemos disolver el compuesto en la cantidad de NaOH correspondiente disuelta en la mínima cantidad de agua para conseguir un buen rendimiento. Posteriormente se filtra si fuera necesario, y se precipita en acetona, ver *figura A.29*.

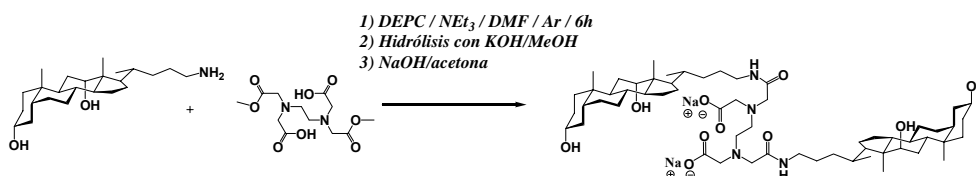


Figura A.29.- Ruta sintética del *g-2DC<sub>24</sub>-AEDT*.

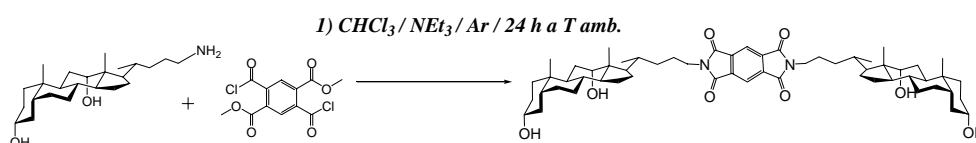
### A.7.c.- Síntesis y purificación del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*

El mecanismo de reacción de síntesis de este derivado de ácido biliar se puede entender en tres etapas:

**Etapa 1) Formación de una di-imida cíclica.**<sup>10-12</sup> Una disolución del 24-aminodesoxicolato (0,58 gramos; 1,53 milimoles) y trietilamina (3 mL; 40,80 milimoles) en 15 mL de cloroformo comercial se agita vigorosamente y se le agrega gota a gota y en baño agua-hielo a 5°C una disolución del compuesto que forma el puente *p*-diésterpiromielítico en forma de dicloruro (0,20 g; 0,627

milimoles) disuelto en 5 mL de cloroformo. Transcurrida la reacción (12 horas, seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina, acetato de etilo: metanol 9:1, revelado con ácido fosfomolibdico), el cloroformo se evapora y el precipitado se purifica en columna cromatográfica de silicagel utilizando la misma mezcla de disolventes. Dicha mezcla es conveniente para su purificación ya que el producto de reacción y la amina de partida presentan valores de  $R_f$  muy diferentes en la misma, 0,05 y 0,42 respectivamente. El rendimiento de esta reacción fue del 35%.

A pesar de separar el *p*-diésterpiromielítico del *m*-diésterpiromielítico tal y como se describe en el apartado A.2 de este mismo apéndice, una caracterización completa del producto final de esta reacción nos indica que no ha sido posible la obtención del dímero de esteroide *para* y *meta* por separado. Se obtuvo una mezcla racémica de aproximadamente ambos *gemini* al 50% no siendo posible su separación mediante comatografía de columna. Al analizar los espectros de IR, masas y RMN se puede observar que cuando tiene lugar la reacción entre el puente piromielítico y la amina se forma una di-imida cíclica en lugar del diéster esperado tal y como puede verse en el mecanismo propuesto en la figura A.30. El espectro del IR muestra la presencia de una señal muy pronunciada a  $1712\text{ cm}^{-1}$  y otra menos intensa a  $1770\text{ cm}^{-1}$ , bandas características de las imidas (figura A.31), en el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la figura A.32 no aparece la señal correspondiente a la amida, en el caso de que se obtuviera el diéster y no la di-imida y en el espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  tampoco se encuentran las señales correspondientes a los dos grupos  $-\text{OCH}_3$ , ver figura A.32.

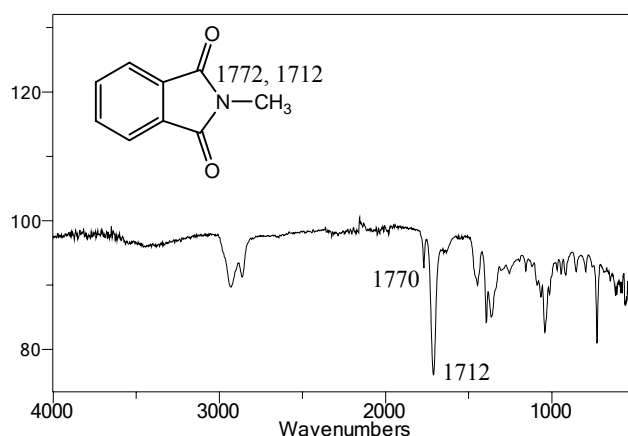


**Figura A.30.-** Ruta sintética de obtención de la 24-di-imida del desoxicolato.

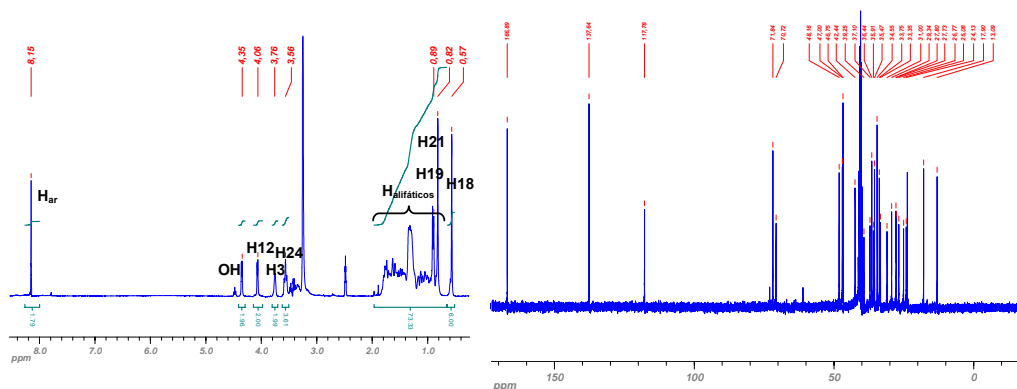
**Etapa 2) Apertura de la di-imida cíclica en medio básico.** En un balón de fondo redondo de 50 mL se pesan 0,80 gramos de la 24-di-imida del desoxicolato (0,80 milimoles) y se añaden 25 mL de una disolución de potasa 1M en metanol. Se calienta a reflujo a  $80^\circ\text{C}$  durante aproximadamente una hora (ver figura A.33). Cuando la reacción ha finalizado, se concentra a sequedad y se disuelve en 200-300 mL de agua y se añade ácido clorhídrico concentrado hasta  $\text{pH}\sim 1$ . Se deja en

**Apéndice A**

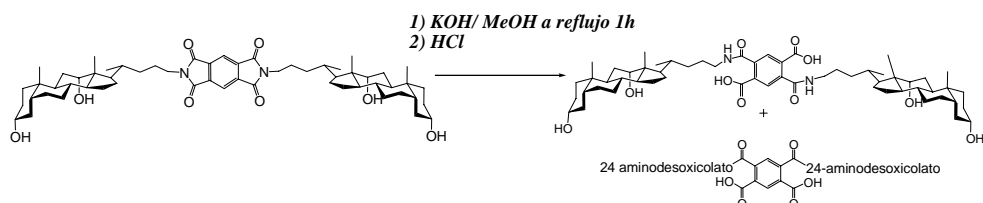
refrigerante durante tres horas hasta la formación de un precipitado. Se filtra y se lava con abundante cantidad de agua hasta que el pH sea aproximadamente 5. Finalmente se seca en estufa a vacío. El rendimiento de la reacción es del 84% y como ya se ha dicho anteriormente se obtiene una mezcla de los dos isómeros.



**Figura A.31.-** Espectro IR de la 24-di-imida del desoxicolato en  $\text{cm}^{-1}$ .

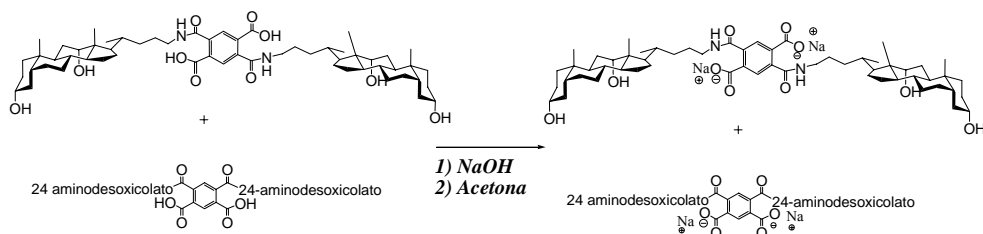


**Figura A.32.-** Espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 24-di-imida del desoxicolato en DMSO.



**Figura A.33.-** Ruta sintética del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* como mezcla en *para* y *meta*.

**Etapa 3) Formación de la sal disódica.** En la última etapa obtenemos el compuesto en forma de sal disódica, *figura A.34*. Para hidrolizar dos grupos ácidos se añade el doble de moles de NaOH que de compuesto en la mínima cantidad de agua (cuanto menor será la cantidad de agua añadida mejor será el rendimiento de la reacción). Una vez hidrolizados se añade acetona sobre la disolución para que precipite la sal. Se deja evaporarla acetona lentamente y se va añadiendo acetona nueva. El sólido formado se filtra y se pasa a un recipiente de vidrio cerrado. El rendimiento de este último proceso fue muy elevado, del 91%. Gracias a la evaporación lenta del disolvente se obtuvo una mayor cantidad y mejor calidad del precipitado.

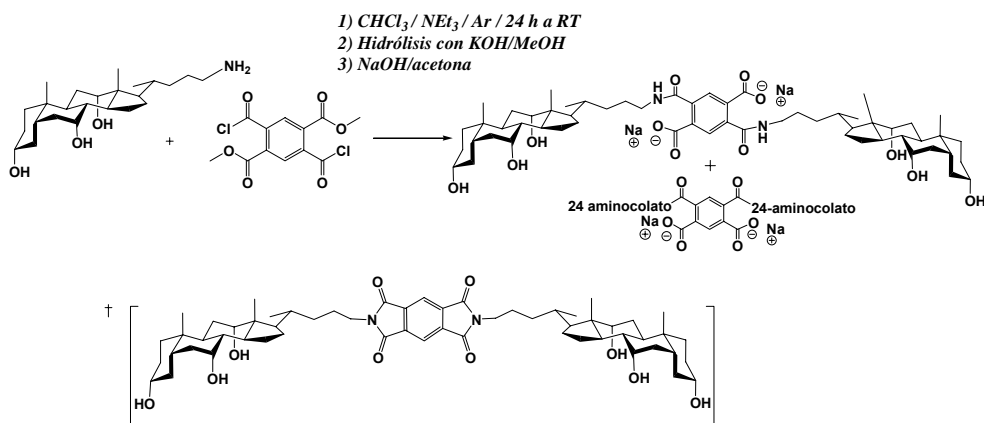


**Figura A.34.-** Ruta sintética de la sal disódica del *g-2DC<sub>24</sub>-PIR* como mezcla en *para* y *meta*.

#### A.7.d.- Síntesis y purificación del *g-2C<sub>24</sub>-PIR*

Del mismo modo que para el *g-2DC<sub>24</sub>-PIR*, la reacción tiene lugar a través de una di-imida cíclica, y por ello en la última etapa de reacción se obtienen los dos

isómeros a pesar de partir del puente *p*-diésterpiromielítico (véase la *figura A.35*). 1,44 milimoles (0,46 gramos) de puente piromielítico en posición *para* se disuelven en 12 mL de cloroformo seco y se añaden gota a gota y lentamente sobre otro balón donde hemos pesado la cantidad necesaria del 24-aminocolato, 3,60 milimoles (1,42 gramos, un exceso de 2,5 veces) en 30 mL de cloroformo seco y 10 mL de DMF (no es muy soluble en cloroformo). La mezcla de reacción se mantiene a 0°C hasta la completa disolución de todos los componentes y se añaden 7,5 mL de trietilamina. Se observa que la reacción está teniendo lugar por el desprendimiento de cloruro de ácido, intenso en los primeros minutos de reacción. Se deja transcurrir la reacción durante 6 horas, se concentra a sequedad y se seca en una estufa a vacío. Se purifica mediante cromatografía en columna con una mezcla 9:1 acetato de etilo:metanol ( $R_f$  de 0,23). El último paso es la obtención del dímero en forma de sal disódica que se explica en la etapa 3 del apartado anterior. El rendimiento de esta reacción fue bastante bajo, aproximadamente un 20%, y teniendo en cuenta que la formación de la imida es inevitable siendo también imposible la separación de los dos isómeros *para* y *meta*, se decidió sintetizar este nuevo *gemini* directamente a partir del anhídrido piromielítico cristalizado. Para ello se disolvieron 0,25 gramos (1,1 milimoles) en 10 mL de DMF. A continuación se añadió en frío una disolución de 1 gramo del 24-aminocolato (2,4 milimoles) en 5 mL de DMF y 1,5 mL de trietilamina. La reacción se dejó transcurrir durante 24 horas. De esta forma se obtuvo igualmente una mezcla de los dos isómeros pero con un mayor rendimiento, 65%, ver *figura A.36*.



**Figura A.35.-** Ruta sintética de la sal disódica del *g*-2C<sub>24</sub>-PIR como mezcla racémica a partir del *p*-diésterpiromielítico.

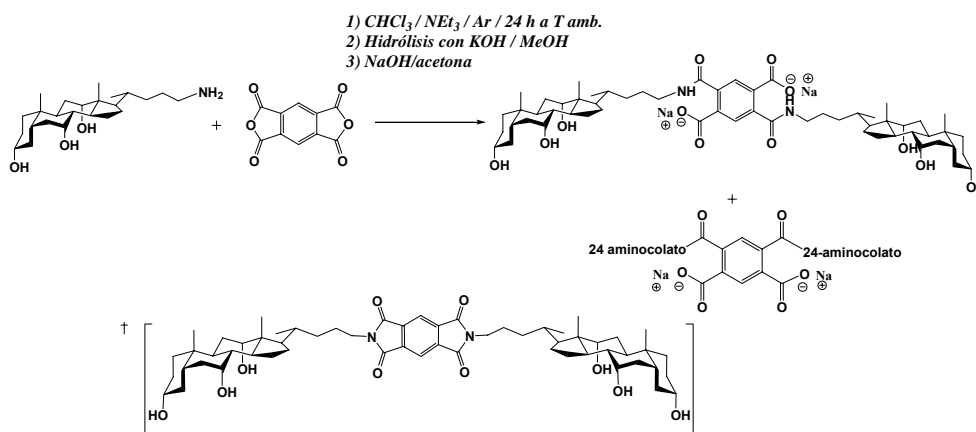


Figura A.36.- Ruta sintética de la sal disódica del *g-2C<sub>24</sub>-PIR* como mezcla racémica. La reacción tiene lugar a partir del anhídrido piromelítico.

### A.7.e.- Caracterización espectral. Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ resueltos

A continuación se pueden ver los espectros monodimensionales  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en DMSO para los cuatro *gemini* sintetizados. En la *tabla A.5* aparecen los desplazamientos de las señales  $^{13}\text{C}$ .

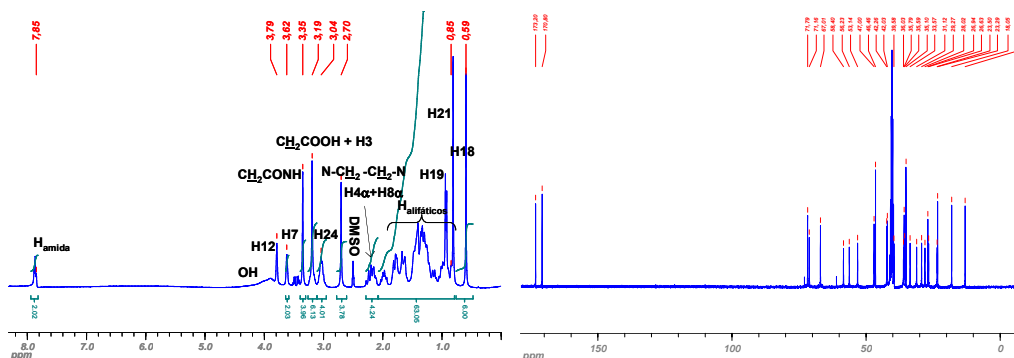


Figura A.37- Espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN del *g-2C<sub>24</sub>-AEDT* en DMSO. 300 MHz.

Apéndice A

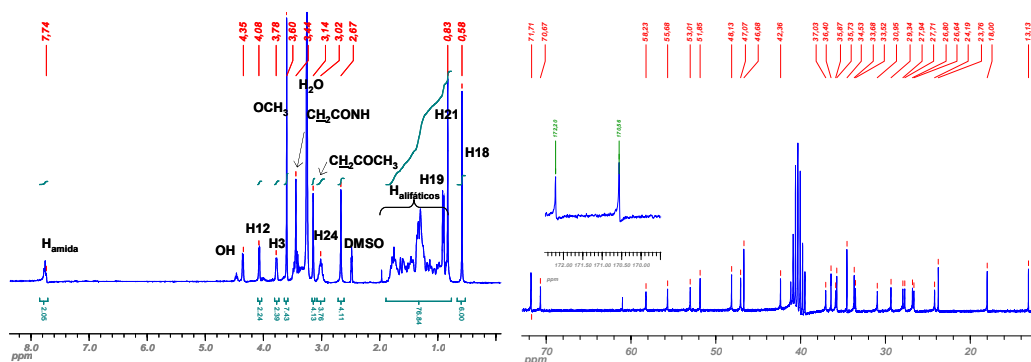


Figura A.38.- Espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN del  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-AEDT}$  (diéster) en DMSO. 300MHz.

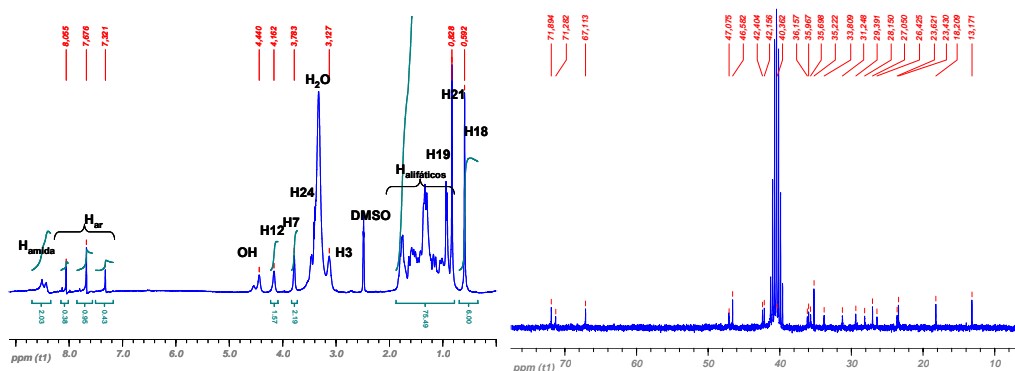


Figura A.39.- Espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN del  $g\text{-}2\text{C}_{24}\text{-PIR}$  en DMSO. 300MHz.

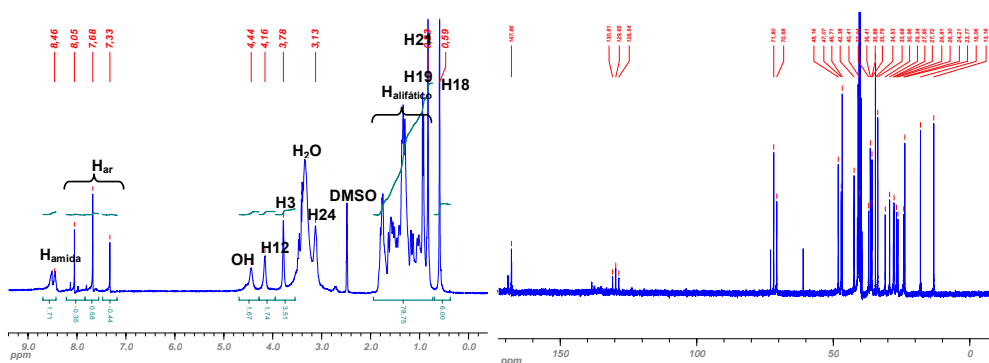


Figura A.40.- Espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN del  $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$  en DMSO. 300 MHz.

Tabla A.5.- Desplazamientos químicos de los *gemini* sintetizados. Desplazamientos en dimetilsulfóxido deuterado.

	di-imida del desoxicolato		di-imida del colato		$g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$		$g\text{-}2\text{C}_{24}\text{-PIR}$		$g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-AEDT}$ (diéster)		$g\text{-}2\text{C}_{24}\text{-AEDT}$	
	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$	tipo	$^{13}\text{C}$
1	CH <sub>2</sub>	35,47	CH <sub>2</sub>	36,02	CH <sub>2</sub>	35,79	CH <sub>2</sub>	36,11	CH <sub>2</sub>	35,87	CH <sub>2</sub>	36,03
2	CH <sub>2</sub>	31,00	CH <sub>2</sub>	31,12	CH <sub>2</sub>	30,96	CH <sub>2</sub>	31,18	CH <sub>2</sub>	30,95	CH <sub>2</sub>	31,12
3	CH	70,72	CH	71,15	CH	70,68	CH	71,29	CH	70,67	CH	71,16
4	CH <sub>2</sub>	36,44	CH <sub>2</sub>	40,28	CH <sub>2</sub>	36,41	CH <sub>2</sub>	40,50	CH <sub>2</sub>	37,03	CH <sub>2</sub>	40,25
5	CH	42,44	CH	42,26	CH	42,38	CH	42,36	CH	42,36	CH	42,26
6	CH <sub>2</sub>	27,73	CH <sub>2</sub>	35,57	CH <sub>2</sub>	27,72	CH <sub>2</sub>	35,65	CH <sub>2</sub>	27,71	CH <sub>2</sub>	35,59
7	CH <sub>2</sub>	26,77	CH	67,01	CH <sub>2</sub>	26,81	CH	67,01	CH <sub>2</sub>	26,80	CH	67,01
8	CH	37,10	CH	40,23	CH	37,04	CH	40,35	CH	36,40	CH	40,22
9	CH	33,75	CH	26,93	CH	33,68	CH	27,03	CH	33,68	CH	26,94
10	C	34,55	C	35,54	C	34,53	C	35,22	C	34,53	C	35,10
11	CH <sub>2</sub>	29,34	CH <sub>2</sub>	29,25	CH <sub>2</sub>	29,34	CH <sub>2</sub>	29,34	CH <sub>2</sub>	29,34	CH <sub>2</sub>	29,27
12	CH	71,84	CH	71,74	CH	71,80	CH	71,90	CH	71,71	CH <sub>2</sub>	71,79
13	C	46,75	C	46,42	C	46,71	C	46,58	C	46,68	C	46,46
14	CH	48,16	CH	42,04	CH	48,16	CH	42,13	CH	48,13	CH	42,03
15	CH <sub>2</sub>	24,13	CH <sub>2</sub>	23,44	CH <sub>2</sub>	24,21	CH <sub>2</sub>	23,62	CH <sub>2</sub>	24,19	CH <sub>2</sub>	23,50
16	CH <sub>2</sub>	27,80	CH <sub>2</sub>	27,91	CH <sub>2</sub>	27,95	CH <sub>2</sub>	28,14	CH <sub>2</sub>	27,94	CH <sub>2</sub>	28,02
17	CH	26,77	CH	46,78	CH	47,07	CH	47,10	CH	47,07	CH	47,00
18	CH <sub>3</sub>	13,09	CH <sub>3</sub>	13,00	CH <sub>3</sub>	13,16	CH <sub>3</sub>	13,17	CH <sub>3</sub>	13,13	CH <sub>3</sub>	13,04
19	CH <sub>3</sub>	23,70	CH <sub>3</sub>	23,30	CH <sub>3</sub>	23,77	CH <sub>3</sub>	23,43	CH <sub>3</sub>	23,76	CH <sub>3</sub>	23,29
20	CH	35,91	CH	35,53	CH	35,88	CH	35,94	CH	35,73	CH	35,79
21	CH <sub>3</sub>	17,90	CH <sub>3</sub>	17,91	CH <sub>3</sub>	18,06	CH <sub>3</sub>	18,21	CH <sub>3</sub>	18,00	CH <sub>3</sub>	18,05

Apéndice A

	di-imida del desoxicolato		di-imida del colato		<i>g-2DC<sub>2f</sub>-PIR</i>		<i>g-2C<sub>2f</sub>-PIR</i>		<i>g-2DC<sub>2f</sub>-AEDT</i> (diéster)		<i>g-2C<sub>2f</sub>-AEDT</i>	
22	CH <sub>2</sub>	33,35	CH <sub>2</sub>	33,35	CH <sub>2</sub>	33,68	CH <sub>2</sub>	33,77	CH <sub>2</sub>	33,52	CH <sub>2</sub>	33,57
23	CH <sub>2</sub>	25,08	CH <sub>2</sub>	25,00	CH <sub>2</sub>	26,30	CH <sub>2</sub>	26,43	CH <sub>2</sub>	26,64	CH <sub>2</sub>	26,63
24	CH <sub>2</sub>	39,25	CH <sub>2</sub>	39,07	CH <sub>2</sub>	40,41	CH <sub>2</sub>	40,36	CH <sub>2</sub>	39,50	CH <sub>2</sub>	39,58
<i>Señales correspondientes al puente piromielítico</i>						<i>punteo AEDT</i>						
<sup>13</sup> C	tipo	di-imida desoxicol.	di-imida colato	tipo	<i>g-2DC<sub>2f</sub>-PIR</i>	<i>g-2C<sub>2f</sub>-PIR</i>	tipo	<i>g-2C<sub>2f</sub>-AEDT</i> (diéster)	<i>g-2C<sub>2f</sub>-AEDT</i>			
a	CH <sub>ar</sub>	117,78	118,01	CH <sub>ar</sub>	<i>m-</i>	130,81	<i>nr</i>	-OCH <sub>3</sub>	51,85	-		
b	C <sub>ar</sub>	137,64	137,62		<i>p-</i>	129,66	<i>nr</i>	-N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N-	53,01	53,14		
c	C <sub>imida</sub>	166,89	167,00	C <sub>ar</sub>	<i>m-</i>	<i>nr</i> <sup>§</sup>	<i>nr</i>	-CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub>	55,68	-		
					<i>p-</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	-CH <sub>2</sub> -COOH	-	56,23		
					<i>p-</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	-CH <sub>2</sub> -CONH-	58,23	58,40		
§no resuelto				COOH/CONH-	<b>167,86</b>	<b>167,99</b>						

A.7.f.- Caracterización por Espectroscopia de Masas

Los cuatro *gemi* han sido caracterizados mediante espectroscopia de masas y en algunos casos también se obtuvo su composición por análisis elemental. Los resultados se muestran en la *tabla A.6*.

**Tabla A.6.**-Fórmula y composición elemental obtenida por Espectroscopia de Masas.

<i>Gemi</i>	Fórmula teórica	Fórmula experimental	Masa molecular teórica/g·mol <sup>-1</sup>	Masa molecular experimental/g·mol <sup>-1</sup>
<i>g-2C<sub>2f</sub>-AEDT</i>	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	1071,47	1071,76
<i>g-2DC<sub>2f</sub>-AEDT</i>	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub>	1039,47	1039,77
<i>g-2C<sub>2f</sub>-PIR</i>	C <sub>58</sub> H <sub>88</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>58</sub> H <sub>88</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	1005,32	1005,57
<i>g-2DC<sub>2f</sub>-PIR</i>	C <sub>58</sub> H <sub>88</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>58</sub> H <sub>88</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	972,64	973,46

## A.8- SÍNTESIS DE LOS EPÍMEROS DEL ÁCIDO QUENODESOXICÓLICO Y URSODESOXICÓLICO

El ácido quenodesoxicólico y ursodesoxicólico utilizados son productos comerciales de la casa Aldrich. Mientras que los isómeros derivados, se obtuvieron de acuerdo con el método de Thomas.<sup>13</sup> De modo que, 10,0 g (13 milimoles) del ursodesoxicolato de metilo (o del quenodesoxicolato de metilo) se disuelven en 120 mL de tolueno con 20 g (80 milimoles) de trifenilfosfina y 4 mL (10 milimoles) de ácido fórmico. A continuación se añade gota a gota y manteniendo constante la agitación una disolución recién preparada de dietilazodicarboxilato en tolueno (40%, 40 mL). La disolución resultante se calienta a 80°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se enfría a 25°C y se filtra la trifenilfosfina que queda en exceso. El filtrado se concentra en un rotavapor a sequedad y el crudo obtenido se refluja con 50 mL de una disolución de hidróxido potásico en etanol (5%) durante 3 horas. Posteriormente la disolución se enfría y se diluye en 200 mL de agua. A continuación la disolución se evapora hasta 100 mL, se filtra y se acidifica con ácido clorhídrico diluido en un baño de agua-hielo. El producto se filtra y se seca en una estufa a vacío a 60°C. Finalmente el producto se purifica por cromatografía en columna (eluyente 2:5 acetato de etilo: hexano). El rendimiento de esta reacción fue en los dos isómeros aproximadamente del 40%. Espectros NMR confirmaron la identidad de los mismos.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Eckelman, W. C.; Karesh, S. M.; Reba, R. C. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 704-6.
2. Wang, Y.-M.; Wang, Y.-J.; Wu, Y.-L. *Polyhedron* **1998**, *18*, 109-17.
3. Esterhuysen, C.; Bredenkamp, M. W.; van Kralingen, L.; Adendorff, H. J.; Jacobs, E. P.; Swart, P. *Acta Crystal.* **2006**, *E62*, 355-7.
4. Houlihan, F. M.; Bachman, B. J.; Wilkins, C. W. Jr.; Pryde, C. A. *Macromolecules* **1989**, *22*, 4477-83.
5. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 726-30.
6. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Mencini, E.; Guarneri, M.; Cavazzini, G.; Fini, A. *Arch. Pharm.* **1989**, *322*, 879-83.

*Apéndice A*

---

7. Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Uggeri, F. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 109-17.
8. Wisniewski, K.; Koldziejczyk, A. S.; Falkiewicz, B. *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 1-14.
9. Koehn, M.; Breinbauer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-16.
10. Huang, W.; Gao, L.; Zhang, X.; Xu, J.; Ding, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 1473-84.
11. Park, S. K.; Park, S. Y.; Lee, C. J. *Polymer* **1999**, *41*, 433-40.
12. Wu, Z.; Wu, D.; Qi, S.; Zhang, T.; Jin, R. *Thin Solid Films* **2005**, *493*, 179-84.
13. Thomas, H. G. *DE 1994-4443377*, **1996**.



*APÉNDICE B.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES*

---



## B.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La espectroscopia RMN<sup>1</sup> se ha convertido en el método más importante de elucidación estructural de componentes orgánicos, particularmente en disolución.

### B.1.a.- Fundamentos físicos<sup>2-4</sup>

Uno de los postulados fundamentales de la mecánica cuántica establece que, para una partícula aislada, el momento angular de la misma sólo puede tomar determinados valores discretos. Así, el momento angular total de una partícula P está cuantizado:

$$P = \hbar[R(R+1)]^{\frac{1}{2}} \quad [B.1]$$

donde el número cuántico de momento angular R toma valores positivos enteros o semienteros y  $\hbar$  es la constante reducida de Planck ( $h/2\pi$ ). Puesto que el momento angular de una partícula está cuantizado, la energía del sistema también lo está. De esta forma, cada estado energético de una partícula puede especificarse mediante los números cuánticos apropiados, teniendo además asociada una función de onda de estado estacionario (también llamada eigenfunción).

Aquellos estados que poseen diferente eigenfunción pero poseen la misma energía, se dice que son estados degenerados. Como veremos más adelante, este es el caso de los niveles de energía nuclear en ausencia de un campo magnético externo.

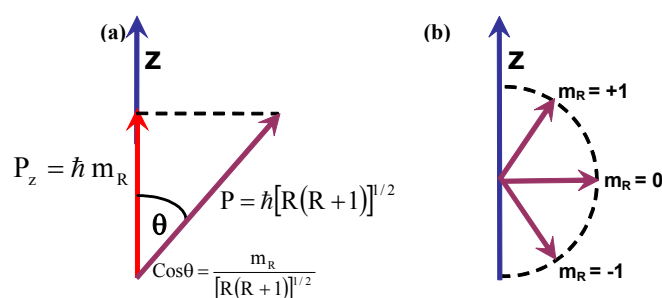
Para describir el momento angular de una partícula debemos especificar no sólo su magnitud (ecuación B.1) sino también su dirección, pues se trata de un parámetro vectorial. La dirección del vector momento angular también está cuantizada, caracterizándose por medio de un número cuántico de dirección de momento angular  $m_R$ , definido de tal forma que la proyección del momento angular sobre una dirección arbitraria z (componente  $P_z$ ) viene dada por la ecuación:

$$P_z = \hbar m_R \quad [B.2]$$

donde  $m_R$  toma valores desde  $-R$  hasta  $+R$  con  $\Delta m_R = \pm 1$ . Existen pues,  $2R+1$  valores posibles para el número cuántico  $m_R$  ( $R, R-1, R-2, \dots, -R$ ) que caracterizan a las  $2R+1$  proyecciones del vector P sobre la dirección z (*figura B.1*).

De las diferentes contribuciones individuales al momento angular total de un núcleo atómico, la teoría de la RMN se centra en la debida al espín nuclear. Los componentes del núcleo atómico (protón y neutrón) poseen un número cuántico de

espín cuyo valor es  $I=1/2$ . Para átomos diferentes al de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) los momentos angulares de los nucleones se acoplan entre sí, dando lugar a un número cuántico de espín nuclear  $I$ , que toma valores enteros o semienteros.



**Figura B.1.-** (a) Momento angular y su proyección en función de los números cuánticos  $R$  y  $m_R$ . (b) Posibles orientaciones del momento angular para  $R = 1$ .

En general, se pueden plantear los siguientes hechos relacionados con el espín nuclear:

- Los núcleos de masa impar tienen espín semientero; por ejemplo  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{19}\text{F}$ .
- Los núcleos de masa par y carga par tienen espín cero; por ejemplo  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  y  $^{32}\text{S}$ .
- Los núcleos de masa par y carga impar tienen espín entero; por ejemplo  $^{14}\text{N}$  y  $^2\text{H}$ .

En la *tabla B.1* se muestran los valores del espín nuclear de algunos núcleos utilizados en RMN, junto con otras propiedades magnéticas de los mismos.

En espectroscopia de RMN sólo pueden ser utilizados núcleos que poseen un valor de espín nuclear no nulo, por lo que el uso de isótopos como  $^{12}\text{C}$  o  $^{16}\text{O}$  está descartado. Por otro lado, aquellos núcleos que posean espín superior a  $1/2$  ( $^{14}\text{N}$  o  $^2\text{H}$ , por ejemplo) poseen un momento eléctrico cuadrupolar, lo que conlleva que la vida media de estos núcleos en estado excitado es muy corta, y como consecuencia del principio de incertidumbre, las líneas de absorción son generalmente muy débiles y difusas, por lo que dichos núcleos no suelen ser utilizados en RMN. De esta forma, la espectroscopia de RMN se restringe al uso de núcleos que poseen

**Apéndice B**

espín 1/2, siendo el protón  $^1\text{H}$  y el isótopo de carbono  $^{13}\text{C}$  los utilizados habitualmente.

La magnitud del vector momento angular de espín nuclear P viene dada por una expresión idéntica a la ecuación B.1:

$$P = \hbar[I(I+1)]^{\frac{1}{2}} \quad [\text{B.3}]$$

**Tabla B.1.-** Propiedades magnéticas de los núcleos más estudiados en RMN.

Núcleo	Espín	Abundancia natural %	Momento magnético $\mu \cdot \mu_N^{-1}$	Razón giromagnética $\gamma / 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Frecuencia $\Xi^*$
<b>Electrón</b>	1 / 2	-	-3,18392 $10^3$	-1,76084 $10^4$	6,582 $10^4$
<b>Neutrón</b>	1 / 2	-	-3,31362	-18,325	68,50
$^1\text{H}$	1 / 2	99,985	4,83724	26,7520	100,000
$^2\text{H}$	1	0,015	1,2126	4,1066	15,351
$^3\text{H}$	1 / 2	Radioactivo	5,1596	28,535	106,664
$^7\text{Li}$	3 / 2	92,58	4,20394	10,3975	38,866
$^{11}\text{B}$	3 / 2	80,42	3,4708	8,5843	32,089
$^{13}\text{C}$	1 / 2	1,108	1,2166	6,7283	25,145
$^{14}\text{N}$	1	99,63	0,57099	1,9338	7,228
$^{15}\text{N}$	1 / 2	0,37	-0,4903	-2,712	10,137
$^{17}\text{O}$	5 / 2	0,037	-2,2407	-3,6279	13,561
$^{19}\text{F}$	1 / 2	100	4,5532	25,181	94,094
$^{23}\text{Na}$	3 / 2	100	2,86265	7,08013	26,466
$^{27}\text{Al}$	5 / 2	100	4,3084	6,9760	26,077
$^{29}\text{Si}$	1 / 2	4,70	-0,96174	-5,3188	19,867
$^{31}\text{P}$	1 / 2	100	1,9602	10,841	40,481
$^{59}\text{Co}$	7 / 2	100	5,234	6,317	23,610
$^{113}\text{Cd}$	1 / 2	12,26	-1,0768	-5,9550	22,193
$^{119}\text{Sn}$	1 / 2	8,58	-1,8119	-10,021	37,291

\* $\Xi$  es una frecuencia calculada tomando como base 100MHz para la resonancia del protón.

estando definida la dirección de dicho vector por la proyección sobre un eje arbitrario  $z$ . Dicha proyección está cuantizada por el número cuántico  $m_l$ , denominado número cuántico magnético:

$$P_z = \hbar m_l \quad [B.4]$$

Según las leyes de Maxwell, toda partícula cargada en movimiento lleva asociado un campo magnético. Este fenómeno también está presente a nivel atómico, de tal manera que un núcleo y los electrones que lo rodean, llevan asociados su correspondiente momento magnético. Puesto que el momento angular de dichas partículas está cuantizado, el momento magnético también lo estará.

Considerando un electrón moviéndose a una velocidad angular  $\omega$ , el momento angular orbital  $P$  vendrá definido como:

$$P = m_e r^2 \omega \quad [B.5]$$

donde  $m_e$  es la masa del electrón y  $r$  es la distancia del mismo al núcleo. De esta forma, la corriente eléctrica generada por dicho electrón será:

$$i = \frac{e \omega}{2\pi} = \frac{e P}{2\pi m_e r^2} \quad [B.6]$$

Según la teoría electromagnética, el momento magnético asociado  $\mu$  será:

$$\mu = -A i \quad [B.7]$$

donde  $A$  es el área que delimita el orbital del electrón.

Si por simplicidad se considera que el electrón describe una órbita circular,  $A$  toma el valor  $\pi r^2$ , de tal forma que combinando las ecuaciones *B.6* y *B.7* se obtiene una expresión para el momento magnético asociado a  $P$ :

$$\mu = -\left(\frac{e}{2m_e}\right) P \quad [B.8]$$

(nótese que para el electrón,  $\mu$  y  $P$  son vectores antiparalelos.)

La simplificación de una órbita circular no es aceptable cuando se considera el espín del electrón, y por ello se introduce un factor de corrección denominado factor de Landé o factor  $g$ , transformándose la ecuación *B.8* en:

$$\mu = -g \left(\frac{e}{2m_e}\right) P = -\frac{g \mu_B}{\hbar} P \quad [B.9]$$

## Apéndice B

---

en la que  $\mu_B$  es el magnetón de Bóhr.

Es importante mencionar que los valores obtenidos experimentalmente para el factor  $g$  pueden ser explicados completamente mediante un tratamiento cuántico exhaustivo de la teoría de RMN.

Si en lugar de un electrón se considera un núcleo atómico, se puede realizar un tratamiento análogo, obteniéndose ecuaciones muy similares en las que se deben considerar la carga ( $Z \cdot e$ ) y masa ( $n \cdot m_p$ ) del núcleo en lugar de las del electrón. De esta forma se obtiene un momento magnético nuclear que cumple la condición:

$$\mu = \frac{g_N \mu_N}{\hbar} P \quad [B.10]$$

donde  $\mu_N$  es el magnetón nuclear y  $g_N$  es el factor  $g$  nuclear, que incluye los valores de  $Z$  y  $n$ . En este caso, la ecuación *B.10* no incluye de forma explícita un signo negativo (como ocurría en la ecuación *B.8*). Esto implica que el momento angular nuclear  $P$  y el momento magnético nuclear  $\mu$  pueden ser paralelos o antiparalelos, en función del signo de  $g_N$ .

Por comodidad, los momentos magnéticos nucleares se suelen expresar en función de una magnitud denominada razón giromagnética ( $\gamma$ ):

$$\mu = \gamma P \quad [B.11]$$

obteniéndose una expresión para  $\gamma$  por combinación de las ecuaciones *B.10* y *B.11*:

$$\gamma = \frac{g_N \mu_N}{\hbar} \quad [B.12]$$

Algunos valores de  $\gamma$  se encuentran en la *tabla B.1*.

La expresión del momento magnético nuclear se obtiene por combinación de las ecuaciones *B.3*, *B.10* y *B.11*:

$$\mu = g_N \mu_N [I(I+1)]^{\frac{1}{2}} = \gamma \hbar [I(I+1)]^{\frac{1}{2}} \quad [B.13]$$

En ausencia de campos magnéticos externos, la energía de una partícula que posee un momento magnético  $\mu$  es independiente de la orientación de la misma. Si esa partícula es sometida a la acción de un campo magnético externo  $B_0$ , aplicado a lo largo de una dirección arbitraria  $z$ , entonces la energía de la misma depende de la orientación relativa de dicha partícula respecto a la dirección del campo externo aplicado. De acuerdo con las leyes del electromagnetismo, la energía del sistema vendrá dada por la expresión:

$$E = -\mu_z B_0 \quad [B.14]$$

en donde  $\mu_z$  es la componente de  $\mu$  en la dirección de aplicación de  $B_0$  (dirección z).

Como ya se ha mencionado en el caso del espín nuclear, esta componente viene definida por el número cuántico magnético  $m_I$ , que toma valores desde  $-I$  hasta  $+I$  con  $\Delta I = \pm 1$ .

$$\mu_z = g_N \mu_N m_I = \gamma \hbar m_I \quad [B.15]$$

Por lo tanto, la ecuación *B.14* puede expresarse como:

$$E = -\gamma \hbar m_I B_0 \quad [B.16]$$

Es decir, la energía de la partícula bajo la acción de un campo magnético  $B_0$  está cuantizada, existiendo  $2I+1$  niveles de energía diferentes separados entre sí por:

$$\Delta E = |\gamma \hbar B_0| \quad [B.17]$$

Estos niveles de energía se denominan niveles energéticos de Zeeman y, en ausencia de campos magnéticos externos ( $B_0=0$ ), son estados degenerados. En presencia de un campo magnético externo estático ( $B_0$ ) se rompe esta degeneración de estados energéticos, siendo entonces posible inducir transiciones entre los mismos.

Esta es una de las diferencias fundamentales que existen entre la espectroscopia de RMN y otras espectroscopias como la Visible-UV o la IR, ya que en la primera se precisa de la existencia de un campo externo que rompa la degeneración inicial de los niveles energéticos.

Las transiciones entre los distintos niveles de energía ocurrirán cuando la energía de la radiación que las provoca, de frecuencia  $\nu$ , corresponda exactamente a la diferencia de energía de los niveles entre los que se produce la transición, esto es:

$$h\nu = |\gamma \hbar B_0 \Delta m_I| \quad [B.18]$$

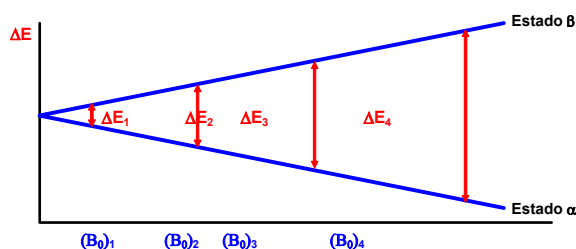
Esta ecuación expresa la denominada condición de resonancia de un núcleo en un campo magnético.

El valor de la frecuencia a la que se produce la resonancia de un átomo se obtiene despejando de la ecuación *B.18* y considerando que  $\Delta m_I = \pm 1$ :

$$\nu = \left| \left( \frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0 \right| \quad [B.19]$$

Considerando que los campos magnéticos externos que se suelen utilizar en RMN son generalmente del orden de 2 a 20 Teslas (20 a 200 kilogauss), los valores de las frecuencias de resonancia de los núcleos atómicos se encuentran localizadas en la banda de los MHz del espectro electromagnético.

Otra de las diferencias fundamentales entre la espectroscopia de RMN y otras espectroscopias como Visible-UV o IR radica en que para la RMN la condición de resonancia expresada mediante la ecuación B.18, se puede alcanzar de dos formas diferentes, pudiendo ser inducido un tránsito entre dos niveles de energía concretos variando la frecuencia de la radiación que provoca dicho tránsito ( $\nu$ ) o variando la intensidad del campo magnético externo aplicado ( $B_0$ ). Esto es consecuencia del hecho de que la diferencia de energía entre los diferentes niveles energéticos nucleares depende de un parámetro experimental como es la intensidad del campo magnético estático aplicado (*figura B.2*).



**Figura B.2.-** Variación de la distancia entre los niveles de Zeeman (para un núcleo con  $I = \frac{1}{2}$ ) en función del campo magnético estático aplicado.

Si la frecuencia de resonancia de un determinado núcleo atómico correspondiera exactamente a la expresada en la ecuación B.19, la técnica de RMN tendría poca aplicabilidad práctica ya que en dicha ecuación sólo aparecen reflejados dos parámetros experimentales: el campo magnético externo aplicado  $B_0$  (que es igual para todos los núcleos de una muestra) y la razón giromagnética  $\gamma$  (que es igual para un determinado tipo de núcleos, véase *tabla B.1*). De esta forma sólo podríamos detectar qué tipos de núcleos están presentes en la muestra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,

etc.).

Afortunadamente, existe un factor denominado apantallamiento electrónico, que introduce elementos diferenciadores entre los núcleos de la misma especie presentes en una molécula y que nos va a permitir distinguir unos de otros. Hasta ahora se han considerado los efectos que causa sobre una molécula el hecho de someterla a la acción de un campo magnético estático  $B_0$  (la molécula se magnetiza, se desdoblan sus niveles de energía nuclear, etc.), pero no hemos considerado que la muestra, en cierta manera, también produce una perturbación del campo magnético aplicado  $B_0$ . El momento angular de un núcleo atómico (y el de los electrones que le rodean), posee un movimiento de precesión alrededor de la dirección del eje de aplicación del campo externo (dirección  $z$ ). Este movimiento se conoce con el nombre de precesión de Larmor. Debido a dicho movimiento de precesión, en cada núcleo atómico se genera un campo magnético secundario que actúa en su conjunto a favor o en contra del campo aplicado. Para un núcleo atómico, este campo es normalmente muy pequeño. Pero en el caso de los electrones que rodean a esos núcleos, los efectos que causan sobre el campo magnético efectivo que actúa sobre el núcleo son importantes. Por ello, se debe considerar la magnetización de un núcleo desde dos puntos de vista diferentes.

Por un lado, existe un efecto global macroscópico que se debe a que toda la muestra en su conjunto es magnetizada al ser introducida en un campo magnético. Esta magnetización es proporcional a la intensidad del campo aplicado ( $B_0$ ), afectando a todos los núcleos por igual. De esta forma la muestra genera un campo magnético inducido que actúa reforzando o debilitando el campo externo aplicado. La constante que caracteriza esta magnetización global de la muestra se conoce como susceptibilidad magnética ( $\chi$ ). Se denominan sustancias diamagnéticas a aquellas que poseen una susceptibilidad magnética negativa ( $\chi < 0$ ). Así, la magnetización inducida en la muestra se opone al campo aplicado externamente, haciendo que el campo magnético efectivo que actúa sobre los núcleos sea inferior al aplicado. En general, este efecto es muy pequeño. Son sustancias paramagnéticas aquellas que poseen una susceptibilidad magnética positiva ( $\chi > 0$ ), y son especies que poseen átomos con electrones desapareados. Su efecto, que es mucho más notable que el producido por las sustancias diamagnéticas, es el de reforzar el campo aplicado exteriormente. Hay que indicar que el uso de sustancias paramagnéticas en RMN está altamente desaconsejado (sólo en determinadas ocasiones se realiza de forma explícita), ya que dichas sustancias interaccionan de forma muy intensa con los diferentes núcleos de la muestra por la acción de los electrones desapareados, provocando una relajación muy efectiva de dichos núcleos y una disminución de la intensidad de las señales de RMN.

## Apéndice B

Por otro lado, existe un efecto local microscópico que actúa sobre cada núcleo de forma individual y que es producido por los electrones que rodean a dicho núcleo. El movimiento de precesión de un núcleo atómico implica el consiguiente movimiento de los electrones que le rodean *figura B.3*, lo que genera una corriente eléctrica ( $i$ ) que lleva asociada su correspondiente campo magnético ( $B_i$ ). La velocidad angular de dicha corriente es:

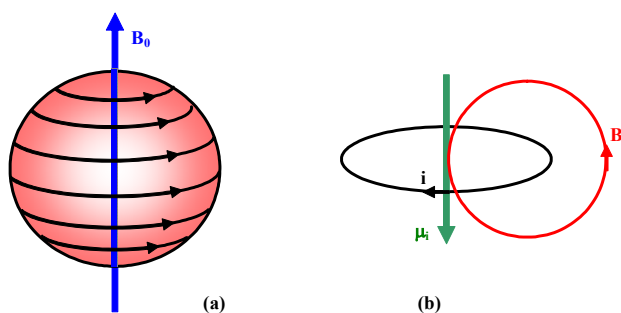
$$\omega_i = \left( \frac{e}{2m_e} \right) B_0 \quad [B.20]$$

El signo en la ecuación B.20 implica que la corriente inducida sigue el sentido de las agujas del reloj respecto al vector  $B_0$ , al revés que la rotación del momento magnético del núcleo  $\mu$ .

El momento magnético inducido  $\mu_i$  para un solo electrón a una distancia  $r$  del núcleo viene dado por la ecuación:

$$\mu_i = - \left( \frac{e^2}{4m_e} \right) r^2 B_0 \sin^2 \theta \quad [B.21]$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre los vectores  $r$  y  $B_0$ .



**Figura B.3.- (a)** Circulación de la nube de carga electrónica bajo la influencia de un campo magnético. **(b)** Campo magnético secundario inducido por la precesión.

El campo magnético total que actúa sobre el núcleo es el resultante del campo magnético aplicado  $B_0$  y del campo magnético inducido  $B_i$  que, como se puede observar en la *figura B.3*, son opuestos. Así el campo efectivo es menor que

el campo aplicado y por ello se dice que los electrones generan un apantallamiento del campo magnético aplicado sobre el núcleo atómico. Ese campo magnético efectivo que actúa sobre el núcleo viene definido según:

$$B_{\text{efectivo}} = B_0(1 - \sigma) \quad [\text{B.22}]$$

donde  $\sigma$  es un número adimensional denominado constante de apantallamiento electrónico, que suele utilizarse como un parámetro experimental ajustable (aunque es posible su estimación teórica).

Puesto que el campo magnético que actúa sobre un determinado núcleo atómico es  $B_{\text{efectivo}}$  y no el campo aplicado  $B_0$ , la frecuencia de resonancia de dicho núcleo será:

$$\nu_i = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0(1 - \sigma_i) \quad [\text{B.23}]$$

Así, podemos decir que la razón giromagnética  $\gamma$  es el término que nos permite distinguir entre núcleos de diferente naturaleza, y que la constante de apantallamiento  $\sigma_i$  es el término que nos permite distinguir entre núcleos de la misma naturaleza que estén situados en diferente entorno electrónico. Los valores de  $\sigma_i$  son normalmente muy pequeños, por lo que las diferencias entre las frecuencias de resonancia de núcleos de la misma especie se cuantificarán por números decimales de bastantes cifras significativas. En este punto, resulta conveniente definir un nuevo parámetro denominado desplazamiento químico, representado mediante el símbolo  $\delta$ , que no es más que una forma conveniente de expresar la frecuencia de resonancia de los núcleos.

Si consideramos la frecuencia  $\nu_0$  correspondiente al campo magnético aplicado dada por la expresión *B.19*, la ecuación *B.23* puede escribirse como:

$$\nu_i = \nu_0(1 - \sigma_i) \quad [\text{B.24}]$$

Se puede considerar ahora la diferencia entre la frecuencia de resonancia de un determinado núcleo (ecuación *B.24*) y la frecuencia del campo magnético aplicado exteriormente (ecuación *B.19*) obteniéndose así la expresión:

$$\Delta\nu = (\nu_i - \nu_0) = \nu_0(-\sigma_i) \quad [\text{B.25}]$$

valor que se divide por  $\nu_0$  y se multiplica por el factor  $10^6$  (expresando así  $\delta$  en ppm) para dar como resultado un número adimensional denominado desplazamiento químico:

$$\delta_i = \frac{\Delta\nu}{\nu_0} 10^6 = \frac{(\nu_i - \nu_0)}{\nu_0} 10^6 = -\sigma_i 10^6 \text{ ppm} \quad [\text{B.26}]$$

Tal y como se observa en la ecuación B.26, existe una dependencia del desplazamiento químico de un núcleo y la frecuencia del campo aplicado. De esta manera, el espectro de RMN que resultaría para una determinada sustancia sería diferente en función del equipo utilizado para obtenerlo. De ser esto así, los resultados obtenidos serían siempre relativos, no siendo comparables los realizados en diferentes equipos. Por ello, es necesario referenciar los espectros de RMN mediante el uso de sustancias patrón que nos sirvan para fijar una escala absoluta para los desplazamientos químicos.

Una sustancia que se quiera utilizar como estándar en RMN debe cumplir una serie de requisitos, que se detallan a continuación:

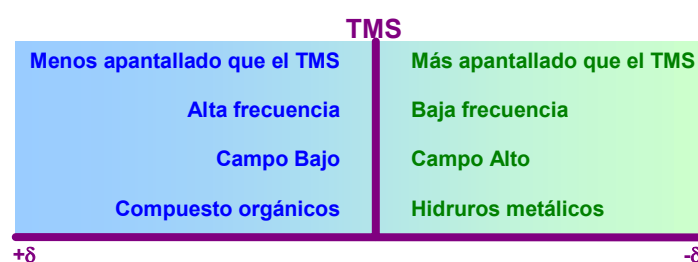
- Debe contener núcleos observables que sean magnéticamente idénticos, esto es, que den lugar a una única señal en el espectro de RMN.
- Debe poseer un número elevado de núcleos activos, de tal manera que dé lugar a señales intensas incluso estando presente en pequeñas cantidades.
- La resonancia de esos núcleos debe producirse en un lugar del espectro alejada de las señales producidas por la mayoría de los compuestos químicos (no debe superponerse con otras señales para evitar confusiones en la asignación).
- Debe ser un compuesto químicamente inerte, que no reaccione con la muestra ni afecte a la resonancia de la misma y que no sea polar.

Una sustancia que cumple con todos estos requisitos y que se acepta y emplea como estándar para  $^1\text{H}$  es el tetrametilsilano o TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ).

En RMN se pueden utilizar dos tipos de referencias:

- 1) *Referencia externa.* Una vez que se construye y monta un equipo de RMN, se procede a determinar experimentalmente el valor de  $\nu_0$ . Para ello, se toma una sustancia patrón (usualmente TMS), se realiza el espectro y a la señal que produce se le asigna, por definición, el valor de  $\delta = 0$  ppm. El uso de referencia externa es la práctica más habitual.
- 2) *Referencia interna.* En este caso se añade una pequeña cantidad de sustancia de referencia (normalmente un 5%) en cada medida, calibrando así el equipo cada vez que se utilice.

De esta manera, queda definida una escala absoluta para la obtención de espectros de RMN (escala  $\delta$ ), correspondiendo el valor 0 de la misma al TMS (por definición), y considerándose como valores de  $\delta$  positivos aquellos que correspondan a frecuencias de resonancia mayores que la del TMS y como valores de  $\delta$  negativos aquellos que correspondan a frecuencias de resonancia menores que la del TMS (véase la *figura B.4*).



**Figura B.4.-** Escala de desplazamientos químicos relativa al TMS, junto con algunos de los términos más utilizados para definir la zona positiva y negativa de dicha escala.

En esta nueva escala, la ecuación *B.26* se convierte en:

$$\delta_i = \frac{(v_i - v_{\text{TMS}})}{v_{\text{TMS}}} 10^6 \text{ ppm} \quad [\text{B.27}]$$

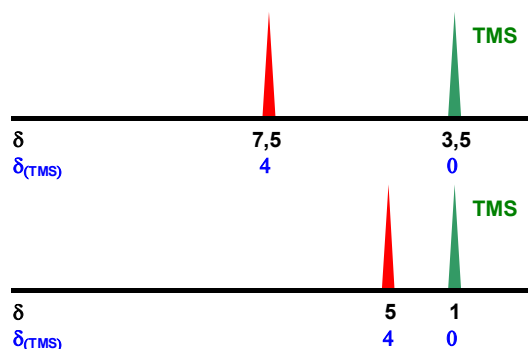
Utilizando esta ecuación, los valores de los desplazamientos químicos pasan a ser absolutos ya que la frecuencia de resonancia del núcleo observado y la frecuencia de resonancia del TMS se ven afectadas por igual cuando se cambia el campo magnético (véase la *figura B.5*).

Así, el desplazamiento químico de un núcleo cualquiera respecto al TMS será siempre el mismo, independientemente del equipo en el que haya sido obtenido el espectro de RMN (90 MHz, 300 MHz, 500 MHz, etc.). La ventaja de usar equipos de mayor campo magnético radica en que se logra una mayor separación relativa de las señales esto es, una mayor resolución del espectro. Aplicando las ecuaciones *B.25* y *B.27* al TMS puede obtenerse una nueva expresión de  $\delta$ :

$$\delta_i = (\sigma_{\text{TMS}} - \sigma_i) 10^6 \text{ ppm} \quad [\text{B.28}]$$

Esta expresión nos permite calcular las constantes de apantallamiento de diferentes núcleos atómicos una vez conocida la del TMS.

**Figura B.5.-** Espectro de RMN de un núcleo en un equipo de RMN con campo magnético intenso (arriba) y pequeño (abajo). La intensidad del campo afecta al valor absoluto de  $\delta_i$ , pero no a su valor relativo al TMS.



### B.1.b.- Acoplamiento espín-espín

En RMN, no se puede considerar a los diferentes núcleos activos como entes individuales ya que, normalmente, éstos interaccionan entre sí produciendo variaciones en las frecuencias de resonancia de los mismos. Es por ello por lo que, en este punto, vamos a analizar los diferentes tipos de interacciones que existen entre los núcleos atómicos.

En RMN se definen dos tipos de acoplamientos de naturaleza diferente entre espines nucleares. Por un lado existe un acoplamiento directo o dipolar, cuyo origen está en la naturaleza magnética de los núcleos y en las interacciones que existen entre dipolos magnéticos (los núcleos se comportan como pequeños imanes). Por otro lado, existe un acoplamiento indirecto o escalar, cuya explicación se encuentra en las leyes de la mecánica cuántica que rigen el emparejamiento paralelo o antiparalelo de los espines nucleares y/o electrónicos. Este tipo de acoplamiento origina un desdoblamiento de las señales en el espectro de RMN, dando lugar a una estructura hiperfina de las señales observadas.

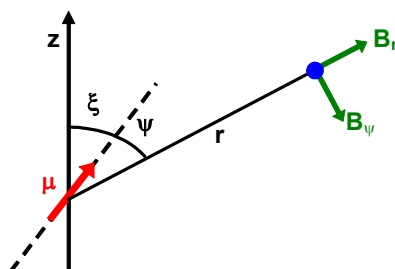
**Acoplamiento directo o bipolar.-** Un núcleo que posea espín nuclear no nulo, actúa como un pequeño imán generando un campo magnético local a su alrededor. Para un núcleo con momento magnético  $\mu$  que forma un ángulo  $\xi$  con la dirección

z (véase la *figura B.6*), el campo magnético que genera a una distancia r, vendrá dado por las ecuaciones:

$$B_r = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{2\mu}{r^3} \cos \psi \quad [B.29]$$

$$B_\psi = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\mu}{r^3} \sin \psi \quad [B.30]$$

en donde  $\mu_0$  es la constante de permeabilidad en el vacío ( $4\pi \times 10^{-7} \text{ kg m s}^{-2} \text{ A}^{-2}$ ).



**Figura B.6.-** Campo magnético local generado por un momento magnético nuclear.

Puesto que el momento magnético  $\mu$  precesa alrededor de su propio eje, una de las componentes del campo local (la que coincide con z) será estática mientras que la otra será variable en dirección (no así en magnitud). En un modelo mecanocuántico simplificado, el ángulo  $\xi$  está directamente relacionado con el número cuántico  $m_l$  si la dirección z es la del campo magnético aplicado  $B_0$ . En modelos más complejos, se considera un valor más general para  $\xi$  (independiente de  $m_l$ ).

Haciendo uso de las ecuaciones *B.29* y *B.30* se puede estimar el valor del campo magnético local  $B_L$ . Para un protón a una distancia media r de 0,2 nm (distancia comparable a la de un enlace químico), la magnitud de dicho campo es del orden de 0,2 mT. Este valor es mucho menor que la magnitud del campo magnético aplicado  $B_0$  (por ejemplo, 2,35 T para una frecuencia de resonancia del protón de 100 MHz), pero es mucho mayor que los desplazamientos químicos de los átomos expresados en unidades de campo magnético (un desplazamiento de  $\delta=10$  ppm en un campo  $B_0=2,35$  T es de 23,5  $\mu\text{T}$ ). Es por esto que a nivel

molecular, un determinado núcleo se verá afectado por el campo magnético local generado por sus vecinos (y viceversa), pero los efectos sobre el campo magnético estático aplicado son despreciables.

Existe una interacción directa entre los núcleos, transmitida a través del espacio (como ocurriría con varios imanes a nivel macroscópico) debido a que los núcleos se comportan como dipolos magnéticos, denominándose a esta interacción acoplamiento directo o dipolar. Se puede demostrar que la energía de interacción entre los núcleos acoplados viene dada por la expresión:<sup>2</sup>

$$\hat{H}_{dd} = r^{-3} \gamma_1 \gamma_2 \hbar^2 [A + B + C + D + E + F] \frac{\mu_0}{4\pi} \quad [B.31]$$

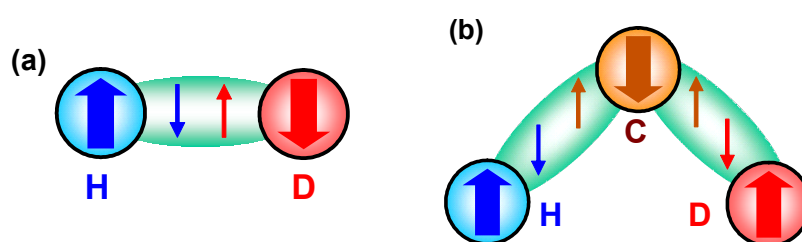
donde los términos A...F, contienen un factor de espín y un factor geométrico, cuyos efectos pueden ser analizados por separado. El factor constante  $(\mu_0 / 4\pi) r^{-3} \gamma_1 \gamma_2 (\hbar^2 / 2\pi)$ , expresado en unidades de frecuencia, es conocido como constante de acoplamiento dipolar, y se representa por la letra R. Este término no guarda relación con las constantes de acoplamiento indirecto (o espín-espín) que estudiaremos más adelante.

Para sistemas en disolución, es importante considerar cómo los factores geométricos de los términos A...F son afectados por los movimientos moleculares. Una vibración isotrópica rápida de las moléculas hace que todos estos factores promedien a cero y esto implica que los acoplamientos directos o interacciones dipolares no afectan a las transiciones entre niveles ni a la intensidad de las señales en RMN (aunque si afectan de alguna manera a la relajación nuclear). Para sistemas sólidos o sistemas líquidos anisotrópicos, estos factores no se anulan, y las interacciones dipolares deben ser consideradas.

Los acoplamientos directos se pueden dar entre núcleos pertenecientes a una misma molécula (acoplamiento intramolecular), o entre núcleos pertenecientes a dos moléculas diferentes cercanas en el espacio (acoplamiento intermolecular).

**Acoplamiento indirecto o Espín-Espín.-** Existe otro tipo de acoplamientos entre los núcleos atómicos que se transmite de forma indirecta a través de los electrones que forman parte de los enlaces químicos. De hecho, este acoplamiento se plantea como un acoplamiento entre núcleos y electrones, que acaba correlacionando a dos núcleos entre sí. Estos acoplamientos son los responsables de la aparición de desdoblamientos de las señales en los espectros de RMN.

Los acoplamientos indirectos ocurren por más de un mecanismo, pero se puede visualizar fácilmente el proceso desde un punto de vista clásico a través del llamado modelo vectorial de Dirac. Para un determinado núcleo, la conformación más estable es aquella en la que el espín nuclear y el espín electrónico son antiparalelos.



**Figura B.7.-** Modelo vectorial de Dirac para acoplamientos (H,H) en **(a)** un sistema HD y **(b)** un sistema HCD. Las flechas gruesas representan a los espines nucleares y la finas a los electrónicos.

Si se considera un sistema formado por dos núcleos H-D enlazados entre sí (*figura B.7.a*), la situación de mayor estabilidad para el átomo H corresponde a aquella en la que el espín nuclear y el espín electrónico son antiparalelos. Si ahora se considera el enlace químico formado por ambos núcleos, en virtud del principio de exclusión de Pauli, en el orbital enlazante los espines de electrones de los átomos H y D deben ser antiparalelos. Para el núcleo D la situación de mayor estabilidad corresponde también a aquella en que el espín del electrón y el espín del núcleo D están situados de forma antiparalela. Así, indirectamente, la posición del espín nuclear H condiciona la posición del espín nuclear D, siendo ambos paralelos en la situación de máxima estabilidad. Este acoplamiento viene caracterizado por una constante de acoplamiento que se define como  $J > 0$ .

Para un sistema formado por tres núcleos enlazados entre sí H-C-D, el modelo de Dirac es igual de sencillo, siempre que los electrones enlazantes estén todos localizados. Como se puede observar en la *figura B.7.b*, los núcleos H y D tienen ahora sus espines en posición paralela, dando lugar a una constante de acoplamiento que se define como  $J < 0$ .

## Apéndice B

Siguiendo una secuencia lógica, los núcleos separados por un número impar de enlaces presentarían constantes de acoplamiento positivas, y los núcleos separados por un número par de enlaces presentarían constantes de acoplamiento negativas. Esta regla no suele cumplirse habitualmente ya que el modelo de Dirac es un modelo muy simple, y falla en muchas ocasiones. Puesto que existe una interacción entre cada átomo que interviene en el acoplamiento, el modelo de Dirac prevé que la magnitud de la constante  $J$  se vaya atenuando paulatinamente al ir aumentando el número de núcleos implicados. Para sistemas saturados, se considera que el acoplamiento deja de ser efectivo cuando están implicados más de cuatro enlaces.

Los acoplamientos indirectos son los responsables del desdoblamiento de las señales observadas en un espectro de RMN. A continuación se analizan los motivos por los que se producen dichos desdoblamientos. Considérese un sistema sencillo formado por dos núcleos con espín diferente de cero,  $I_1$  e  $I_2$ . Experimentalmente, se observa que la señal producida por el núcleo  $I_1$  se desdobra en  $2I_2+1$  señales de la misma intensidad. Igualmente, la señal producida por el núcleo 2 se desdobra en  $2I_1+1$  señales de la misma intensidad. La separación entre las líneas de  $I_1$  es la misma que la separación entre las líneas de  $I_2$ . Este fenómeno sugiere una relación entre el número de desdoblamientos de la señal de un determinado núcleo y el número cuántico magnético de espín ( $m_I$ ) del núcleo que interacciona con él. Así, si se considera la propiedad de espín como un movimiento de rotación del núcleo sobre su propio eje (visión clásica de la propiedad de espín), la rotación de una partícula cargada (a una velocidad angular determinada y con un sentido de giro concreto) se verá afectada por la presencia en sus cercanías de otra partícula rotatoria cargada. Esta interacción dependerá del sentido de giro de la segunda partícula (figura B.8).



**Figura B.8.-** Para un sistema con  $I = 1/2$  ( $m_I = +1/2$ ,  $m_I = -1/2$ ) existen dos situaciones energéticas diferentes por lo que se producen dos señales en el espectro de RMN.

Al existir dos situaciones energéticas diferentes (*figura B.8*) se producirán dos señales diferentes. Como se puede observar, para un sistema de dos espines no acoplados (*figura B.9 izquierda*), la transición  $\alpha\text{-}\beta$  de uno de ellos es independiente del estado del otro, apareciendo en este caso una única señal en el espectro. Pero si los dos núcleos están acoplados (*figura B.9 derecha*), se produce un desdoblamiento de los niveles de energía debido a las dos situaciones representadas en la *figura B.8*. Ahora la energía del tránsito  $\alpha\text{-}\beta$  de un núcleo depende del espín del núcleo vecino. Al existir dos transiciones de energía diferente ( $E_1$  y  $E_2$ ) aparecen dos señales en el espectro.



**Figura B.9.-** Origen del desdoblamiento de las señales de RMN.

No es frecuente observar el acoplamiento entre espines para sistemas de espín  $I > 1/2$  ya que poseen una velocidad de relajación muy rápida y apenas permanecen en estado excitado.

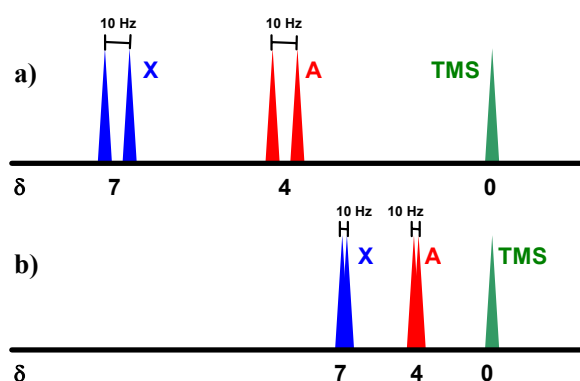
Las constantes de acoplamiento, al igual que la frecuencia de resonancia de los núcleos, dependen del entorno químico de los núcleos y por ello resultan de utilidad en la determinación estructural de las moléculas. Es muy importante tener presente que la frecuencia del campo magnético aplicado no afecta a la magnitud de las constantes de acoplamiento (mientras que sí afectaba a las frecuencias de resonancia). Este hecho se debe a la naturaleza de dichos desdoblamientos, cuyo origen está en la creación de diferencias de energía en los niveles de Zeeman y aunque el valor absoluto de la energía de dichos niveles dependa del campo aplicado, el valor relativo de las variaciones sufridas por los acoplamientos entre espines es el mismo.

Puesto que los desplazamientos químicos (en valor relativo, no en valor absoluto referenciado al TMS) se ven afectados por el campo aplicado, y las

constantes de acoplamiento no, la apariencia de un espectro de RMN cambia en función del equipo con el que ha sido determinado (*figura B.10*).

Si el campo no es lo suficientemente intenso, podría no llegar a apreciarse el desdoblamiento de las señales. El acoplamiento espín-espín se transmite a través de los electrones enlazantes de las moléculas. Por ello, sólo existe acoplamiento indirecto intramolecular.

**Acoplamiento múltiple.-** Cuando el núcleo considerado se encuentra acoplado con más de un núcleo vecino, el número, posición e intensidad relativa de los desdoblamientos de las señales va a depender de las constantes de acoplamiento entre los diferentes núcleos.



**Figura B.10.-** Espectro de RMN de un sistema de dos núcleos acoplados (A y X) en un equipo de RMN con campo magnético intenso (a) y pequeño (b).

Suponiendo que un núcleo A está acoplado con un único núcleo X, con una constante  $J_{AX}$  característica de este acoplamiento, la señal del espectro se desdobra en dos señales (para núcleos con espín  $\frac{1}{2}$ ) de la misma intensidad (*figura B.11*). A este tipo de señal se le denomina doblete.

Si el núcleo A está acoplado con dos núcleos diferentes X y M, existirá una constante característica para cada acoplamiento ( $J_{AX}$  y  $J_{AM}$ ). En primer lugar la señal A sufre un desdoblamiento debido a su acoplamiento con el núcleo X. A continuación pueden presentarse tres situaciones

diferentes, en función de la relación de las constantes de acoplamiento ( $J_{AX} > J_{AM}$ ,  $J_{AX} = J_{AM}$  y  $J_{AX} < J_{AM}$ ). Todas ellas se pueden observar en la *figura B.12*. En el primer y en el último caso se observarían cuatro señales para el núcleo A. Este tipo de señal se denomina doble doblete y todas las señales tendrían igual intensidad. En el segundo caso sólo se observarían tres señales, teniendo la del medio el doble de intensidad que las otras dos. A este tipo de señal se le denomina triplete y es típica de sistemas en los que  $X=M$  (núcleos magnéticamente equivalentes).

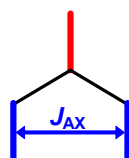


Figura B.11.- Acoplamiento de un núcleo A con un núcleo X.

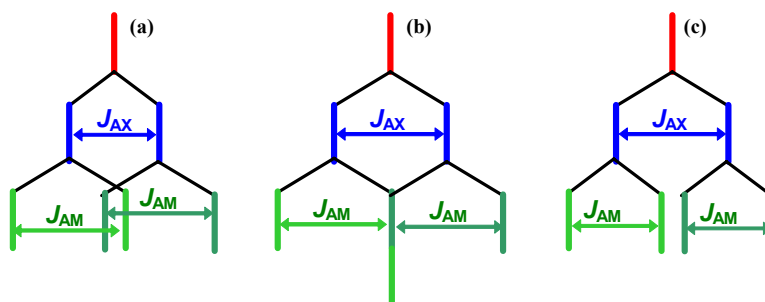


Figura B.12.- Acoplamiento de un núcleo A con dos núcleos diferentes X y M bajo tres suposiciones distintas: (a)  $J_{AX} < J_{AM}$ , (b)  $J_{AX} = J_{AM}$ , (c)  $J_{AX} > J_{AM}$ .

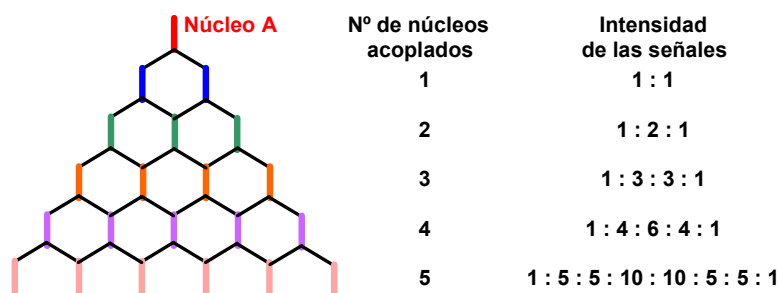
Por último, si se considera que un núcleo A está acoplado con más de tres núcleos diferentes X, M, R, ..., se deberá plantear la existencia de una constante  $J_{ik}$  característica de cada acoplamiento (esto es  $J_{AX}$ ,  $J_{AM}$ ,  $J_{AR}$ , ...). La situación que así se obtiene es tremendamente compleja ya que, por ejemplo para un sistema de 4 espines acoplados, las combinaciones que pueden ocurrir son múltiples en función de los valores relativos de las constantes  $J_{ik}$ . De esta forma se suelen obtener

## Apéndice B

grupos de señales múltiples. Para el núcleo A, obtendríamos  $2^{n-1}$  líneas (siendo n el número total de átomos acoplados entre sí). Este tipo de señales se denomina genéricamente como multiplete y no se suelen analizar debido a su complejidad.

Un caso particular sencillo, es aquel en que todos los núcleos acoplados con el núcleo observado (A) son magnéticamente idénticos. Tal y como se observa en la *figura B.13*, para un núcleo acoplado con n núcleos magnéticamente equivalentes aparecen n+1 señales cuya relación de intensidades viene dada por el triángulo de Pascal.

Estas reglas sólo son aplicables cuando tratamos con núcleos de la misma especie acoplados entre sí, y cuando la separación de las señales espectrales es grande en relación con las constantes de acoplamiento (espectros de primer orden), no siendo válidos en los denominados espectros de segundo orden, en los que la separación entre las señales de los distintos núcleos es comparable a las constantes de acoplamiento, produciéndose entonces un solapamiento de las señales que complican la interpretación de los espectros de RMN.



**Figura B.13.-** Método de los desdoblamientos sucesivos e intensidad relativa de los mismos para un núcleo acoplado con n núcleos equivalentes.

### B.1.c.- Tipos de intercambio según los tiempos de los experimentos de RMN

Como se ha descrito con anterioridad, el desplazamiento químico observado para un determinado núcleo depende del entorno químico de éste, ya que el apantallamiento electrónico al que está sometido depende en gran medida del ambiente que le rodea. Así, si un núcleo sufre un proceso de cualquier tipo en el

que su entorno electrónico se vea afectado, se podrá observar experimentalmente una variación en la frecuencia de resonancia de dicho núcleo. Es evidente que durante un proceso, por ejemplo de asociación, los núcleos atómicos de las dos moléculas que interactúan situados en las proximidades del lugar de asociación van a sufrir un cambio importante en su entorno, causado básicamente porque, antes de la interacción estaban rodeadas de disolvente, y después éste se sustituye por partes de la otra molécula. De esta forma cambia la polaridad del entorno de ambas moléculas.

Esta situación es detectable experimentalmente observándose un resultado diferente en función de la velocidad con la que ocurre un proceso de asociación (por ejemplo, una complejación) comparado con la escala de tiempos de RMN (figura B.14).

Se dice que el sistema está bajo un *régimen de intercambio lento* si el proceso de entrada y salida de la molécula huésped es muy lento en comparación con la escala de tiempos de la RMN, esto es, si la detección de la señal (que se corresponde con el proceso de relajación de los núcleos desde estados excitados al estado fundamental y que en RMN va desde  $10^{-6}$  a 1 segundo) es más rápida que la entrada y salida del huésped del interior de la ciclodextrina. En este caso se podrán detectar los dos estados de la ciclodextrina por separado (no complejada y complejada), y en el espectro de RMN se observan dos señales bien diferenciadas. La intensidad relativa de ambas señales será proporcional a la fracción de cada una de las dos especies presentes en equilibrio (figuras B.14 y B.15).

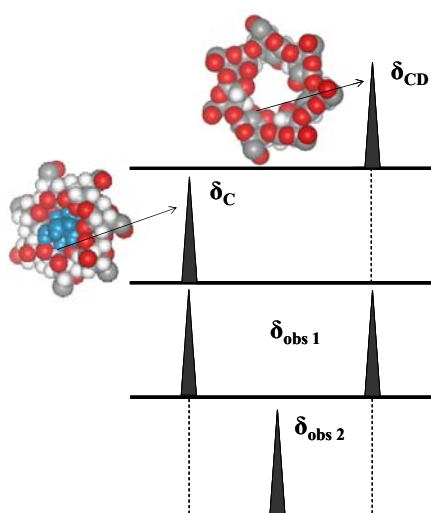
Por otro lado, se dice que el sistema está bajo un **régimen de intercambio rápido** si el proceso de entrada y salida de la molécula huésped es muy rápido en comparación con la escala de tiempos de la RMN. En este caso sólo se va a detectar una única señal, cuya posición será un promedio ponderado de la correspondiente a cada una de las dos especies por separado (figuras B.14 y B.16).

Así, para un proceso de complejación, la posición de la señal observada experimentalmente ( $\delta_{\text{obs}}$ ) vendrá dada por la ecuación:

$$\delta_{\text{obs}} = f_{\text{CD}}\delta_{\text{CD}} + n f_{\text{C}}\delta_{\text{C}} \quad [\text{B.32}]$$

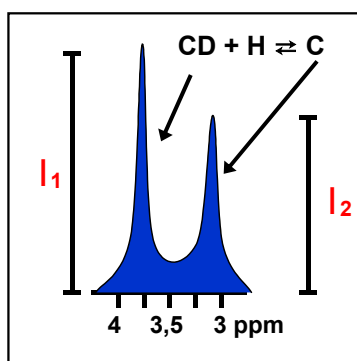
en la que  $f_{\text{CD}}$  y  $f_{\text{C}}$  representan las fracciones de ciclodextrina sin complejar y complejada. Evidentemente, ambos términos satisfacen la condición:

$$f_{\text{CD}} + n f_{\text{C}} = 1 \quad [\text{B.33}]$$



**Figura B.14.-** Posibles situaciones observadas en RMN para el proceso de complejación de una ciclodextrina:

- (a) Señal característica de un determinado núcleo de la ciclodextrina ( $\delta_{CD}$ ).
- (b) Señal característica de ese mismo núcleo en el complejo ( $\delta_C$ ).
- (c) Espectro observado bajo un régimen de intercambio lento.
- (d) Espectro observado bajo un régimen de intercambio rápido ( $\delta_{obs}$ ).



**Figura B.15.-** Señal observada en RMN para un proceso de complejación bajo intercambio

lento.  $\frac{[C]}{[CD]} = \frac{I_2}{I_1}$

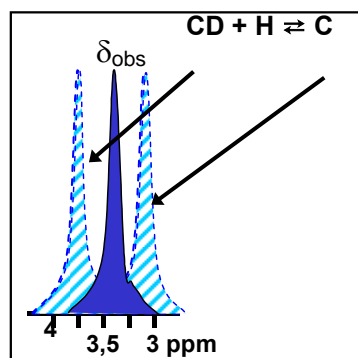


Figura B.16.- Señal observada en RMN para un proceso de complejación bajo intercambio rápido.

## B.2.- BALANZA DE TENSIÓN SUPERFICIAL

### B.2.a.- Fundamentos físicos<sup>5</sup>

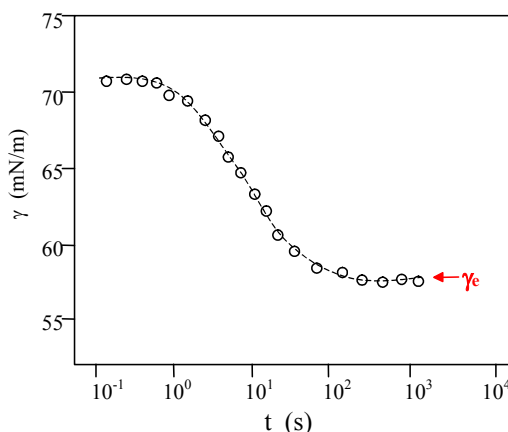
**Comportamiento de adsorción de equilibrio.** La tensión superficial, propiedad termodinámica de los sistemas de más de un componente fluido separados por una interfase, se define como el trabajo que debe realizar el sistema líquido-líquido o líquido-gas para aumentar el área de separación de ambos fluidos.

La adsorción de una sustancia en una interfase líquido-líquido o líquido-gas, es un fenómeno dinámico, y por ello se consideran dos tipos de estudios de la tensión superficial. En este apartado nos referiremos esencialmente al segundo de ellos.

- Estudio dinámico de la tensión superficial (DST).
- Estudio de la tensión superficial de equilibrio (EST).

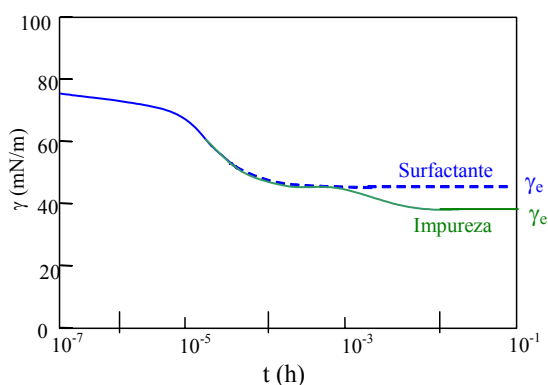
En la bibliografía se pueden encontrar diferentes métodos para la determinación de la tensión superficial de equilibrio de un sistema.<sup>5</sup> Ésta, se obtiene básicamente por medio del control del comportamiento de la tensión dinámica de una disolución, esperando a que se alcance un valor constante. La curva típica correspondiente a la variación de la tensión superficial con el tiempo (*figura B.17*) puede dividirse en cuatro etapas, de acuerdo con el criterio de Rosen:<sup>6</sup> región de inducción; región de caída rápida; región de meso-equilibrio y región de equilibrio.

**Figura B.17.-** Variación con el tiempo de la tensión superficial de una disolución 3,84  $\mu\text{M}$  de Triton X-100 a 25°C.  $\gamma_e$  corresponde a la tensión superficial de equilibrio.<sup>5</sup>



No es fácil relacionar cada una de estas etapas con modelos concretos de transferencia de masa entre la interfase y el seno de la disolución. Por ello, sólo interesa recordar que existe un cierto intervalo de tiempo necesario para alcanzar un estado de equilibrio, que depende de las características del sistema objeto de estudio. La tensión superficial correspondiente  $\gamma_e$ , reflejo de las interacciones a nivel interfacial, se verá afectada por la presencia en disolución de otros compuestos. Si estas impurezas son muy activas superficialmente, pueden afectar al estudio realizado aunque estén presentes en cantidades mínimas. Este aspecto debe considerarse con cuidado ya que puede conducir a errores, atribuyendo el valor de  $\gamma_e$  de la impureza a la sustancia tensioactiva que se está analizando (*figura B.18*).

**Figura B.18.-** Tensión superficial de un surfactante contaminado por una impureza superficialmente activa.<sup>5</sup>



El trabajo más importante sobre el efecto que causan las impurezas sobre la tensión superficial fue llevado a cabo por Mysels *et al.*,<sup>7</sup> quienes desarrollaron criterios y procedimientos de purificación para un variado grupo de surfactantes.

Por otra parte, es un hecho experimental que para la mayoría de los agentes tensioactivos (las sales biliares entre ellos) la tensión de equilibrio decrece de forma continua con la concentración de los mismos, permaneciendo prácticamente constante por encima de la concentración micelar crítica. En este caso, la presencia de un mínimo en la curva tensión superficial vs concentración es el indicativo de la existencia de impurezas superficialmente activas. No obstante, no puede asegurarse que la ausencia de este mínimo sea un indicativo de la pureza del surfactante.<sup>7,8</sup>

La ecuación termodinámica que se usa generalmente para describir el proceso de la actividad superficial es la ecuación de adsorción de Gibbs.<sup>5</sup>

$$\Gamma = -\frac{1}{nRT} \left( \frac{\delta\gamma}{\delta \ln a} \right)_T \quad [B.34]$$

Si se supone que las disoluciones son diluidas e ideales y que los coeficientes de actividad se aproximan a la unidad, entonces:

$$\Gamma = -\frac{1}{nRT} \left( \frac{\delta\gamma}{\delta \ln C_s} \right)_T \quad [B.35]$$

$$n = 1 + \frac{C_s}{C_s + I} \quad I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2$$

donde  $\Gamma$  es la concentración de exceso superficial en la interfase,  $R$  la constante de los gases,  $T$  la temperatura,  $\gamma$  la tensión superficial y  $n$  una constante que depende por un lado del número de especies que constituyen el surfactante y que se adsorben en la interfase, y por otro lado, de la fuerza iónica total del medio. Esta ecuación es válida para disoluciones diluidas ideales. Su uso supone la aproximación común de que la concentración de exceso en la interfase ( $\Gamma$ ) corresponde a la concentración de surfactante en la superficie. Esta aproximación es razonable para disoluciones diluidas y moléculas superficialmente muy activas.

A partir de la ecuación de Gibbs *B.34* se puede hacer un cálculo de la concentración superficial y del área por molécula en la interfase. Para solutos superficialmente activos se puede considerar que la concentración de exceso superficial es igual a la concentración real de surfactante sin cometer un error significativo. La concentración de surfactante en la interfase se puede calcular a partir de los datos de tensión superficial utilizando la ecuación de Gibbs adecuada.

## Apéndice B

---

Por ejemplo, para disoluciones diluidas de un surfactante no iónico y para un surfactante de tipo 1:1 en presencia de una cantidad de electrolito en el medio que contenga un ión común (no surfactante) lo da la ecuación siguiente:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left( \frac{\delta\gamma}{\delta \ln C_s} \right)_T \quad [\text{B.36}]$$

y la concentración de surfactante se puede obtener de la pendiente de una representación de  $\gamma$  frente a  $\ln C_s$  a temperatura constante.

Para disoluciones de surfactantes iónicos 1:1 en ausencia de otros solutos se obtiene de forma similar, pero en este caso  $n=2$ .

$$\Gamma = -\frac{1}{2RT} \left( \frac{\delta\gamma}{\delta \ln C_s} \right)_T \quad [\text{B.37}]$$

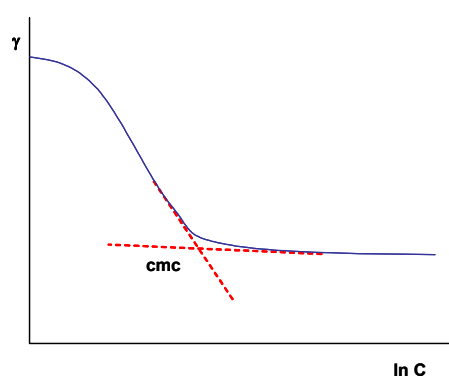
El área por molécula en la interfase da información del grado de empaquetamiento y de la orientación de la molécula de surfactante adsorbido cuando se compara con el área de las diferentes posiciones de la molécula. El área por molécula en la interfase,  $a^s$  en  $\text{\AA}^2$ , se calcula a partir de la concentración de exceso superficial de la relación

$$a^s = \frac{10^{16}}{N_A \Gamma} \quad [\text{B.38}]$$

donde  $N_A$  es el número de Avogadro y  $\Gamma$  en  $\text{mol/cm}^2$  y  $10^{16}$  un factor de conversión de unidades.

Una representación típica de la tensión superficial vs el  $\ln C$  para una disolución diluida de un surfactante se muestra en la *figura B.19*. La ruptura en la curva ocurre al llegar a la *cmc*. Por encima de esta concentración, la tensión superficial de la disolución se mantiene esencialmente constante ya que solamente la forma monomérica contribuye a la reducción de la de la tensión de la interfase. Para concentraciones inferiores pero cercanas a la *cmc*, la pendiente de la curva es prácticamente constante, lo que indica que la concentración superficial ha alcanzado un valor máximo constante. En este intervalo se considera que la interfase está saturada con surfactante y la reducción continua de la tensión superficial se debe principalmente al incremento de la actividad del surfactante en la disolución más que en la interfase. Para surfactantes iónicos en presencia de una concentración constante de contraión, esta región de adsorción saturada se puede extender hasta un tercio del valor de la *cmc*.

Existen otros modelos termodinámicos que se utilizan para describir el proceso de la adsorción de un surfactante en una interfase y dependen de diversos factores, principalmente si la adsorción es de tipo físico o de tipo químico. Cada uno de estos modelos da lugar a una ecuación que relaciona la concentración superficial en la interfase con la concentración de surfactante denominada **isoterma de adsorción**, y que contendrá mayor número de parámetros cuanto más complejo sea el modelo propuesto. A continuación se exponen las más comunes.<sup>5</sup>



**Figura B.19.-** Representación de la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración en la fase acuosa para una disolución de surfactante.

- **Isoterma de Henry.** Su ecuación es la más sencilla de todas y sólo es aplicable en sistemas de un único componente:

$$\Gamma = k_H C \quad [B.39]$$

La constante de adsorción de equilibrio  $k_H$  es una medida de la actividad superficial del surfactante, tiene dimensiones de longitud y viene a representar el espesor de la interfase.

La isoterma de Henry resulta demasiado simple y falla al describir el comportamiento de sistemas no ideales.

- **Isoterma de Langmuir.** Es la isoterma de adsorción no lineal más común:

$$\Gamma = \Gamma_m \left( \frac{K_L C}{1 + K_L C} \right) \quad [B.40]$$

donde  $\Gamma_m$  es la concentración superficial máxima y  $K_L$  es la constante de equilibrio de adsorción de Langmuir. El parámetro  $\Gamma_m$  es un límite teórico, que no puede medirse experimentalmente ya que para su determinación es preciso trabajar a concentraciones muy elevadas alcanzándose antes la *cmc* o el límite de solubilidad del surfactante. Por ello debe ser calculado por extrapolación o por ajuste matemático.

A concentraciones bajas (cuando  $K_L C \ll 1$ ), la isoterma de Langmuir se simplifica a la isoterma de Henry siendo  $k_H = K_L \Gamma_m$ .

- **Isoterma de Frumkin.** Considera las interacciones soluto-disolvente en una superficie no ideal. Es la isoterma que más se utiliza para surfactantes no iónicos:

$$C = \frac{1}{K_F} \frac{\Gamma}{\Gamma_m - \Gamma} \exp\left(-A \frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right) \quad [B.41]$$

En esta ecuación,  $K_F$  es la constante de adsorción de equilibrio de Frumkin y el parámetro  $A$  es una medida de la no idealidad en la capa interfacial. Cuando  $A$  tiende a 0, se considera que la superficie tiene comportamiento ideal, reduciéndose así la ecuación B.37 a la isoterma de Langmuir.

**Ecuaciones de estado.** Las ecuaciones de estado de los sistemas que presentan actividad superficial se obtienen mediante la combinación de la ecuación de adsorción de Gibbs B.34 con las diferentes isotermas de adsorción mencionadas anteriormente. Las ecuaciones resultantes (en las que  $\Pi$  representa a la diferencia  $\gamma - \gamma_0$ , siendo  $\gamma_0$  la tensión superficial del disolvente puro) se exponen a continuación:<sup>5</sup>

**a.- Ecuación de estado superficial para la isoterma de Henry.**

$$\Pi = nRTk_H C = nRT\Gamma \quad [B.42]$$

**b.- Ecuaciones de estado superficial para la isoterma de Langmuir.**

b.1.- Ecuación de estado Szyszkowski.

$$\Pi = nRT\Gamma_m \ln(1 + K_L C) \quad [B.43]$$

b.2.- Ecuación de estado de Frumkin.

$$\Pi = nRT\Gamma_m \ln\left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right) \quad [\text{B.44}]$$

**c.- Ecuación de estado superficial para la isoterma de Frumkin.**

$$\Pi = \frac{1}{2} nRT\Gamma_m \ln\left(\frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right)^2 \quad [\text{B.45}]$$

De todas ellas, las ecuaciones de estado superficial para la isoterma de Langmuir son las más comunes. En la *tabla B.2* se recogen los parámetros  $\Gamma_m$  y  $K_L$  que aparecen en la ecuación de Szyszkowski para algunos surfactantes, entre los que se encuentran algunas sales biliares.

**Tabla B.2.-** Parámetros característicos de la ecuación de estado de Szyszkowski de algunos surfactantes comunes.<sup>5</sup> <sup>a</sup>Temperatura ambiente.

Surfactante	Temperatura (°C)	$\Gamma_m \cdot 10^6$ (mol/m <sup>2</sup> )	$K_L$ (m <sup>3</sup> /mol)
<i>n-propanol</i>	a	7,1	$5,5 \cdot 10^{-3}$
<i>n-butanol</i>	a	6,0	$2,1 \cdot 10^{-2}$
<i>n-pentanol</i>	a	7,0	$6,0 \cdot 10^{-2}$
<i>n-hexanol</i>	a	6,0	$2,7 \cdot 10^{-1}$
<i>n-heptanol</i>	a	9,4	$3,5 \cdot 10^{-1}$
<i>n-octanol</i>	a	7,5	2,5
<i>1,2-octanoldiol</i>	22	2,9	$5,6 \cdot 10^{-1}$
<i>1,8-octanoldiol</i>	22	2,5	$2,9 \cdot 10^{-1}$
<i>1,9-nonanoldiol</i>	a	2,7	1,3
<i>1,10-decanoldiol</i>	22	2,5	3,6
<i>1,11-undecanoldiol</i>	22	2,6	$1,2 \cdot 10^1$
<i>Triton X-100</i>	22	2,9	$1,5 \cdot 10^3$
<i>Acido adípico</i>	22	2,2	$2,7 \cdot 10^{-2}$
<i>Acido pimélico</i>	22	2,5	$7,1 \cdot 10^{-2}$
<i>Acido dicarboxílico</i>	a	2,7	1,0
<i>Acido dodecanodioico</i>	22	2,4	$2,6 \cdot 10^1$
<i>Dodecanodiato sódico</i>	22	2,5	$4,0 \cdot 10^1$
<i>Colato sódico</i>	22	<b>1,8</b>	<b><math>2,0 \cdot 10^1</math></b>
<i>Desoxicolato sódico</i>	22	<b>2,2</b>	<b><math>6,3 \cdot 10^1</math></b>
<i>Litocolato sódico</i>	22	<b>2,1</b>	<b><math>3,7 \cdot 10^2</math></b>
<i>Dodecilsulfato sódico</i>	25	10	$1,1 \cdot 10^{-1}$
<i>Laurato sódico</i>	22	4,0	3,4

### **B.2.b.- Medida de la tensión superficial**

A continuación se hace una breve revisión de diferentes métodos que se pueden utilizar para la determinación experimental de la tensión superficial y que pueden ser clasificados dentro de tres grandes grupos:

#### **1.- Métodos de fuerza.**

- *Plato de Wilhelmy.*

- *Anillo de Du Noüy.*

#### **2.- Métodos de gota o burbuja.**

#### **3.- Métodos de presión.**

Se hará especial hincapié en el método del plato de Wilhelmy, por ser el empleado en el presente trabajo de investigación. Asimismo, haremos un breve comentario de método del anillo, similar al anterior, y del cual disponemos también en nuestro laboratorio.

Los **métodos de fuerza** se basan en las fuerzas de adherencia, que están íntimamente ligadas al fenómeno de la tensión superficial. Al poner en contacto con la superficie de la disolución una pieza (generalmente metálica) del equipo de medida, si las fuerzas de adherencia son positivas, da lugar a que se forme un menisco cóncavo de líquido con sus paredes (ángulo de contacto  $\theta < 90^\circ$ ). Las proporciones y peso de dicho menisco dependen de la tensión superficial de la disolución, siendo esta relación la base experimental de los métodos. Generalmente se utilizan dos diseños experimentales:

a.- *El plato de Wilhelmy*: Es el diseño más simple y proporciona el valor de la tensión superficial del sistema de una forma directa. Consiste en medir mediante una electrobalanza de precisión la diferencia entre el peso correspondiente a una lámina delgada de platino que pende de dicha balanza al “despegarla” de la superficie de la disolución. En estas condiciones se forma un menisco cóncavo sobre el extremo de dicha lámina cuyo ángulo de contacto y altura dependen de la tensión superficial de la disolución (*figura B.20*).

Así, el peso total que se determina en la balanza vendrá dado por la expresión:

$$W_{\text{total}} = W_{\text{plato}} + \gamma P \cos \theta \quad [\text{B.46}]$$

donde ( $\gamma P \cos \theta$ ) representa el peso del menisco formado, siendo  $\gamma$  la tensión superficial del sistema,  $P$  la longitud del contorno de contacto lámina-disolución y  $\theta$  el ángulo de contacto. Conocidas exactamente las dimensiones del plato y asumiendo un ángulo de contacto próximo a cero ( $\cos \theta = 1$ ), la tensión superficial del sistema se obtiene directamente como:

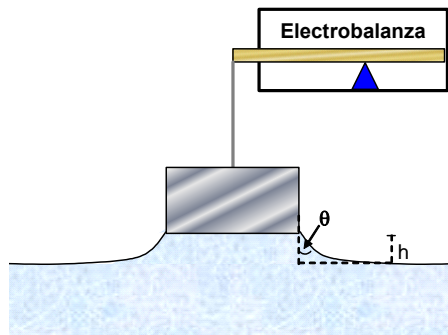


Figura B.20.- Esquema que representa el método de Wilhelmy.

$$\gamma = \frac{\Delta W}{P} \quad [\text{B.47}]$$

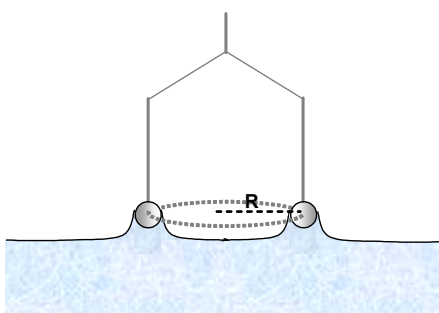
Este método proporciona resultados seguros siempre que el plato se mantenga equilibrado en el momento de la realización de la medida y si la fuerza se mide de forma continua con una electrobalanza lo suficientemente sensible, para poder obtener la lectura máxima al “despegar” la lámina de la disolución (empuje hidrostático=0).

El método es válido tanto para medidas dinámicas como estáticas de la tensión superficial, y es el que se ha escogido para la realización del presente trabajo de investigación.

b.- *El anillo de Du Noüy*: Este método es prácticamente idéntico al anterior, midiéndose en este caso la fuerza realizada al intentar separar un anillo de platino de la superficie de la interfase sobre la que está situado (figura B.21), con lo cual en la ecuación B.47 el valor de  $P$  a tomar es  $4\pi R$ ,

siendo  $R$  el radio del anillo. En este caso, es necesario introducir un factor de corrección que es función del espesor del anillo.<sup>5</sup>

Este método es más adecuado que el de plato de Wilhelmy para el estudio de interfases líquido-líquido en lugar de líquido-gas.



**Figura B.47.-** Esquema que representa el anillo de Du Nöuy.

### **B.3.- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Dado que son varios los autores<sup>9-12</sup> que describen la teoría de la espectroscopia de fluorescencia, nos limitaremos a exponer unos conceptos básicos sobre este fenómeno.

Debido a la absorción de un cuanto de luz una molécula se traslada del estado fundamental singlete,  $S_0$ , a un estado singlete electrónicamente excitado,  $S_1$ . Una vez en el estado excitado una parte de la energía se pierde en picosegundos debido a los choques con moléculas de disolvente circundante y la molécula se relaja al nivel vibracional más bajo del estado excitado. Posteriormente puede producirse el regreso a un nivel de vibración del estado fundamental en nanosegundos mediante emisión de radiación electromagnética. Este proceso se llama fluorescencia y la molécula correspondiente fluoróforo. La frecuencia de la radiación emitida es imagen especular de la absorbida pero desplazada hacia el rojo ya que es mayor la energía absorbida que la emitida por fluorescencia.

La fluorescencia se produce compitiendo con procesos de desactivación no radiantes: conversión interna, transferencia de energía a un desactivador (“quencher”) o transición al estado triplete.

### B.3.a.- Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos y se puede calcular de la relación entre la constante de velocidad de desactivación radiante ( $k_r$ ) y la suma de las constantes de velocidad de todos los procesos de desactivación, radiantes y no radiantes ( $k_{nr}$ ):

$$Q = \frac{\text{Número de fotones emitidos}}{\text{Número de fotones absorbidos}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad [\text{B.48}]$$

El rendimiento cuántico respecto a una sustancia de referencia puede calcularse según la siguiente ecuación a partir de los espectros de absorción y los espectros de emisión corregidos de disoluciones diluidas:<sup>13</sup>

$$Q_x = Q_r \frac{A_r^{\lambda_r} I^{\lambda_r} n_x^2 D_x}{A_x^{\lambda_x} I^{\lambda_x} n_r^2 D_r} \quad [\text{B.49}]$$

donde Q es el rendimiento cuántico de fluorescencia, x: sustancia de rendimiento cuántico desconocido, r: sustancia de referencia de rendimiento cuántico conocido,  $A^\lambda$ : absorbancia de la disolución a la longitud de onda de excitación  $\lambda$ ,  $I^\lambda$ : intensidad relativa de la luz excitatriz a la longitud de onda de excitación  $\lambda$ , n: índice de refracción y D el área integrada bajo el espectro de emisión corregido por la diferente sensibilidad del sistema de detección a las distintas longitudes de onda de emisión.

Si no se dispone de una sustancia de referencia de la que se conozca su rendimiento cuántico se calcularán con esta fórmula rendimientos cuánticos relativos del fluoróforo en los distintos disolventes respecto al rendimiento cuántico en agua, que se toma como referencia unitaria. Según la ecuación anterior, si se utiliza la misma longitud de onda de excitación para todas las disoluciones, se tiene:

$$\frac{Q_x}{Q_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{A_{\text{H}_2\text{O}}^\lambda n_x^2 D_x}{A_x^\lambda n_{\text{H}_2\text{O}}^2 D_{\text{H}_2\text{O}}} \quad [\text{B.50}]$$

### **B.3.b.- Tiempo de vida de fluorescencia**

Otro parámetro importante que sirve para caracterizar un fluoróforo es el tiempo de vida medio del estado singlete excitado. La forma más habitual de designar el tiempo de vida de fluorescencia del fluoróforo es  $\tau$ :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad [\text{B.51}]$$

El tiempo de vida que proporciona esta ecuación es distinto del llamado tiempo de vida de fluorescencia radiante,  $\tau_F$ , que sólo tiene en cuenta los procesos de desactivación radiante

$$\tau_F = \frac{1}{k_r} \quad [\text{B.52}]$$

Tanto  $Q$  como  $\tau$  pueden proporcionar información detallada sobre el microentorno del fluoróforo, ya que todos los mecanismos de desactivación que compiten con la fluorescencia están muy influenciados por el medio circundante. De las ecuaciones anteriores se obtiene la relación existente entre  $\tau$  y  $Q$ :

$$Q = k_r \cdot \tau \quad [\text{B.53}]$$

En un experimento los fluoróforos se excitan con un corto pulso de luz de excitación a un tiempo cero y luego disminuye la intensidad de fluorescencia observada con un decaimiento monoexponencial:

$$\frac{\delta F(t)}{\delta t} = -\frac{1}{\tau} F(t) \rightarrow F(t) = F(t=0)e^{-t/\tau} \quad [\text{B.54}]$$

donde,  $F(t=0)$  es la intensidad de fluorescencia tras un pulso de excitación. El tiempo de vida de fluorescencia  $\tau$  es el tiempo en el que la intensidad de fluorescencia se reduce a  $1/e$  del valor inicial.

En el caso de una mezcla de fluoróforos con distintos tiempos de vida de fluorescencia o un fluoróforo con tiempos de vida de fluorescencia diferentes según su microentorno, el decaimiento no es monoexponencial y puede describirse como una suma de decaimientos monoexponenciales individuales:

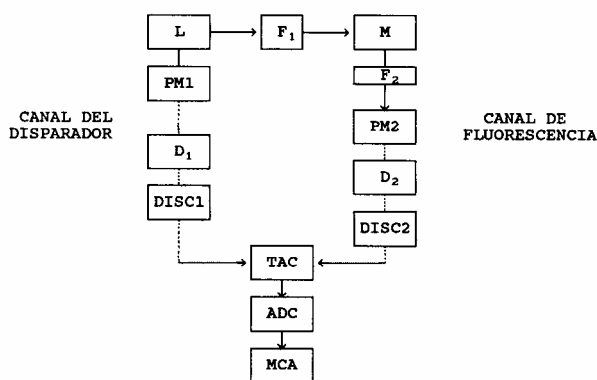
$$F(t) = \sum_i F_i(t=0)e^{-t/\tau_i} \quad [\text{B.55}]$$

### B.3.c.- Espectroscopia de fluorescencia en estado estacionario y con resolución temporal

Las medidas de fluorescencia se realizaron mediante un espectrofluorímetro de Edinburgh Analytical Instruments (EAI), modelo F900. Es un aparato modular que permite tanto la medida de espectros de fluorescencia de excitación y de emisión, con una sensibilidad elevada, como la medida de tiempos de vida de fluorescencia mediante la técnica de “time-correlated single photon counting” (TCSPC), recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo. Dado que los tiempos de vida de fluorescencia de las moléculas orgánicas son del orden de nano- o picosegundos, es necesario utilizar técnicas especiales de gran resolución temporal para seguir la evolución de la emisión fluorescente con el tiempo, siendo la técnica TCSPC quizás la más sensible de las existentes, permitiendo la medida de tiempos cortos y decaimientos multiexponenciales con gran precisión, así como la obtención de espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo. Para las medidas de fluorescencia en estado estacionario se utiliza la lámpara de Xenón como fuente de excitación. El intervalo espectral de esta lámpara es de 200 a 2600 nm, pero está restringido por el intervalo espectral del monocromador de excitación, que va de 200 a 900 nm. Los dos monocromadores de excitación y de emisión (Czery-Turner, red de difracción 1800 líneas/nm) poseen rendijas variables de forma continua, entre 10  $\mu\text{m}$  y 10 nm, y se ajustan manualmente. En cada experimento se eligieron las anchuras de rendijas adecuadas según la intensidad de fluorescencia (evitándose sobrepasar el número de cuentas máximo de 80000 cps) y se mantuvieron constantes en cada serie de medidas. La técnica TCSPC se basa en el concepto de que la distribución de probabilidad para la emisión de un fotón particular tras la excitación coincide con la distribución intensidad-tiempo de la totalidad de fotones emitidos como resultado de la excitación. Por lo tanto, determinando la distribución de probabilidad de un determinado fotón, en concreto, del primer fotón que llega al detector tras la excitación y mediante la realización de un gran número de excitaciones, es posible conocer la curva de dependencia temporal de la intensidad de fluorescencia de la muestra en estudio para una longitud de onda de emisión dada.

En la *figura B.48* se muestra un diagrama esquemático de un instrumento convencional de TCSPC, en base al cual se dará una idea general del desarrollo del experimento, aunque se omitirán los detalles de la técnica que aparecen recogidos en diversas monografías sobre el tema. El disparador (PM1) genera un pulso eléctrico a un tiempo exactamente correlacionado con el tiempo que se excita la muestra. El pulso del disparador es conducido a través de un discriminador para poner en marcha el convertidor tiempo-amplitud (TAC), que comienza a cargar un

condensador. Por otra parte, el pulso óptico excita la muestra y ésta emite fluorescencia, detectándose en el fotomultiplicador (PM2) los fotones emitidos. En el momento en que llega el primer fotón al PM2, éste envía una señal de parada al TAC, que finaliza el proceso de carga del condensador y lanza un pulso cuya amplitud es proporcional a la carga del condensador y, por tanto, al intervalo de tiempo entre los pulsos de un valor numérico en el convertidor analógico-digital (ADC), almacenándose una cuenta en el canal correspondiente a ese número del analizador multicanal. Este proceso se repite para un número grande de excitaciones hasta alcanzar un determinado valor del número de cuentas en el máximo de la distribución. Dicho valor depende de las características del decaimiento y de la precisión requerida en la medida. La fuente de excitación es, junto con el sistema de detección, factor determinante de la resolución temporal de un aparato TCSPC.



**Figura B.48.-** Diagrama de bloques convencional de un equipo de “time-correlated single photon counting” o TCSPC: (—) señales ópticas; (...) señales electrónicas; L: fuente de excitación; PM1: fotomultiplicador de disparo; PM2: fotomultiplicador de fluorescencia; D1, D2: líneas de retraso; DISC1: discriminador para la señal del disparador; DISC2: discriminador para la señal de fluorescencia; TAC: convertidor tiempo-amplitud; ADC: convertidor analógico-digital; MCA: analizador multicanal.

Las fuentes de excitación más comúnmente utilizadas, hasta el momento, son las lámparas de destello con gases como H<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o aire, con las que se miden tiempos de vida del orden de nanosegundos. No obstante, cada vez es más

frecuente la utilización de láseres de pulsos muy cortos y de detectores de elevada resolución temporal que permiten medir tiempos de vida en la región de los picosegundos. El aparato utilizado en este trabajo dispone de una lámpara de destello nF900, que se llenó con gas H<sub>2</sub> a una presión de 0,3-0,4 bar.

Los decaimientos de fluorescencia, medidos experimentalmente mediante TCSPC, incluyen la contribución del pulso de excitación, por lo que generalmente se debe realizar la deconvolución de la señal para eliminar dicha contribución y obtener el decaimiento real de fluorescencia de la muestra. Para realizar la deconvolución es necesario determinar el perfil temporal del pulso de excitación, que se mide en las mismas condiciones que el decaimiento de fluorescencia de la muestra, reemplazando ésta por una sustancia dispersora de la luz y situando el monocromador de emisión a la misma longitud de onda que la excitación. El hecho de que el decaimiento de fluorescencia y el perfil temporal del pulso de excitación se midan a diferentes longitudes de onda, es una de las causas de distorsión de las medidas de TCSPC, debido al denominado “efecto color” del fotomultiplicador (el tiempo de transición del fotoelectrón en el multiplicador depende de la longitud de onda del fotón incidente). Este problema se corrige mediante un parámetro adicional en el análisis de las curvas de decaimiento.

Es importante señalar que la base estadística de la técnica de TCSPC es únicamente válida cuando la relación entre el número medio de cuentas por segundo que llega al detector y la frecuencia de excitación tiene un valor muy pequeño, ya que sólo en tales condiciones la distribución de probabilidad medida coincide con la evolución temporal de la fluorescencia de la muestra. Por ello, las medidas de TCSPC se realizaron manteniendo la citada relación por debajo de un valor límite de 0,05.

### **B.3.d.- Análisis de datos**

Las técnicas de análisis de datos suministran elevada cantidad de información que hacen que sean necesarias técnicas matemáticas y estadísticas para extraer la máxima información posible de los datos obtenidos experimentalmente. Para la realización de los ajustes no lineales se utiliza el programa comercial Origin (versión 7.0). Dicho programa permite el tratamiento de series de datos individuales y también de forma global, donde se ajustan varias series de datos experimentales medidos a diferentes longitudes de onda simultáneamente para obtener valores más precisos de los parámetros ajustables. En estos ajustes globales, el parámetro independiente de la longitud de onda se hace común a todas

las series de datos, de manera que su valor está mejor definido ya que la posible correlación estadística entre parámetros ajustables se reduce significativamente.

#### **B.4.- DISPERSIÓN DE LUZ**

La difusión de luz se encuentra entre las técnicas experimentales más versátiles en el estudio de las propiedades de macromoléculas o agregados moleculares. Esta técnica encuentra su origen en la interacción radiación electromagnética-materia. Cuando la luz incide en una partícula, el campo eléctrico de la luz induce un momento dipolar oscilante que varía con el tiempo. Estas partículas se asemejan a dipolos eléctricos oscilantes, y como tales emitirán radiación electromagnética en todas las direcciones del espacio. Manifestaciones cotidianas de este fenómeno son el color azul del cielo, la percepción de los humos o de las partículas de polvo moviéndose a través de un rayo de sol.

De esta interacción es posible obtener información sobre la estructura y la dinámica molecular del sistema en estudio. Hoy en día esto es posible gracias a técnicas tales como: dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS, Small-Angle X Ray Scattering), dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS, Small-Angle Neutron Scattering) y dispersión de luz estática y dinámica (LS, Static and Dynamic Light Scattering). Un análisis exhaustivo de la estructura requeriría de las tres técnicas de dispersión de luz combinadas, aunque estudios como éstos son muy raros. Este apartado está confinado a las técnicas de dispersión de luz, una técnica no invasiva que aporta datos interesantes sobre tamaño y forma de macromoléculas en disolución.<sup>14,15</sup>

La intensidad de luz dispersada por una muestra se monitoriza en un intervalo que puede ser de microsegundos o de segundos. Ésta es la diferencia básica entre las medidas de luz dinámica y estática, respectivamente. Las fluctuaciones que se producen en la intensidad de luz dispersada por un pequeño volumen de muestra se encuentran en un dominio de microsegundos, y están directamente relacionadas con el movimiento Browniano de la disolución. Mientras que las medidas tomadas en un intervalo de segundos causan la pérdida de la dinámica del soluto, al promediarse todos los movimientos de éste. Por eso las técnicas se denominan dinámicas o estáticas.

En difusión de luz, se consideran dos aspectos de la luz difundida. En primer lugar, la distribución angular de la intensidad total de luz difundida, en este caso se habla de *Difusión de Luz Estática*; y en segundo lugar, se puede estudiar la distribución espectral de la intensidad de luz difundida, tratándose entonces de

*Difusión de Luz Dinámica.* De ella se obtiene información de la dinámica molecular tanto de macromoléculas en disolución como de líquidos.

#### B.4.a.- Difusión Estática de la luz (Static Light Scattering, SLS)

En un experimento de dispersión estática de luz el parámetro experimental que nos proporciona la información física de interés es el promedio de la intensidad de luz dispersada. La intensidad de la luz difundida elásticamente por un determinado material dependerá, necesariamente, del número de moléculas por unidad de volumen (concentración) y de su polarizabilidad (capacidad de sus moléculas para seguir la perturbación del campo electromagnético), que está relacionada con su índice de refracción.

Como siempre el sistema más sencillo de estudiar mediante difusión elástica es un gas ideal, en el que sus partículas no interactúan entre sí, se mueven al azar y a grandes distancias unas de otras. Admitiendo que su tamaño es pequeño en relación con la longitud de onda de la luz incidente, se puede considerar que se comportan como dipolos puntuales y que la intensidad de la luz difundida por el sistema es la suma de las intensidades difundidas por cada partícula individual. Lord Rayleigh demostró que la intensidad difundida total  $I$ , cuando se utiliza luz incidente no polarizada, viene dada por:

$$I = \frac{4\pi^2 M I_0}{r^2 \lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad [B.56]$$

donde  $M$  es el peso molecular de las moléculas del gas,  $N_A$  es el número de Avogadro,  $dn/dc$  es la variación del índice de refracción del gas con su concentración,  $\lambda_0$  es la longitud de onda de la luz incidente,  $I_0$  es la intensidad del haz de luz incidente,  $r$  es la distancia de observación y  $\theta$  es el ángulo al que se ha efectuado tal observación. Un aspecto importante de esta ecuación es que implica una dependencia angular de la intensidad difundida por las partículas.<sup>16</sup>

En la práctica se suele preferir expresar la intensidad difundida ( $I$ ) de forma que sea independiente de las condiciones experimentales, tales como la distancia de observación ( $r$ ) y la intensidad del haz incidente ( $I_0$ ). Para ello se utiliza en los experimentos de difusión de luz la llamada *relación Rayleigh*:

$$R_0 = \frac{I r^2}{I_0} \quad [B.57]$$

Ecuación, que trasladada a la B.56 nos da:

## Apéndice B

---

$$R_{\theta} = \frac{4\pi^2 Mc}{\lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad [\text{B.58}]$$

El caso más interesante para el estudio de macromoléculas o agregados va a ser el de las disoluciones. En una disolución habrá que tener en cuenta no sólo las fluctuaciones de densidad, sino también las fluctuaciones de concentración. En disoluciones diluidas se puede considerar que las fluctuaciones de densidad son esencialmente similares a las existentes en el disolvente puro. De esta forma el exceso de intensidad difundida por la disolución con relación al disolvente puro tiene su origen únicamente en las fluctuaciones de concentración de la misma. Podemos definir entonces la relación Rayleigh del soluto como:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{disolución}} - R_{\theta, \text{disolvente}} \quad [\text{B.59}]$$

$R_{\theta}$  puede ser calculado usando un método de calibración con un patrón externo, por ejemplo, tolueno, benceno,....<sup>17</sup>

$$\Delta R_{\theta} = \frac{I_{\text{disolución}} - I_{\text{disolvente}}}{I_{\text{estándar}}} \times R_{\text{estándar}, 90^{\circ}} \quad [\text{B.60}]$$

( $R_{\text{tolueno}, 90^{\circ}} = 2,52 \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 532 nm;  $R_{\text{benzeno}, 90^{\circ}} = 8,51 \cdot 10^{-6} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 633 nm).<sup>18</sup>

La teoría de fluctuaciones de Debye junto con la ecuación de Gibbs-Duhem<sup>19</sup> permite llegar a la siguiente expresión para la relación de Rayleigh del soluto:

$$\Delta R_{\theta} = \frac{4\pi^2 n_1^2 k T \bar{V}_1 c}{\lambda_0^4} \frac{(dn/dc)^2}{(\partial \mu_1 / \partial c)_T} (1 + \cos^2 \theta) \quad [\text{B.61}]$$

en esta expresión  $n_1$  es el índice de refracción del disolvente,  $\bar{V}_1$  es el volumen molar parcial,  $(dn/dc)$  es el incremento específico del índice de refracción de la disolución con respecto a su concentración  $c$ , y  $\mu_1$  es el potencial químico del disolvente. Como sabemos existe una relación termodinámica entre el potencial químico del disolvente y la presión osmótica de la disolución, y a su vez la presión osmótica se puede expresar como una serie de potencias de la concentración en lo que se conoce como desarrollo del virial. Se puede así transformar la ecuación en una expresión más útil,

$$\frac{Kc(1 + \cos^2 \theta)}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \quad [\text{B.62}]$$

donde  $M$  es el peso molecular del soluto;  $A_2, A_3, \dots$ , son el segundo, tercer..., coeficientes del virial y  $K$  es una constante que engloba las características ópticas del sistema y viene definida por:

$$K = \frac{4\pi^2 n_1^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad [B.63]$$

La ecuación *B.62* es la expresión general para la difusión Rayleigh de una disolución real de partículas cuyas dimensiones son mucho más pequeñas que las de la longitud de onda de la radiación incidente, cuando se utiliza luz no polarizada. Obsérvese que en una disolución diluida (en la que se pueden despreciar los términos del desarrollo del virial superiores al segundo) una representación del primer término frente a la concentración nos daría una recta, de cuya ordenada en el origen se obtendría el peso molecular  $M$  del soluto; y  $A_2$  de su pendiente. Desgraciadamente, en las disoluciones de macromoléculas se presentan frecuentemente dos particularidades, como son la polidispersidad y el tamaño no despreciable de las partículas del soluto con respecto a la longitud de onda de la radiación incidente, que no se tienen en cuenta en la ecuación *B.62*.

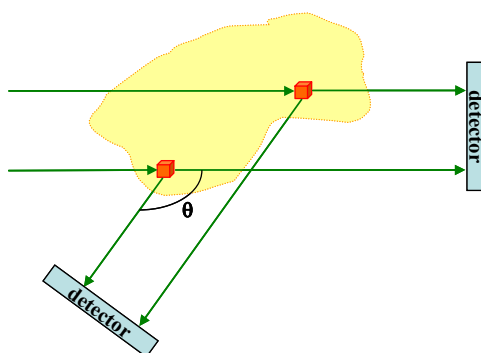
La mayor parte de las muestras macromoleculares presentan, por las características de su síntesis, una distribución de pesos moleculares. En una disolución de partículas de este tipo cada componente contribuirá a la relación de Rayleigh total del soluto  $\Delta R_\theta$ , que será la suma de todas las contribuciones particulares. De esta forma, al aplicar la ecuación *B.62* obtendremos en realidad un peso molecular promedio. De forma que para este tipo de sistemas debemos escribir esta ecuación en la forma:

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad [B.64]$$

donde el término  $(1 + \cos^2 \theta)$  se ha incluido en la constante  $K$ , ya que siempre se mide a un ángulo fijo.

La segunda particularidad es más difícil de tratar. La ecuación *B.64* sólo puede aplicarse a partículas cuyo tamaño es muy inferior al de la longitud de onda de la radiación incidente (difusión Rayleigh), puesto que cuando las dimensiones de las partículas son superiores a  $\lambda_0/20$ , caso habitual en macromoléculas, no se puede considerar que éstas se comportan como dipolos puntuales. Para este tipo de partículas se produce una disminución de la intensidad difundida por la disolución conforme aumenta el ángulo de observación, puesto que las diferencias de camino óptico de los rayos difundidos por las diferentes partes de la macromolécula

aumentan conforme éste lo hace, es lo que se denomina el efecto Mie (véase la figura B.49). Por el contrario, no se producen desfases en la dirección de propagación ( $\theta = 0$ ), generándose así una disimetría angular. Esta es la denominada difusión Debye. En estas condiciones, si queremos obtener la información correspondiente al peso molecular y al coeficiente del virial del soluto en la disolución mediante la ecuación B.64, va a ser necesario extrapolar a ángulo nulo los valores experimentales de  $Kc/\Delta R_\theta$ .



**Figura B.49.-** Interferencias intramoleculares de la luz difundida por diferentes puntos de una cadena macromolecular para ángulos de observación distintos de cero.

El efecto de la disimetría angular sobre la intensidad de luz difundida se describe mediante la llamada función de forma de la macromolécula  $P(\theta)$ , que se define como el cociente entre la intensidad de luz difundida realmente por la disolución en una dirección dada y la intensidad que se observaría en ausencia de las interferencias intermoleculares:

$$P_\theta = \frac{I_\theta}{I_{\theta=0}} \quad [B.65]$$

La función  $P(\theta)$  es igual a 1 cuando  $\theta = 0$ , y disminuye conforme aumenta el ángulo de observación para moléculas de tamaño comparable a la longitud de onda de la radiación incidente. Teniendo en cuenta este factor de corrección, sustituyendo  $\Delta R_\theta$  (sin interferencias) dado por la ecuación B.65 en la ecuación B.64:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \frac{1}{P(\theta)} \quad [B.66]$$

donde  $P_{\theta}$  es el factor de estructura que tiene en cuenta la luz difundida desde diferentes puntos en la misma molécula o un agregado molecular.  $P_{\theta}$  puede evaluarse a través de la ecuación:<sup>20</sup>

$$\frac{1}{P_{\theta}} \approx 1 + \frac{16\pi^2 n_1^2 \langle R_g^2 \rangle}{3\lambda^2} \text{sen}^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad [B.67]$$

donde  $\langle R_g^2 \rangle$  es el radio de giro cuadrático medio.

Finalmente la ecuación general que describe la distribución de la intensidad de luz difundida, en función de la concentración y del ángulo de observación, por una disolución de partículas de tamaño comparable a la longitud de onda de la radiación incidente viene dada por:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2 n_1^2 \langle R_g^2 \rangle}{3\lambda_0^2 M} \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} + 2A_2c + \dots \quad [B.68]$$

En consecuencia, si deseamos obtener mediante difusión de luz las tres magnitudes básicas  $M$ ,  $A_2$  y  $\langle R_g^2 \rangle$  es necesario efectuar una doble extrapolación. Si extrapolamos los valores de  $Kc/\Delta R_{\theta}$  a concentración nula, según la ecuación B.68 obtendremos una recta de cuya ordenada en el origen podremos obtener  $M$  y de cuya pendiente obtendremos  $\langle R_g^2 \rangle$ . Si extrapolamos a ángulo de observación cero entonces  $P(\theta)$  es igual a la unidad y la ecuación B.68 se transforma en la ecuación B.64, lo que nos permite obtener de nuevo  $M$  y  $A_2$ . Se suele denominar vector de dispersión a:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad [B.69]$$

Aunque todo esto es incorrecto para disoluciones de concentración finita, donde aparecen efectos de interferencia resultantes de que ahora la distancia entre partículas tiene un papel determinante en la intensidad de luz dispersada, estas contribuciones se describen mediante un factor de estructura  $S(q,c)$ , tal que la intensidad dispersada venga ahora dada por:<sup>21</sup>

$$\Delta R_{\theta} = KcMP(q)S(q,c) \quad [B.70]$$

En esta última ecuación se resumen las peculiaridades de una disolución de partículas de tamaño grande y de concentración elevada.

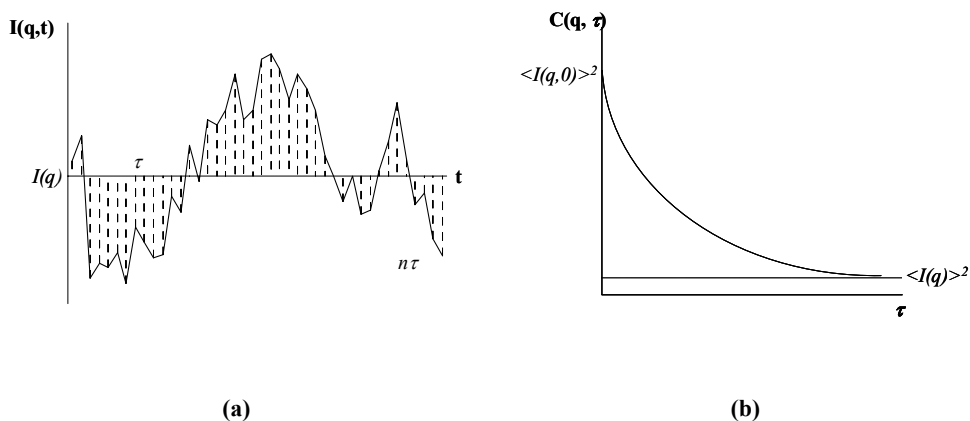
#### **B.4.b.- Difusión Dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS)**

La luz es dispersada por la interacción de los electrones con la radiación incidente (sólo se considerará aquí el componente eléctrico). El campo eléctrico oscilante causa una vibración en los electrones convirtiéndolos en dipolos oscilantes. Estos dipolos reemiten radiación. Conforme los electrones se mueven, la frecuencia de radiación es modificada a frecuencias más altas o más bajas dependiendo de su velocidad y dirección relativa al detector (efecto Doppler). El movimiento browniano modifica las distancias que existen entre el detector y las partículas difusoras, que son ahora una función del tiempo. En consecuencia, la luz difundida puede interferir constructiva o destructivamente dependiendo de la distancia que viaja hasta el detector. El resultado es un valor medio de la intensidad difundida que llega al detector, sobre la que se superponen una serie de fluctuaciones.

Los tiempos de relajación de las fluctuaciones están relacionados con las constantes de difusión, y en consecuencia, con los tamaños de las partículas. Las partículas pequeñas, que se mueven más rápidamente presentan unos tiempos de relajación más cortos que las partículas grandes, que se mueven más lentamente. Los tiempos de relajación de las fluctuaciones se pueden determinar tanto en el dominio de las frecuencias (usando un analizador espectral) o en el dominio del tiempo (usando un correlador). A este fenómeno se le conoce como difusión de luz cuasielástica y su estudio se ha convertido en el método clásico de determinación de coeficientes de difusión translacionales de macromoléculas en disolución. En esencia los equipos de difusión de luz cuasielástica tienen un diseño similar a los de difusión de luz clásica (véase la *figura B.50*), simplemente el fotomultiplicador está conectado a un correlador numérico con un gran número de canales (por encima de 500) que permiten tomar medidas en tiempos muy cortos (inferiores a las centésimas de  $\mu\text{s}$ ).

En un experimento típico de dispersión dinámica de luz, el detector mide la intensidad de luz dispersada en un determinado periodo de tiempo en intervalos de tiempo del orden de los  $10^{-7}\text{s}$ , lo que permite comparar la intensidad dispersada con un cierto desfase. La intensidad de luz dispersada presenta una fluctuación entorno a un valor medio debido al movimiento browniano.

Para poder usar estas fluctuaciones en nuestro beneficio es necesario representarlas en la manera conveniente. En este caso se hace uso de la autocorrelación. En estadística la autocorrelación de una serie temporal es simplemente la correlación de dicho proceso con una versión desplazada en el tiempo de esa propia serie temporal, ese desplazamiento temporal se conoce como desfase,  $\tau$ . La autocorrelación es una técnica muy recurrida en el procesado de señales, en la que dada una señal dependiente del tiempo, la autocorrelación continua de la señal es la correlación cruzada de la señal consigo misma tras un desfase de tiempo. Aunque no es lo mismo el proceso de autocorrelación se asemeja a otro que se denomina convolución. En esta sección, sólo estamos interesados en la dependencia temporal de las fluctuaciones, por lo que no se entrará en detalle en el tratamiento matemático necesario.



**Figura B.50.-** Ilustración esquemática de la medida de intensidad y de la función de autocorrelación correspondiente en DLS: **(a)** variación de la intensidad de la luz difundida con el tiempo; **(b)** variación de la función de correlación con el tiempo de decaimiento.<sup>22</sup>

La variación de la intensidad con el tiempo contiene información del movimiento aleatorio de las partículas y puede ser usado para medir los coeficientes de difusión de las partículas. Con la medida de los tiempos de difusión podemos determinar el tamaño de las partículas.

## Apéndice B

---

Consideremos que  $I_{q,t+\tau}$  es el número de fotones que llegan al detector en el intervalo de tiempo  $\tau$ . La función de correlación se construye multiplicando el número de fotones de dos intervalos sucesivos y almacenando el resultado, este proceso se repite unas  $10^5$ - $10^6$  veces dando lugar a una buena aproximación de la medida.

$$C(q, \tau) = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(q, t) I(q, t + \tau) dt = \langle I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \rangle \quad [B.71]$$

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} C(q, \tau) = \langle I(q, 0) \rangle^2 \quad [B.72]$$

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} C(q, \tau) = \langle I(q) \rangle^2 \quad [B.73]$$

La función de correlación tiene su valor máximo para  $t=0$  (donde todavía no se han producido un número considerable de colisiones entre las moléculas), mientras que cuando el desfase temporal es grande desaparece la correlación, y la función de correlación es igual al valor medio de la intensidad al cuadrado. Por lo que se obtiene que la función de correlación desciende asintóticamente desde  $\langle I(q, 0) \rangle^2$  a  $\langle I(q) \rangle^2$ . De este modo se obtiene una función de autocorrelación normalizada:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q) \rangle^2} \quad [B.74]$$

Esta función de correlación de la intensidad de luz dispersada se relaciona con la función de correlación del campo eléctrico dispersado mediante la relación de Siegert, bajo la suposición de una distribución gaussiana para el perfil de intensidad.

$$g_2(q, \tau) = \langle I(q) \rangle^2 + b \cdot g_1(\tau) \cdot \langle I(q, 0) \rangle^2 \quad [B.75]$$

donde  $b$  es una constante instrumental que refleja desviaciones de una posible correlación ideal,  $b=1$ .

La función  $g_1(\tau)$  decae monoexponencialmente tanto para partículas pequeñas monodispersas como para grandes agregados esféricos monodispersos:

$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma\tau) = \exp(-D_0 q^2 \tau) \quad [B.76]$$

donde la constante de decaimiento viene determinada por el coeficiente de difusión  $D_0$  de la partícula.

El coeficiente de difusión  $D_0$  está relacionado de una manera sencilla con el tamaño de la partícula para las geometrías más simples como esferas, elipsoides, cilindros u ovoides estadísticos. En la mayor parte de los casos, se asume que la forma de las partículas es de tipo esférico, con lo que aplicando la relación de Stokes-Einstein, se puede obtener el diámetro hidrodinámico:

$$D_0 = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad [B.77]$$

siendo  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosidad del medio y  $D_h$  el diámetro hidrodinámico de la partícula. Esta ecuación asume que las partículas se mueven independientemente unas de otras.

Una representación de  $g_1(\tau)$  frente al desfase temporal debería dar una línea recta. Pero puede que no sea así debido a dos efectos: (i) la polidispersidad de la muestra y, (ii) las partículas no son totalmente esféricas. Para sistemas polidispersos, la ecuación debe ser integrada para todos los tamaños posibles ya que cada partícula contribuye con su propio coeficiente de difusión:

$$g_1(q, \tau) = \int_0^\infty G(q, \Gamma) \cdot \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad [B.78]$$

$G(q, \Gamma)$  es la función de distribución y puede ser evaluada por la inversa de la transformada de Laplace, como  $g_1(t)$  es la transformada de Laplace de  $G(\Gamma)$ . La técnica más común usada para obtener la inversa de la transformada de Laplace (ILT) es el método numérico CONTIN.<sup>23</sup>

Para distribuciones anchas e incluso para distribuciones estrechas (quasi-monodispersas) el valor de referencia de  $D$ , comúnmente conocido como coeficiente de difusión aparente ( $D_{ap}$ ) que se usa para cálculos puede cambiar con el ángulo de medida y con la concentración de la muestra de acuerdo con:

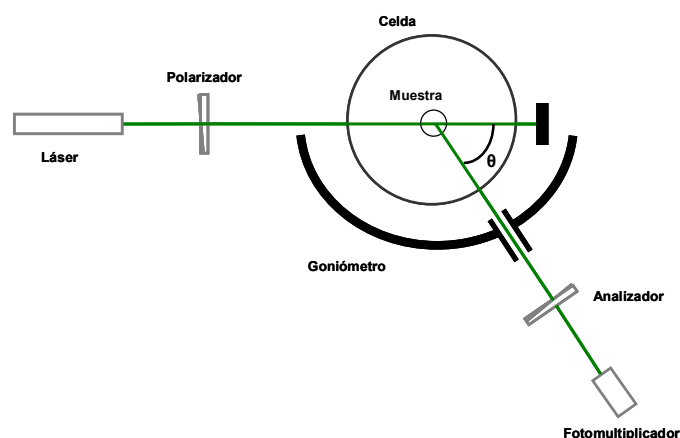
$$D_{ap} = D_c [1 + C(R_g q)^2] = D_0 (1 + k_D c) [1 + C(R_g q)^2] \quad [B.79]$$

donde  $c$  es la concentración,  $D_c$  es el coeficiente de difusión traslacional a una concentración finita,  $c$  y,  $C$  es una constante de estructura dependiente de la polidispersidad y de movimientos internos de la partícula.

En esta ecuación podemos observar que: (i)  $D_0 = \lim_{q \rightarrow 0, c \rightarrow 0} D$  y, (ii) aparece una dependencia con  $q^2$  similar a las medidas de dispersión estática de la luz. Por lo tanto  $D_{ap}$  se puede representar de la misma manera que los datos de las medidas de estático. En contraste con la representación de Zimm estático a este nuevo tipo de representaciones se les denomina representación de Zimm dinámico.

#### **B.4.c.- Equipos utilizados**

Para las medidas SLS y DLS se ha utilizado un instrumento de la casa Brookhaven constituido de un correlador digital BI-2030AT con 136 canales y un goniómetro BI-200SM. La fuente utilizada es un láser Uniphase en estado sólido (modelo 4601) que opera a una longitud de onda de 532 nm. Las muestras en estudio se filtran en primer lugar para eliminar impurezas no deseadas, principalmente polvo, que pueden provocar una distorsión en la función de correlación. Para tal propósito se ha utilizado una unidad de filtración (BIUU1). El rayo láser se enfoca desde una lente L1 en una celda inmersa en un baño térmico a la temperatura de  $25,0 \pm 0,5$  °C. La luz difusa pasa a través de dos rendijas P1 y P2, y es enfocada desde una lente L2 sobre un fotomultiplicador puesto sobre un brazo rotante entorno a la celda de la muestra. El ángulo de difusión se selecciona rotando oportunamente el brazo, tal rotación se controla desde el goniómetro. La luz difusa que se transforma en impulsos eléctricos en el fotomultiplicador conserva las fluctuaciones de la intensidad y por tanto de las propiedades dinámicas del sistema en estudio. La señal se muestra en un intervalo de tiempo (tiempo de muestreo) pequeño respecto al tiempo de fluctuación. La intensidad de la luz difusa registrada en cada uno de estos intervalos de tiempo, fluctúa en torno a un valor medio de intensidad. Después de la amplificación, la señal se transmite a un correlador que hace un análisis temporal de las fluctuaciones de la intensidad multiplicando el número de fotones que llegan en dos intervalos de tiempo sucesivos. Tal procedimiento se repite cerca de 100000 veces y se memoriza en el canal  $j$ -ésimo del correlador (correspondiente a un valor elegido del intervalo de tiempo  $\tau$ ).



**Figura B.51.-** Esquema de un dispositivo experimental destinado a la determinación de intensidades de luz difundidas por líquidos y disoluciones a distintos ángulos de observación.

## B.5.- OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS

### B.5.a.- Técnica experimental. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 utiliza como fuente de iluminación un haz electrónico que es dirigido y focalizado mediante lentes electromagnéticas. Este proceso se realiza en el interior de una columna en condiciones de alto vacío, de forma que los electrones acelerados siguen trayectorias rectas salvo si interaccionan con los átomos presentes en la muestra. El choque de los electrones con los átomos de la muestra provoca que éstos pierdan velocidad y varíen su trayectoria. Los electrones que no chocan con la muestra se proyectan sobre una pantalla fluorescente, placa fotográfica o CCD de una cámara, formando imágenes reales. Al formarse la imagen las zonas que más desvían los electrones aparecerán más oscuras que las que desvían menos. La magnitud de cambio de la trayectoria y pérdida de energía aumenta con el número atómico por lo que en las muestras biológicas compuestas por C, H, O, N, S esas diferencias son escasamente apreciables. Por este motivo a veces es necesario realizar

tinciones que introducen átomos pesados (Os, U, Pb, etc.) selectivamente en determinadas partes de la muestra.

A medida que aumenta el espesor de la muestra la imagen resultante es más confusa y menos luminosa debido a la pérdida de electrones que llegan a formarla. Por este motivo, para conocer la ultraestructura de tejidos éstos deben ser procesados a fin de obtener secciones ultrafinas (60 nm) que se puedan visualizar en el TEM.

En cuanto al procesamiento de las muestras, se depositó una gota de la disolución a estudiar sobre una rejilla de Níquel provista de película de Formvar. Al cabo de 10 minutos se retira el exceso de líquido absorbiéndolo mediante papel de filtro; se deja secar al aire la rejilla durante unos minutos antes de observarlas en el microscopio.

#### **B.5.b.- Espectroscopia de Infrarrojos**

Los espectros se realizaron con un espectrómetro ABB Bomen modelo MB102, con purga de vacío.

#### **B.5.c.- Espectroscopia de Masas**

Los equipos utilizados fueron: un Micromass Autospec de tipo magnético y de alta resolución, y un equipo MALDI-TOF modelo AUTFLEX de la casa Broker.

#### **B.5.d.- Disminución de puntos de congelación por medidas de osmometría**

El equipo utilizado fue un Osmómetro de la casa Fiske.

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Ruediger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755-85.
2. Harris, R. K. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A Physicochemical View*, **1986**, Longman, Essex, UK.
3. Friebolin, H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, **1993**, 2<sup>nd</sup> Ed.; VCH, Weinheim.
4. Akitt, J. W. *NMR and Chemistry. An Introduction to Modern NMR*

- Spectroscopy* **1992**, 3<sup>th</sup> Ed.; Chapman & Hall, London, UK.
5. Chang, C.-H.; Franses, E. I. *Colloids Surfaces, A* **1995**, *100*, 1-45.
  6. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, **1989**, 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley, New York.
  7. Mysels, K. J.; Florence, A. T. *J. Colloid. Interface Sci.* **1973**, *43*, 577-82.
  8. Weiner, N. D.; Flynn, G. L. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 2480-3.
  9. Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescent Spectroscopy. Principles*, **1991**, New York, Plenum Press.
  10. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **1999**, Kluwer Academic.
  11. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, **1991**, University Science Book.
  12. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, **2002**, Wiley-VCH.
  13. Crosby, G. A.; Demas, J. N. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024.
  14. Murphy, R. M. *Current Opinion Biotech.* **1997**, *8*, 25-30.
  15. Chu, B. *Laser Light Scattering*, **1974**, Academic Press, London.
  16. Johnson, C. S.; Gabriel, D. A. *Laser Light Scattering*, **1994**, Dover Publications Inc., New York, 2-17.
  17. Coumou, D. J. *J. Colloid Sci.* **1960**, *15*, 408-17.
  18. Pike, E. R.; Pomeroy, W. R. M.; Vaughan, J. M. *J. Chem. Phys.* **1975**, *62*, 3188-92.
  19. Sun, S. F. *Physical Chemistry of Macromolecules, Basic Principles and Issues*, **1994**, Wiley-Interscience, New York, 188-215.
  20. Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. *Biophysical J.* **1996**, *71*, 1641-50.
  21. Shurtenberger, P.; Newman, M. E. *Environmental Particles, Vol. 2* **1993**, Lewis Publishers, Florida, Ed. Buffle, J.; Leeuwen, H. P. van, 37-111.
  22. Burchard, W. *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers*, Blackie Academic & Professional, Londres, *1994*, 151-214.
  23. Provencher, S. W. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2772-7.

*Se comprendere è impossibile conoscere è necessario.*

*Primo Levi*

*En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.*

*Lee Smolin*

*Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.*

*Julius Robert Oppenheimer*



