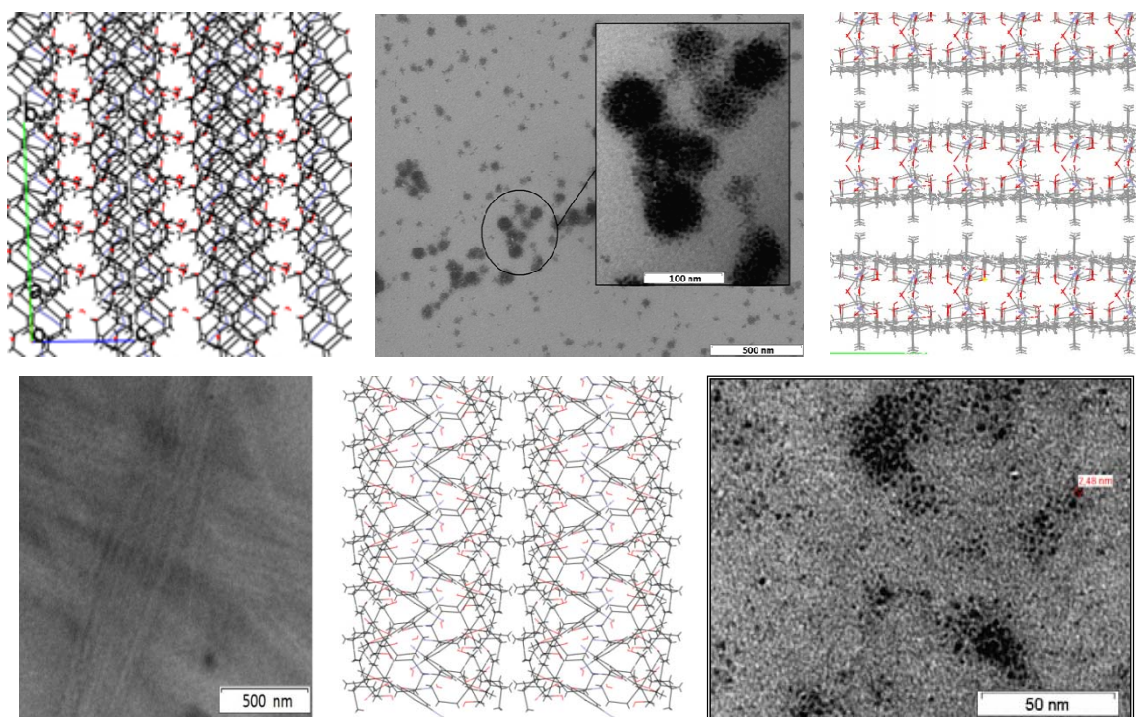


ESTRUCTURA CRISTALINA Y PROPIEDADES COLOIDALES DE ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS



Santiago De Frutos Del Río

QUÍMICA FÍSICA FACULTAD DE CIENCIAS

LUGO 2015



TESIS DOCTORAL

ESTRUCTURA CRISTALINA Y PROPIEDADES COLOIDALES DE ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS

Santiago De Frutos Del Río

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
FACULTADE DE CIENCIAS

LUGO
2015



AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE

D. José Vázquez Tato, Catedrático do Departamento de Química Física e D. Francisco Meijide del Río, Profesor Titular do Departamento de Química Física

Como Directores da tese de Doutoramento titulada

“ESTRUCTURA CRISTALINA Y PROPIEDADES COLOIDALES DE ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS”

Presentada por D. Santiago De Frutos Del Río

Alumno do Programa de Doutoramento de Ciencia e Enxeñaría dos Alimentos (R.D. 778/1998)

Autorizan a presentación da Tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Directores da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Asdo. José Vázquez Tato

Asdo. Francisco Meijide del Río

ESTRUCTURA CRISTALINA Y PROPIEDADES COLOIDALES DE ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS

RESUMO

As sales biliares son compostos con notoria relevancia na natureza. Dado o seu carácter anfífilo, actúan como surfactantes polo que teñen múltiples aplicacións en diferentes campos. Neste traballo móstrase a obtención de novos derivados das mesmas, destacando os oligómeros obtidos pola unión (vía enlaces amida) de dous a catro residuos biliares a diversas moléculas ponte bi-, tri- ou tetra-dentadas. Os novos derivados compórtanse como surfactantes polo que determináronse os parámetros característicos asociados a este comportamento como, por exemplo, a concentración de agregación crítica e a área molecular na interfase aire/auga. Mediante estudos de dispersión de luz e diversas microscopias determináronse a xeometría e o tamaño dos agregados formados, así como a súa evolución co tempo. Observáronse estruturas micelares, agregados globulares, pseudo-vesículas e fibras, así como a formación de xeles e precipitados coloidais orixinados pola condensación de partículas de menor tamaño. Así mesmo, resolvéronse diversos cristais dos novos esteroides.

PALABRAS CHAVE

ácidos biliares, oligómeros, cristales, surfactantes, concentración de agregación crítica, agregados, micelas

RESUMEN

Las sales biliares son compuestos con notoria relevancia en la naturaleza. Dado su carácter anfífilo actúan como surfactantes por lo que tienen múltiples aplicaciones en diferentes campos. En este trabajo se muestra la obtención de nuevos derivados de las mismas destacando los oligómeros obtenidos por la unión (vía enlaces amida) de dos a cuatro residuos biliares a diversas moléculas puente bi-, tri- o tetra-dentadas. Los nuevos derivados se comportan como surfactantes habiéndose determinado los parámetros característicos asociados a este comportamiento como, por ejemplo, la concentración de agregación crítica y el área molecular en la interfase aire/agua. Mediante estudios de dispersión de luz y diversas microscopias se han determinado la geometría y el tamaño de los agregados formados, así como su evolución con el tiempo. Se han observado estructuras micelares, agregados globulares, pseudo-vesículas y fibras, así como la formación de geles y precipitados coloidales originados por la condensación de partículas de menor tamaño. Asimismo, se han resuelto diversos cristales de los nuevos esteroides.

PALABRAS CLAVE

ácidos biliares, oligómeros, cristales, surfactantes, concentración de agregación crítica, agregados, micelas

ABSTRACT

Bile salts are compounds with a well known relevance in nature. Because of their amphiphilic character they are surfactants, having many applications in different fields. In this work the synthesis of new derivatives is reported. Emphasis is made on oligomers obtained by linking (connect by amide bound) from two to four bile residues to several bi-, tri-, or tetra-functionalized bridge molecules. The new derivatives behave like surfactants, having determined the typical parameters associated to this behavior as, for example, the critical concentration of aggregation and the molecular area at the interface air/water. By means of light scattering studies and diverse microscopies, the geometry and size of the formed aggregates have been determined, as well as his evolution with time. Structures like micelles, globular aggregates, vesicles and crystalline fibers have been observed, as well as the formation of gels and colloidal precipitates originated by the condensation of small particles. Likewise, some crystals (obtained by recrystallization from several solvents) of the new steroids have been solved.

KEYWORDS

Bile acids, oligomers, crystals, surfactants, critical aggregation concentration, aggregates, micelles



AGRADECIMIENTOS

A los Profesores Dr. José Vázquez Tato y Dr. Francisco Mejjide del Río por el trabajo, la dirección, la gran ayuda y la experiencia que me han brindado durante estos años.

A mi mentor en Química Orgánica, Víctor Hugo Soto Tellini. Sin sus enseñanzas, colaboración y amistad, no habría productos de los que hablar.

A mis compañeros y algo más: Juan Ventura, Cristina, Carolina, Javier, Aida y demás que, sin su apoyo, sin su esfuerzo, sin su compañía, este trabajo no se podría haber realizado.

No quisiera olvidarme de expresar mi agradecimiento al personal de los servicios de la RIAIDT de Lugo y Santiago por su trabajo y también a todas las personas que han contribuido de algún modo, por pequeño que sea el granito de arena.

Y sin duda alguna, a quien más se lo tengo que agradecer, junto con mi familia, es a la persona que más ha invertido en mí...a fondo perdido.... tiempo, paciencia y cariño,...a mi Señora.

Por último agradezco al Ministerio de Ciencia e Innovación por los proyectos MAT2001-2911, MAT2004-04606, MAT2007-61721 y MAT2010-19440, y a la Xunta de Galicia por los proyectos PGIDIT02PXIC26202PN, PGIDIT05PXIC26201PN y PGIDIT07PXIB262147PR gracias a los cuales ha sido posible desarrollar la presente investigación. Asimismo agradezco la ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (referencia BES-2008-004021) asociada al proyecto de investigación MAT2007-61721.

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Ad	Adamantano (adamantilo)
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
ar	Aromático
BOC	<i>t</i> -butoxicarbonil
CA	Ácido Cólico
<i>cac</i>	Concentración de agregación crítica
<i>cmc</i>	Concentración micelar crítica
CONTIN	Non-negatively constrained least squares: regularized
DCA	Ácido desoxicólico
DEPC	Dietilcianofosfonato
D _h	Diámetro hidrodinámico
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico o ácido gentísico
DIAD	Di-isopropil azo dicarboxilato
DIBOC	Di- <i>t</i> -Butiloxocarbonil
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DITHRANOL	1,8,9-Trihidroxiantraceno
DLS (QELS)	Dispersión de luz dinámica
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPA	Difenilfosforil azida
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
ECF	Etilcloroformiato
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI-FIA-TOF	<i>Electrospray ionization-flow injection analysis- Time Of Flight</i>
FAB	Bombardeo con Átomos Rápidos
HOBt	4-hidroxibenzotriazol
HRTEM	<i>High resolution transmission electronic microscopy</i>
HSBA	<i>Hard and Soft Acids and Bases</i>
LS	Dispersión de luz
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
MRI	Resonancia Magnética de Imagen
m/z	Relación masa/carga
NaC	Colato sódico
NaCDC	Quenodesoxicolato sódico
NaDC	Desoxicolato sódico
n _{ag}	Número de agregación

NaLC	Litocolato sódico
NNLS	Non-negatively constrained least squares: multiple pass
NaTC	Taurocolato sódico
NaTCDC	Tauroquenodesoxiolato sódico
NaTDC	Taurodesoxicolato sódico
NaUDC	Ursodesoxicolato sódico
PAMAM	Poliamido amina
PDT	Terapia fotodinámica
PPh₃ (TPP)	Trifenilfosfina
PPI	Polipropileno-imina
R_h	Radio hidrodinámico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TA	Temperatura ambiente
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
SB	Sal biliar
SDS	Dodecil sulfato sódico
σ₉₀	Polidispersidad a un ángulo de 90°
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina



ÍNDICE

Prefacio	i-iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	1
1.2 INTRODUCCIÓN A LA FISICOQUÍMICA DE COLOIDES	4
1.3 ÁCIDOS BILIARES	7
1.3.1 Colesterol	7
1.3.2 Esteroides y esteroles sintéticos.	10
1.3.3 Importancia biológica de las sales biliares	10
1.3.4 Estructura y propiedades de las sales biliares.	11
1.3.5 Formación de complejos entre ácidos biliares y metales pesados.	16
1.4 ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS	18
1.5 OLIGÓMEROS DE ÁCIDOS BILIARES	19
1.6 INTRODUCCIÓN A LAS PORFIRINAS	21
1.6.1 Estructura molecular y propiedades	21
1.6.2 Homoasociación de porfirinas en disolución acuosa	25
1.6.3 Protoporfirina IX	25
1.6.4 Meso-Tetra (4-carboxifenil) porfirina (H ₂ TCPP)	28
1.6.5 Metaloporfirinas	33
1.6.6 Antecedentes bibliográficos de esteroide-porfirinas	35
1.7 CONSIDERACIONES ESPECIALES DE LAS ESTRUCTURAS SINTETIZADAS	38
Bibliografía	39
2. ANÁLISIS DE CRISTALES DE ÁCIDOS BILIARES Y DERIVADOS.	47
2.1 INTRODUCCIÓN	47
2.1.1 Antecedentes bibliográficos	48
2.1.2 Ácido desoxicólico	48
2.1.3 Ácido cólico	51
2.1.4 Ácido 3β-amino cólico	66
2.2 RESULTADOS OBTENIDOS CON DERIVADOS MONO-SUSTITUIDOS	69
2.2.1 Monoderivado 3β-azidocolato de metilo, C-azida	69
2.2.2 Monoderivado Colato-dietilfosfato, amC-dietilfosfato	73
2.2.3 Monoderivado amC-aminoisoftálico	77
2.2.4 Mono derivado C-tereftálico	83
2.3 DÍMEROS CABEZA-CABEZA DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES	87
2.3.1 Dímero Colato-sucínico-Colato, amC ₂ -Succínico	87
2.3.2 Dímero Colato-fenilo(1,3)-Colato o amC ₂ -Isoftálico	91
2.3.3 Dímero Desoxicolato-fenil(1,3)-Desoxicolato o DC ₂ -Isoftálico	94
2.3.4 Dímero colato-urea-colato, amC ₂ -urea	97
2.4 NUEVO SISTEMA DE COORDENADAS INTERNAS PARA DÍMEROS DE ESTEROIDES	102
2.5 CÁLCULO DEL ÁREA DE LA SECCIÓN MOLECULAR DEL RESTO DE ÁCIDO BILIAR	107
Bibliografía	111
3. AGREGACIÓN DE DÍMEROS DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO	117
3.1 ÁCIDO amC ₂ -IMINODIACÉTICO	117
3.2 ÁCIDO amC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	125
3.3 DÍMERO amC ₂ -PROTOPORFIRINA	131
3.4 DISCUSIÓN COMPARATIVA DE LA AGREGACIÓN DE DÍMEROS DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES	142
Bibliografía	146

4. AGREGACIÓN DE OLIGÓMEROS DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO	149
4.1 TRÍMERO C ²⁴ ,AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	150
4.2 TRÍMERO AMC ²⁴ , AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	163
4.3 TETRÁMERO (AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO) ₂ -TEREFTÁLICO	168
4.4 TETRÁMERO AMC ₄ -TPPORFIRINA	176
Bibliografía	188
CONCLUSIONES	189
APENDICE A SECCIÓN EXPERIMENTAL.	193
A.1 SÍNTESIS DEL DÍMERO AMC ₂ -IMINODIACÉTICO	193
A.2 SÍNTESIS DEL AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	196
A.3 SÍNTESIS DEL DÍMERO AMC ₂ -PROTOPORFIRINA	198
A.4 SÍNTESIS DEL TRÍMERO C ²⁴ ,AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	200
A.5 SÍNTESIS DEL TRÍMERO AMC ²⁴ ,AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO	203
A.6 SÍNTESIS DEL TETRÁMERO (AMC ₂ -AMINOISOFTÁLICO) ₂ -TEREFTÁLICO	204
A.7 SÍNTESIS DEL TETRÁMERO AMC ₄ -TPPORFIRINA	206
Bibliografía	208
APENDICE B TÉCNICAS INSTRUMENTALES	209
B.1 TENSIÓN SUPERFICIAL	209
B.2 DISPERSIÓN DE LUZ	218
B.3 MICROSCOPIA	223
B.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	226
B.5 OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS	227
Bibliografía	228

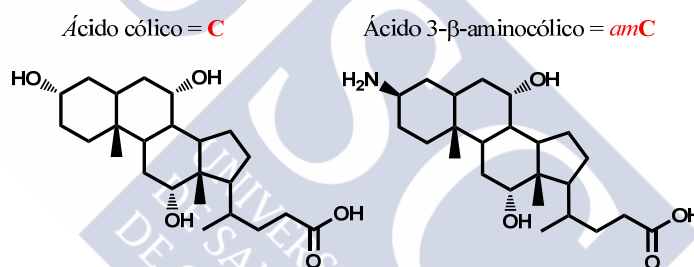


PREFACIO

La presente tesis doctoral se ha desarrollado en el Grupo de Investigación “Química Supramolecular y Fisicoquímica de Coloides”, Grupo GI-1589, ubicado en el campus de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela. Dentro del amplio campo de investigación que abarca este grupo, el objetivo del autor se ha centrado en la búsqueda de nuevos surfactantes, y de alguna forma ahondar en los mecanismos y parámetros que conducen a una molécula a asociarse para formar unidades de orden superior. Sin menospreciar otras familias de compuestos, únicamente se presentará en esta tesis el trabajo realizado con derivados de ácido cólico, aunque en algún momento aparecerá el ácido desoxicólico.

El papel principal de los ácidos biliares de partida en la naturaleza es actuar como detergentes, por consiguiente los nuevos derivados sintetizados presentan propiedades asociativas. Se han obtenido resultados muy diversos, “simplemente” para monoderivados, en cuanto a la estructura de los agregados formados en disolución, a la capacidad de formar geles y cristales líquidos o incluso a la solubilidad del compuesto. Cuando se trata de estructuras de carácter polimérico con ácidos biliares, los estudios del comportamiento en disolución acuosa son escasos y esto motivó el estudio del comportamiento de los compuestos sintetizados tanto en estado sólido como en disolución.

Las estructuras moleculares generadas que se presentaran son casi exclusivamente de carácter polimérico lo que conlleva una nomenclatura IUPAC demasiado extensa y compleja para una lectura fluida del texto por lo que el autor se ve obligado a emplear una terminología especial más abreviada.



La letra C estará relacionada el ácido cólico ya que es un acrónimo comúnmente utilizado en numerosas publicaciones. Dado que en la gran mayoría de moléculas que aparecerán a lo largo de este trabajo resultan de la unión del éster del ácido 3-β-aminocólico se utilizarán las siglas *amC* omitiendo la posición del grupo amino ya que es la misma en todos los casos. En aquellos casos en que se trabajó con la molécula de ácido desoxicólico (que se denominará DC) ha de tenerse en cuenta que no existen grupos amino (en posición 3-β) a través de los que se formen enlaces amida al puente (o a un grupo sustituido) sino que se forman enlaces tipo éster entre el hidroxilo en posición 3-α y un ácido carboxílico del puente de unión. A la hora de componer el nombre de las distintas estructuras moleculares el subíndice indicara la estequiometría y el superíndice indicara la posición de unión del resto de esteroide al puente de unión pero se omitirá en todos los casos en el que sea a través de la posición 3 para simplificar. Por consiguiente solo aparecerá el superíndice en los casos en que la molécula contenga un resto de esteroide unido por una posición distinta. A continuación, el puente o la estructura polidentada, se abreviará con el nombre de la molécula de partida o el acrónimo correspondiente en caso de tenerlo. Así por ejemplo, el ácido 4-{3-[2-({17-(3-Carboxi-1-metil-propil)-7,12-dihidroxi-10,13-dimetil-hexadecahidro-ciclopenta[a]fenantren-3-ilcarbamoil)-metil}-amino)-acetilamino]-7,12-dihidroxi-10,13-dimetil-hexadecahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-il}-pentanoico pasará a llamarse ácido *amC₂-iminodiacético*. No cabe duda que resulta un texto menos engorroso para el lector. En apoyo de esta propuesta, cabe citar el compuesto 2,5,8,15,18,21-hexaoxatriciclo[20.4.0^{9,14}]hexacosal(22),9,11,13,-23,25-hexaeno que, en la actualidad, todo el mundo conoce como éter-18-corona-6, nombre que ya es un estándar en la bibliografía científica.

- El capítulo 1 estará dedicado a una introducción para exponer conceptos generales, algunos más específicos, que hacen de pilares sobre los que se apoya el trabajo realizado.

- El capítulo 2 se centrará en el estudio de la estructura cristalina tanto de monoderivados (*Figura p.1*) como de dímeros (*Figura p.2*) de ácidos biliares pero previamente se hará una introducción acerca de la relevancia del estudio de la estructura cristalina de esteroides y su potencial.

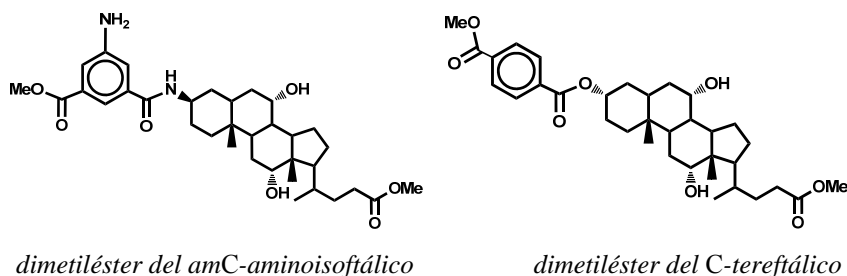


Figura. p.1. Estructuras y nomenclatura de los mono derivados del ácido cólico que se presentan en el capítulo 2.

Dada la complejidad de las nuevas estructuras generadas, a la hora de describir la conformación que adquieren en estado sólido cristalino, se mostrara un sistema de coordenadas recientemente publicado por este grupo de investigación para describir la posición relativa de los restos de esteroide respecto al puente de unión independientemente de su estructura. Para terminar este capítulo, el autor mostrará el método empleado para el cálculo del área de la sección molecular (la sombra de la molécula proyectada sobre un plano) de los productos que no se han conseguido cristalizar hasta el momento.

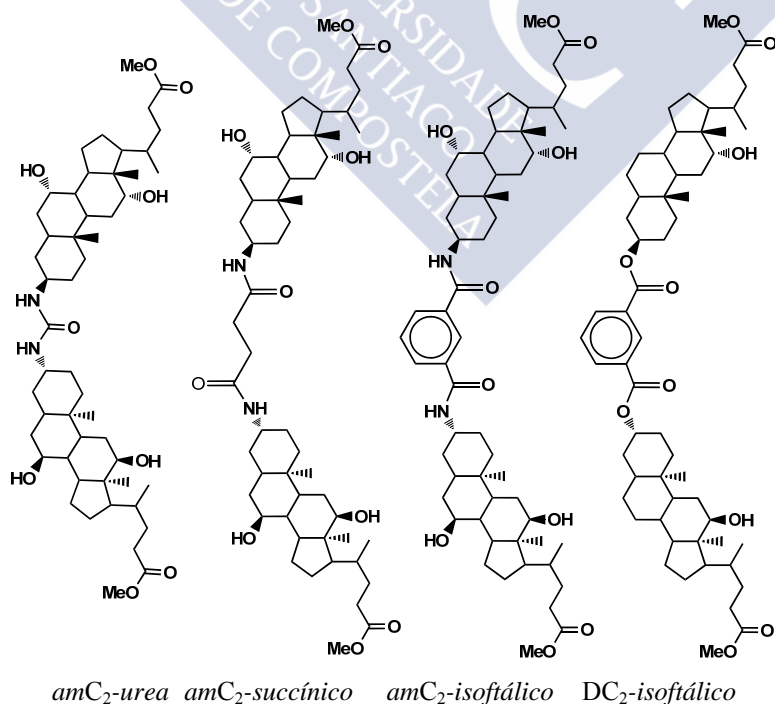


Figura p.2. Estructuras y nomenclatura de los esteres de dímeros derivados del ácido cólico y desoxicólico que se presentan en el capítulo 2.

- En el capítulo 3 se inicia el estudio de las propiedades asociativas de compuestos surfactantes derivados del ácido cólico, comenzando con aquellos de carácter dimérico (*Figura p.3*), cuando se encuentran en disolución acuosa. El estudio incluye tanto medidas de tensión superficial, como los resultados obtenidos por microscopía y dispersión de luz laser.

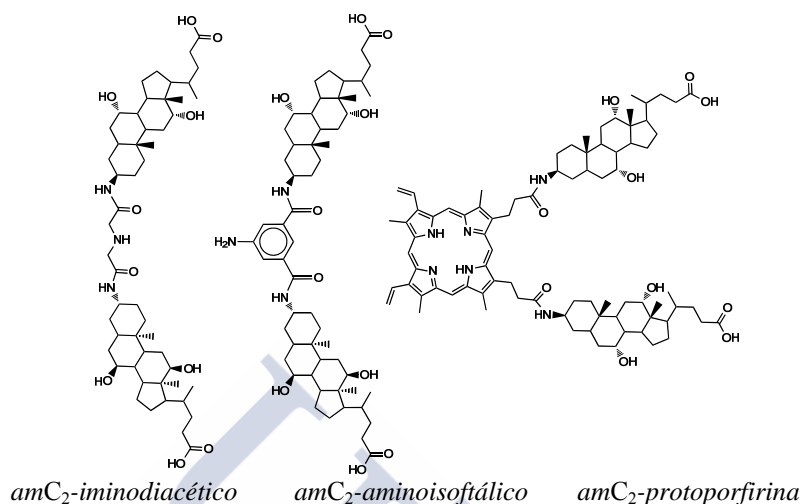


Figura p.3. Estructuras de los dímeros derivados del ácido cólico utilizando como puente de unión el ácido iminodiacético, ácido aminoisoftálico y la protoporfirina (IX).

- El capítulo 4 continúa con el estudio de las propiedades asociativas en disolución acuosa presentando los resultados obtenidos para trímeros (*Figura p.4*) y tetrámeros (*Figura p.5*) derivados del ácido cólico.

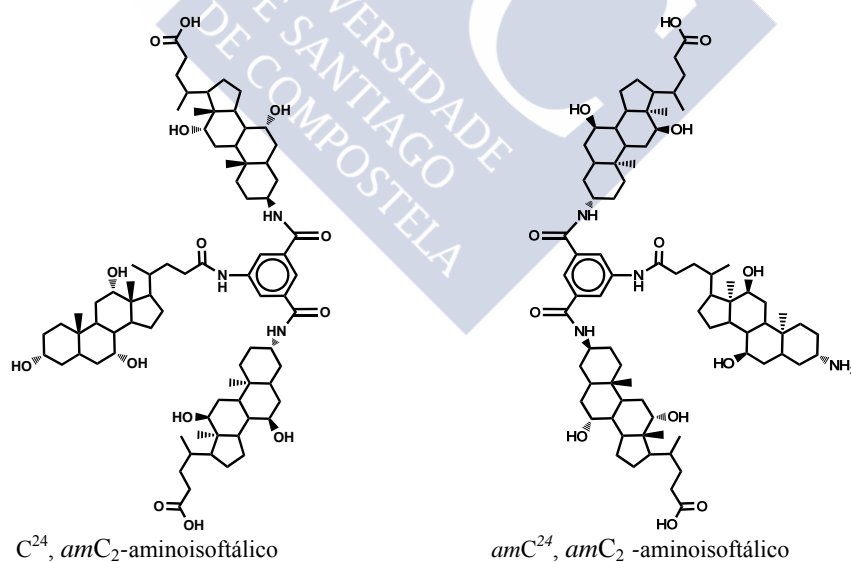


Figura p.4. Estructuras de los trímeros derivados del ácido cólico utilizando como puente de unión el ácido aminoisoftálico.

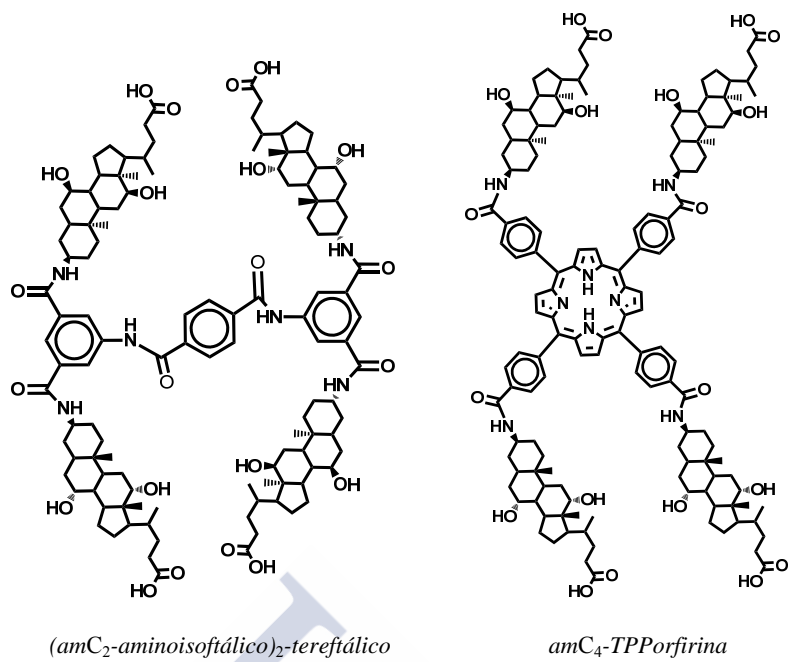


Figura p.5. Estructuras de los tetrameros derivados del ácido cólico.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

La célula es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. Todos los organismos vivos, desde el más grande (la gran ballena azul con 33 metros de longitud y 190 toneladas) al más pequeño (la bacteria *Mycoplasma* con menos de 1 μm) están compuestos por células (o la célula en el caso de organismos unicelulares) que forman todos los elementos estructurales, controlan el metabolismo y los innumerables procesos biológicos para el correcto funcionamiento del organismo. Los procesos realizados en las células que han dado lugar a la vida, como las reacciones metabólicas, el aislamiento del entorno, el transporte de oxígeno y energía, la fotosíntesis, la duplicación del ADN... tienen lugar a escala molecular, es decir, a escala nanométrica, mil veces menor que la escala micrométrica de las células.

Es, a esta escala, dónde en las últimas décadas se han producido los avances científicos más relevantes que, sin duda, marcan el camino hacia el futuro en campos tan importantes como la medicina, la electrónica, la robótica, los materiales y la industria en general. Los frutos tecnológicos derivados de estos avances, abarcan desde un sistema completo de computación, transistores, nanoestructuras generadas por moléculas de distintas especies (criptandos, tubos, vesículas, máquinas moleculares...) hasta nuevos materiales a partir del carbono como los nanotubos o el grafeno. En último término, estas investigaciones tendrán como resultado una reducción significativa en las necesidades de recursos y energía. Estos dos conceptos de ahorro, son clave para el futuro de la humanidad. La *Figura 1.1* ilustra una representación esquemática de los micro- y nanomundos.

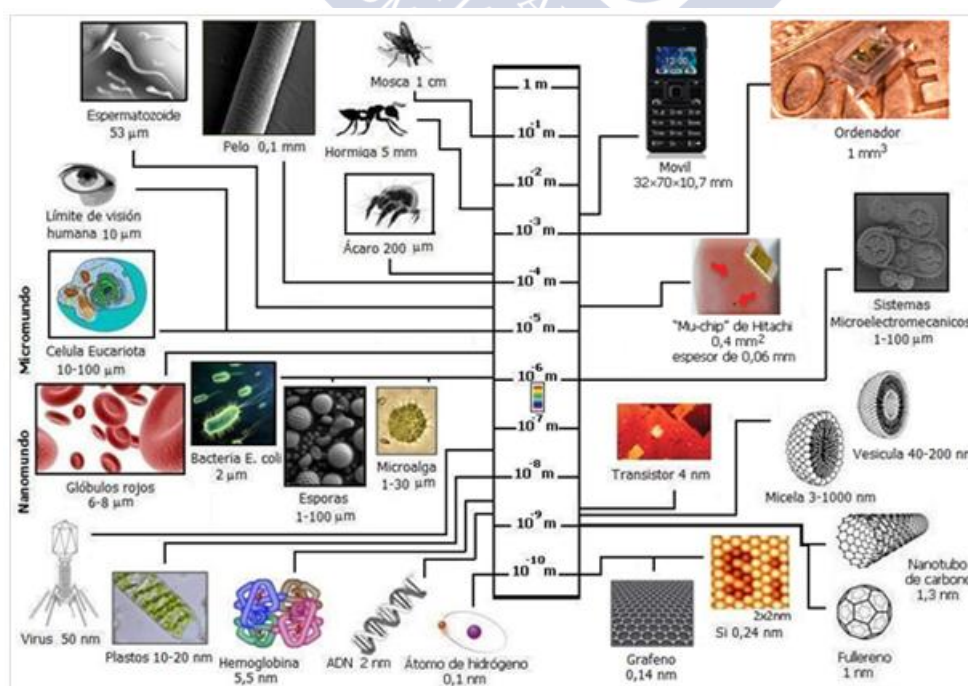


Figura.1.1. Representación esquemática del micromundo y nanomundo.

La *Química supramolecular*¹⁻² investiga la estructura y transformación de la materia sobre la base de la auto-organización y el reconocimiento molecular, mecanismos que han estado implicados a lo largo del proceso evolutivo de los seres vivos, tanto de forma estructural como funcional. El término *supramolecular* adquirió su actual significado en 1978 al ser acuñado por Jean-Marie Lehn,¹ aunque ya había sido utilizado con anterioridad,³ y viene a significar *más allá de la molécula*. Trata del estudio de las interacciones entre dos o más moléculas que, sin formar enlace químico covalente entre ellas, son capaces de originar asociaciones moleculares dinámicas, más flexibles y termodinámicamente más lábiles que las entidades moleculares. La evolución ha sido motor de la curiosidad científica durante décadas y esto ha hecho que *esta química más allá de la molécula* sea una puerta para mirar al pasado, explorar el presente y plantear conceptos y objetivos más ambiciosos para el futuro.⁴ Como consecuencia, está Química está empezando a ser conocida como *Química de la información*.

Desde el principio del universo la materia ha evolucionado desde materia amorfa hacia una materia condensada y organizada, originando la vida y, finalmente, la materia inteligente. El camino seguido, de una complejidad creciente, ha discurrido a través de la organización mutuamente interrelacionada (incluyendo la auto-organización) y, consiguientemente, el reconocimiento mutuo. Como Lehn ha hecho notar,⁴ de aquí surgen las preguntas primordiales de la química. La Química, entendida como ciencia de la estructura y transformación de la materia, está en una posición inigualable para responder esas preguntas: ¿Cómo hace la materia para volverse compleja? ¿Cuáles son los pasos y procesos que llevan desde una partícula elemental a un organismo inteligente (la entidad de mayor complejidad de la naturaleza)? ¿Qué otras formas de materia compleja pueden llegar a crearse?

Desde que, en 1828, Friedrich Wöhler desarrolló la síntesis de la urea, la química molecular ha desarrollado una gran cantidad de sofisticados métodos para la construcción de estructuras moleculares cada vez más complejas, los cuales implican la ruptura y creación de enlaces covalentes entre átomos en posiciones controladas y precisas, haciendo que la obtención de nuevos compuestos haya crecido espectacularmente, consiguiendo numerosos éxitos en los que se combinan elegancia, eficiencia y selectividad. En definitiva, esta química *molecular* se centra en la química del enlace covalente.

En cambio, en la *Química supramolecular* son las fuerzas intermoleculares no-covalentes las que juegan un papel fundamental al ser las responsables de la formación de las denominadas *supermoléculas* y de los sistemas de organización polimoleculares. Es decir, así como la *Química molecular* se basa en el enlace covalente, la *Química supramolecular* tiene como objetivos a las asociaciones moleculares y al enlace intermolecular (*Figura.1.2*).

En definitiva, la *Química supramolecular* estudia entidades organizadas que resultan de la asociación de especies moleculares unidas por fuerzas intermoleculares, generando entidades de mayor complejidad. Por lo tanto, el fenómeno de reconocimiento juega un papel decisivo en la asociación y en los procesos de auto-organización. Estos sistemas supramoleculares pueden desempeñar funciones de transporte y transformación por lo que resultan muy interesantes desde los puntos de vista biológico y farmacológico.

Uno de los objetivos más atractivos de la síntesis química es la preparación de moléculas que puedan reconocer y unirse a otras o con ellas mismas para, por ejemplo, catalizar la transformación de enlaces (como enzimas artificiales), construir estructuras que permitan el transporte de moléculas, o almacenar información a nivel molecular. Dentro de este campo macromolecular, la *Química supramolecular* estudia el reconocimiento, coordinación y fijación de especies moleculares e iónicas.^{1,5} También

estudia las propiedades de las estructuras complejas generadas. Se entiende por reconocimiento molecular, incluyendo la auto-asociación, aquellos procesos de unión de dos o más entidades (moléculas, iones, átomos) por fuerzas no covalentes (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals).

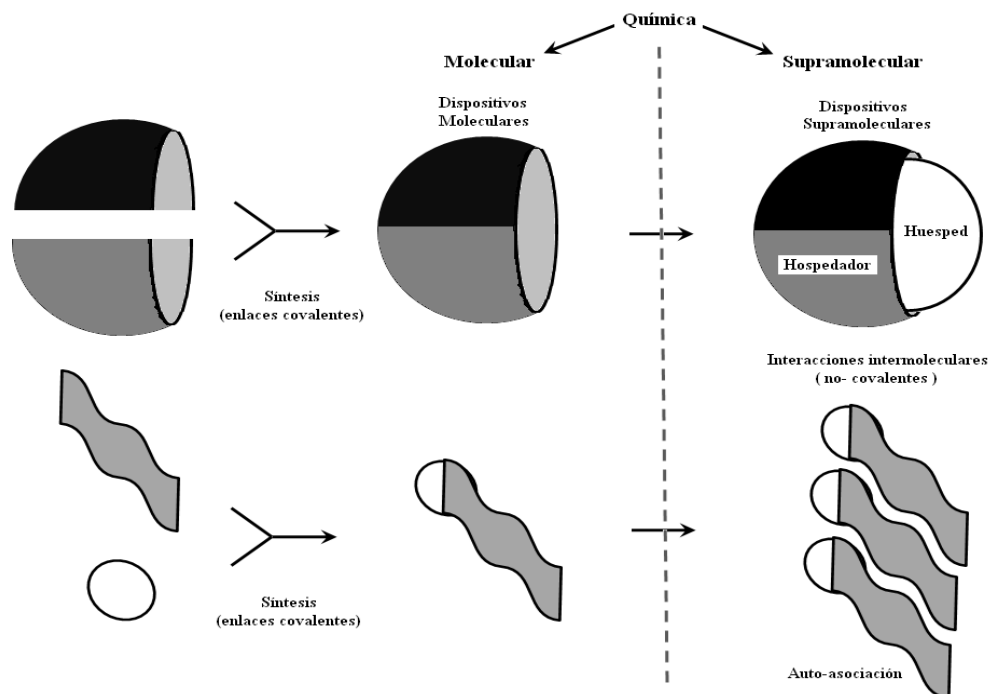


Figura 1.2. Representación de los procesos de reconocimiento y auto-organización mostrando el paso de la *Química molecular* hacia la *Química supramolecular*.

Una *supermolécula* es una molécula que se forma por interacción intermolecular entre uno o varios sustratos, algunos de los cuales actúan como receptores de los demás, lo cual requiere un reconocimiento molecular. Ejemplos especialmente interesantes son los procesos denominados de inclusión o procesos huésped-hospedador (o anfitrión), en los que el hospedador es una molécula con ciertas características estructurales que le permiten albergar en su interior, total o parcialmente, a otra molécula (huésped). Existen numerosos compuestos que dan lugar a este tipo de fenómenos; unos son de origen inorgánico (zeolitas, caolitas, clatratos, etc.), otros de origen orgánico (éteres corona, criptandos, ciclodextrinas, etc.) o también de origen natural (enzimas, almidón, etc.). Los agregados supramoleculares son los que se forman espontáneamente por una asociación de un número indeterminado de entidades moleculares dentro de un medio y se caracterizan por estructuras microscópica y macroscópica bien definidas. Pueden formar membranas, micelas o fases mesomórficas con distintas propiedades cinéticas y dinámicas. Estos dos campos, el de las supermoléculas y los agregados supramoleculares, se caracterizan por los procesos de reconocimiento, el tipo de fuerzas intermoleculares que los forman y su geometría. Dado el gran número de aplicaciones que tienen, las especies macromoleculares poseen un enorme potencial industrial.

Como se ha indicado, la *Química supramolecular* se ha desarrollado como la química de las entidades generadas por interacciones intermoleculares de tipo no-covalente. A través de la correcta manipulación de estas interacciones, está evolucionando progresivamente hacia la *Química de la información molecular*, almacenando la información a nivel molecular, en la estructura de las entidades, en su formación, transformación y procesado a nivel molecular. Esta información opera a través de los

procesos basados en el reconocimiento molecular en un patrón de interacciones bien definido (enlaces de hidrógeno, secuencias de grupos donante-aceptor, coordinación iónica, etc.). Esta ciencia engloba el diseño y la investigación de receptores moleculares, capaces de unirse a sustratos con alta eficiencia y selectividad, o de generar de forma lineal o radial, polímeros supramoleculares por la auto-asociación de componentes individuales (monómeros) complementarios o por la asociación vía grupos laterales. Dada la debilidad de estas asociaciones, estos compuestos presentan características de polímeros *vivos* capaces de crecer, de encoger, de cambiar su patrón de interacción o intercambiar componentes.

Cuando se trata de macromoléculas, la asociación supramolecular puede ser de tipo intermolecular entre grandes moléculas o bien entre partes *activas* (de reconocimiento) de las mismas, localizadas en la cadena principal o en los apéndices laterales. Este último aspecto de interacción intermolecular-supramolecular es el más importante en macromoléculas biológicas y en los procesos de control del plegamiento proteico, y representa uno de los campos de investigación más importantes dentro de la *Biología*.

En definitiva, en una perspectiva a largo plazo, la química evoluciona hacia el estudio de sistemas complejos, allanando el camino del entendimiento del paso de la materia como elementos individuales a materia condensada, luego a materia organizada y adaptada como en los sistemas vivos, hasta llegar a organismos inteligentes, líderes en complejidad. El control sobre la manipulación de las interacciones intermoleculares (enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, coordinación de metales) abre las puertas de la *Ingeniería supramolecular*, del acoplamiento molecular y de los polímeros. A través de la utilización de especies monoméricas o poliméricas se llega al desarrollo de la *Química de los materiales supramoleculares*.

1.2 INTRODUCCIÓN A LA FÍSICOQUÍMICA DE COLOIDES.

En el estudio de los coloides y las macromoléculas convergen, de una forma general, tres ramas científicas: la ciencia de los coloides, la de las superficies y la de las macromoléculas. Estas disciplinas están estrechamente relacionadas entre sí haciendo que la mayoría de los trabajos que se realizan en este área tengan carácter multidisciplinar. La ciencia de los coloides estudia las propiedades químicas, físicas y mecánicas de los sistemas coloidales. La ciencia de superficies estudia los fenómenos relacionados con superficies macroscópicas. La química molecular investiga los métodos de síntesis y caracterización de macromoléculas. Las propiedades físicas de las macromoléculas como sedimentación, difusión, etc. son muy similares a las de los coloides. En general, las macromoléculas pueden considerarse como coloides o sistemas coloidales liófilos.

Los compuestos anfífilos o anfipáticos poseen dos regiones, una hidrófila, denominada cabeza, y otra hidrófoba, denominada cola. La parte hidrófoba puede estar constituida por cadenas hidrocarbonadas, anillos hidrocarbonados saturados y anillos aromáticos, y la parte hidrófila por grupos polares de diferente naturaleza como por ejemplo ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas... Atendiendo a su origen se diferencian dos tipos de compuestos anfífilos: naturales y sintéticos.

Los compuestos anfífilos naturales se obtienen directamente de una fuente natural como es el caso de los ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, lipopéptidos, lípidos fenólicos, etc. o se sintetizan a partir de una biomolécula obteniendo compuestos como los lipopolisacáridos, acilaminoácidos, etc. La estructura molecular de los denominados biosurfactantes o surfactantes naturales, es muy variada. Los ácidos grasos, por ejemplo, están constituidos por una cadena hidrocarbonada saturada o insaturada de entre 4 y 22

átomos de carbono unida a un grupo carboxílico. La estructura de los fosfolípidos posee un grupo glicerol unido a dos cadenas de ácido graso esterificado y a un grupo fosfato que a su vez, se une por enlace covalente a grupos polares como colina, etanolamina, glicerol, serina o inositol. Otros lípidos anfífilos (glicolípidos, lipopéptidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas, acilaminoácidos y lípidos fenólicos) están constituidos por cadenas hidrocarbonadas de ácido alquil carboxílico o alcoholes de cadena larga saturados o insaturados unidos a sacáridos (mono-, oligo- o polisacáridos), péptidos, proteínas, aminoácidos o fenoles.

La región hidrófoba de los surfactantes consiste, generalmente, en una o más cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, frecuentemente saturadas, de 8 a 18 átomos de carbono. Esta región hidrófoba también puede incluir anillos aromáticos. Atendiendo a la naturaleza del grupo hidrófilo se diferencian cuatro tipos de surfactantes: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros o zwitteriónicos. El número de compuestos con estructura molecular diferente dentro de cada uno de estos grupos de surfactantes es muy elevado. También existen surfactantes sintéticos con dos grupos hidrófilos situados a ambos extremos de la cadena hidrocarbonada (surfactantes bolaformes), con dos cadenas unidas a dos grupos iónicos (surfactantes *gemini*) y con grupos hidrófobos constituidos por una o más cadenas perfluoroalquiladas (fluorosurfactantes).

Otros compuestos con estructura molecular muy diferente a la de los surfactantes sintéticos y naturales, como colorantes, drogas terapéuticas, sales biliares como colato y desoxicolato sódico, también tienen carácter anfífilo. Las sales biliares son anfífilos naturales constituidos por una superficie hidrófoba convexa (anillo esteroide) y una superficie hidrófila cóncava (con uno o más grupos hidroxilo y un grupo carboxílico) como se verá con más detalle posteriormente. Las acridinas, cianinas, porfirinas, colorantes tipo azo y esquarilio son colorantes anfífilos. Determinados antibióticos, obtenidos directamente de fuentes naturales como los antibióticos peptídicos catiónicos, o sintetizados a partir de compuestos anfífilos naturales como los antibióticos esteroides catiónicos, tienen carácter anfífilo facial. Los grupos hidrófobos e hidrófilos de los compuestos anfífilos faciales se sitúan en dos caras opuestas de la molécula.

La estructura molecular de estos compuestos les confiere dos importantes propiedades que los diferencian del resto de las sustancias químicas:

- a) Adsorberse en las interfases (gas-líquido, líquido-líquido y sólido-líquido), dando lugar a la formación de monocapas. Como consecuencia, estos compuestos modifican la tensión superficial de las disoluciones que los contienen debido a su capacidad para adsorberse en la interfase líquido-aire. Buena parte de las aplicaciones industriales de estos compuestos se basan en esta propiedad. Así, surfactantes de diferente naturaleza se utilizan como agentes humectantes (adsorción en la interfase líquido-sólido), espumantes (interfase líquido-gas) y estabilizadores de emulsiones o microemulsiones (interfase líquido-líquido).
- b) Formar agregados supramoleculares (micelas, bicapas, vesículas, etc.) de dimensiones coloidales y estructura bien definida tanto en disolución acuosa como en medios apolares (*Figura 1.3*).

El estado coloidal se define como la formación de dos fases cuando una molécula con una gran superficie se dispersa en un medio. Estas fases pueden ser líquido-líquido, sólido-líquido, etc. No se trata de una verdadera disolución, ya que no es una mezcla homogénea de soluto y disolvente, pero podemos considerarla una dispersión de un material dentro de otro. Existen dos clases de coloides: los liófilos y los liófilos. Los coloides liófilos repelen el disolvente (son difíciles de disolver) y termodinámicamente

son inestables. Los coloides liófilos son fácilmente miscibles con el disolvente y estables termodinámicamente. Si el medio es acuoso, los coloides liófilos se denominan hidrófilos y, correspondientemente, se denominan hidrófobos si se trata de coloides liófilos.

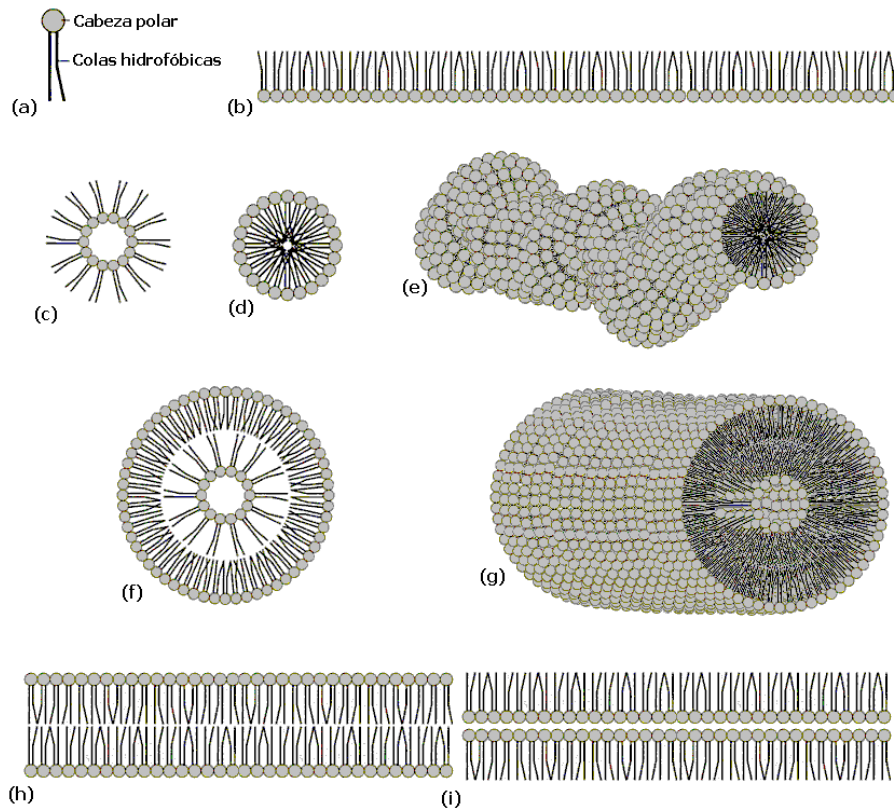


Figura 1.3. Ejemplos esquemáticos de asociaciones coloidales. A) Esquema de una molécula de naturaleza anfipática, b) monocapa, c) micela inversa, d) micela, e) micela vermiforme, f) vesícula, g) tubo, h) bicapa, i) bicapa inversa.

Ejemplos de coloides liófilos son las *espumas* (dispersiones gas-líquido), las *emulsiones* (dispersión líquido-líquido) y los *soles* (dispersiones sólido-líquido). Un ejemplo de coloides liófilos son las micelas, que es una unión temporal de moléculas o iones en forma de esferas o cilindros. También se pueden formar bicapas dando lugar a vesículas o tubos (*Figura 1.3*). Un ejemplo es la bicapa lipídica, membrana delgada formada por dos capas de moléculas de lípidos. Estas membranas son láminas que forman una barrera continua y delimitan las células. La membrana celular de todos los organismos vivos y muchos virus está compuesta de una bicapa lipídica, y también las membranas que rodean el núcleo de la célula y otras estructuras subcelulares como las mitocondrias, cloroplastos, etc.

Los ejemplos más característicos de compuestos que forman micelas son los jabones, detergentes, sales biliares, colorantes y algunos medicamentos. La principal característica de estos compuestos es el cambio brusco que se produce en sus propiedades físicas cuando se alcanza cierta concentración. Esta concentración se denomina concentración micelar crítica (*cmc*) o, más generalmente, concentración de agregación crítica, (*cac*) y es la concentración a partir de la que la formación de micelas (o agregados) está favorecida, como se verá más adelante. Por debajo de esta concentración, el compuesto no se agrega y se haya disuelto en el medio como monómero.

1.3 ÁCIDOS BILIARES.

Las sales biliares pertenecen a la gran familia de los esteroides que tienen en común un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno. Este hidrocarburo policíclico de 17 átomos de carbono, también llamado gonano o esterano, se puede considerar un producto de la saturación del fenantreno asociado a un anillo de ciclopentano y es el núcleo base para multitud de moléculas de origen lipídico, como los esteroides (colesterol), ácidos biliares y hormonas esteroideas. De esta base estructural, surgen seis familias de esteroides dependiendo de los grupos metilo, en las posiciones 10 y 13 para integrar los carbonos 18 y 19, y de la existencia y la longitud de una cadena lateral en el carbono 17 (Figuras 1.4 y 1.5). Al mismo tiempo dentro de cada familia pueden existir numerosos isómeros. Por ejemplo, en el caso del gonano pueden existir 64 isómeros. Los ejemplos más representativos de cada familia se recogen en la *Tabla 1.1*.

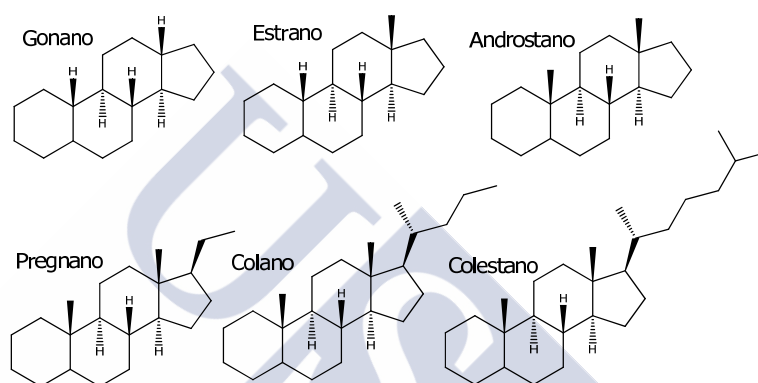


Figura 1.4. Nombres y estructuras de los compuestos que dan lugar a las distintas familias de esteroides.

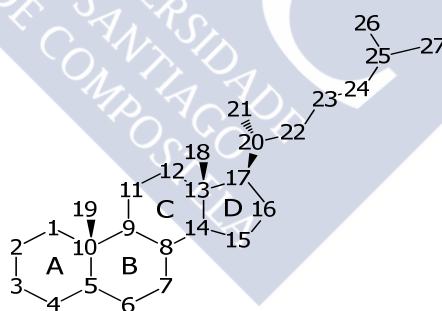


Figura 1.5. Numeración del esqueleto de carbono y asignación de los anillos de los esteroides.

Tabla 1.1 Ejemplos más representativos de cada familia de esteroides.

Familia	Ejemplo	Numero de carbonos
Colestanos	Colesterol	27
Colanos	Ácido cólico	24
Pregnanos	Progesterona	21
Androstanos	Testosterona	19
Estranos	Estradiol	18

1.3.1 Colesterol

El colesterol, perteneciente a la familia de los colestanos, es, sin duda, el esteroide por excelencia. Es un componente básico de las membranas celulares y también es el

precursor de todas las hormonas esteroideas y los ácidos biliares. El colesterol es un 3β -monohidroxi C_{27} esteroide saturado, excepto en las posiciones C_{5-6} lo que hace que la molécula sea prácticamente plana (Figura 1.6).

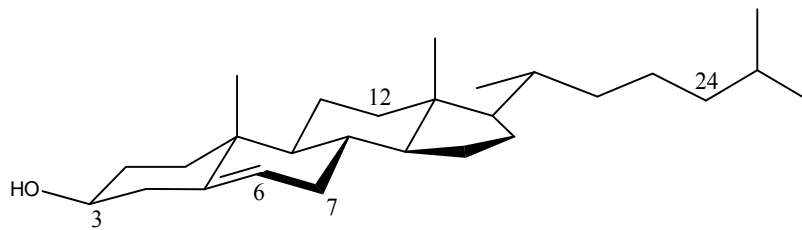


Figura 1.6. Estructura del colesterol.

En las células de los animales vertebrados, la biosíntesis del colesterol tiene lugar en el retículo endoplasmático liso. Rittenberg y Bloch demostraron, mediante estudios de marcaje isotópico, que todos los átomos de carbono del colesterol proceden del acetato en forma de acetyl coenzima A. Se requirieron aproximadamente otros 30 años de investigación para describir las líneas generales de la biosíntesis del colesterol, desconociéndose, sin embargo, muchos detalles enzimáticos y mecanicistas implicados. Los pasos principales de la síntesis de colesterol se recogen en la Figura 1.7.

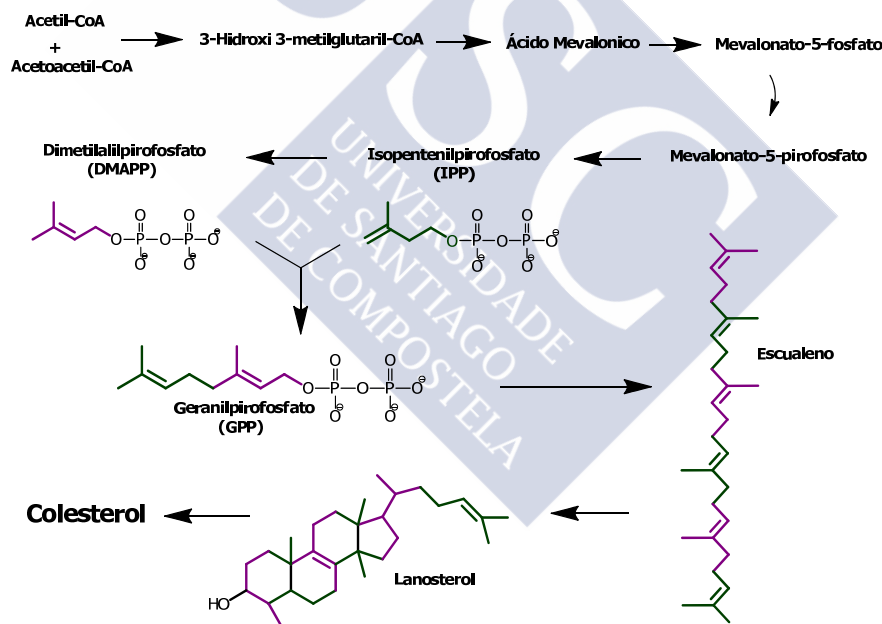


Figura 1.7. Esquema abreviado de la síntesis del colesterol (información tomada de <http://english.turkcebilgi.com/metabolic> y <http://es.wikipedia.org/wiki/Colesterol>).

Desde el punto de vista metabólico, el colesterol es una pieza clave en la esteroidogénesis. Este proceso biológico consiste en la transformación del colesterol para la obtención de otros esteroides, y las rutas metabólicas que engloba varían entre las diferentes especies. Las hormonas esteroideas ayudan en el control del metabolismo, inflamación, funciones inmunológicas, equilibrio de sal y agua, desarrollo de características sexuales, y la capacidad de resistir enfermedades y lesiones. Productos de la esteroidogénesis en los humanos son los andrógenos como la testosterona, estrógenos como el estradiol, progestágenos como la progesterona, glucocorticoides como el cortisol

y mineralocorticoides como la aldosterona. Estas formas de hormonas lipídicas son generalmente sintetizadas en las gónadas y glándulas suprarrenales. Pueden pasar a través de la membrana celular ya que son solubles en grasa, y luego unirse a receptores de hormonas esteroideas que pueden ser nuclear o citosólica dependiendo de la hormona esteroide, para provocar cambios dentro de la célula. Las hormonas esteroideas son generalmente transportadas en la sangre unidas a un transportador específico proteico como la globulina, fijadora de hormonas sexuales, o globulina, fijadora de cortisol. Las conversiones y catabolismo adicional se producen en el hígado, en otros tejidos "periféricos", y en el tejido objetivo. El control en la concentración de colesterol es muy importante dado que, por ejemplo, el alto nivel de este esteroide en sangre se relaciona con enfermedades como la arteriosclerosis e hipertensión.⁶ En la actualidad se utilizan dos formas para atacar este problema: (i) inhibir la síntesis hepática de colesterol o reducir la reabsorción de sales biliares. Moléculas como la atrovastatina, la pravastatina y la simvastatina bloquean la encima betahidroxil- betametilglutaril- coenzima A. Esta es responsable de la síntesis de ácido mevalónico, precursor del colesterol (*Figura 1.7*); (ii) por otra parte, el ezetimiba glucurónido inhibe selectivamente la absorción de sales biliares y colesterol en el intestino.

Desde el punto de vista estructural, el colesterol es un componente básico de las membranas plasmáticas eucariontes ya que representa un 23% de los lípidos de membrana y se encuentra en menor cantidad en las membranas de los orgánulos celulares de los animales vertebrados (*Figura 1.8*). El colesterol es un factor importante en la fluidez y permeabilidad de la membrana ya que ocupa los huecos dejados por otras moléculas, aunque el exceso hace que se vuelva menos permeable y fluida. Se ha postulado que los lípidos de membrana se podrían encontrar en dos formas: como un líquido bidimensional, y de una forma más estructurada, en particular cuando están unidos a algunas proteínas formando las llamadas balsas lipídicas. Se cree que el colesterol podría tener un papel importante en la organización de estas últimas. Su función es evitar que se adhieran las colas de ácido graso en la membrana plasmática, mejorando la fluidez de la membrana. En las membranas de las células vegetales son más abundantes los fitoesteroides (esteroideos de origen vegetal). El carácter hidrófilo del grupo hidroxilo en la posición 3 del colesterol (*Figura 1.6*) hace que la molécula se disponga con éste hacia el exterior de la bicapa lipídica.

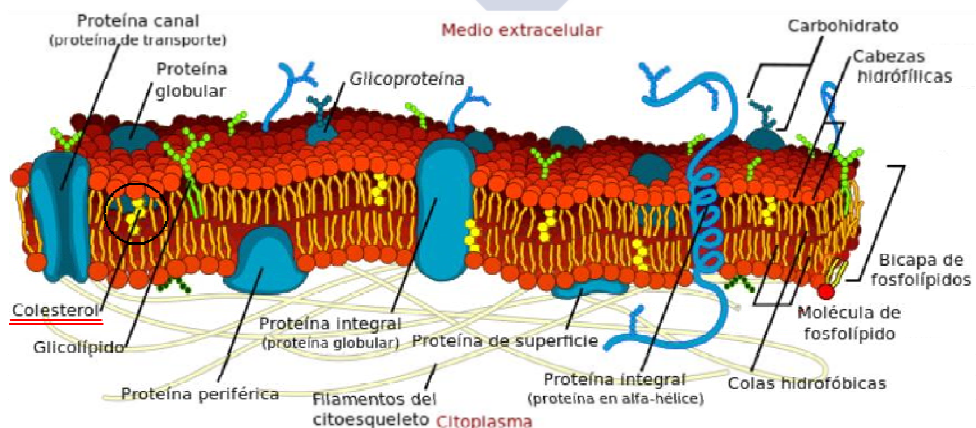


Figura 1.8. Modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana plasmática propuesto en 1972 por S. J. Singer y Garth Nicholson. Fuente de la imagen: http://es.wikipedia.org/wiki/Modelo_de_mosaico_fluido.

1.3.2 Esteroides y esteroides sintéticos.

Desde hace algún tiempo se han obtenido una variedad de esteroides y esteroides sintéticos con aplicaciones terapéuticas. Algunos esteroides sintéticos son más débiles y otros mucho más fuertes que los esteroides naturales cuyos receptores activan. Algunos ejemplos de hormonas esteroides sintéticas son las siguientes:

- Glucocorticoides: prednisona, dexametasona, triamcinolona
- Mineralocorticoides: fludrocortisona
- Vitamina D: dihidrotaquisterol
- Andrógenos: oxandrolona, testosterona, nandrolona
- Estrógenos: dietilestilbestrol (DES)
- Progestinas: noretindrona, acetato de medroxiprogesterona

Los esteroides ejercen una gran variedad de efectos mediados por una genómica lenta, así como por rápidos mecanismos no genómicos. Para las acciones genómicas, se unen al receptor nuclear en el núcleo celular. Para las acciones no genómicas, los receptores de esteroides en la membrana activan cascadas de señales intracelulares. Ya que los esteroides y esteroides son solubles en los lípidos, pueden entrar con bastante libertad desde la sangre a través de la membrana celular al citoplasma de las células objetivo. En el citoplasma, el esteroide podría someterse a una alteración enzimática como una reducción, hidroxilación, o aromatización. En el citoplasma, el esteroide se une a receptores específicos como una gran metaloproteína. En la unión del esteroide, muchos tipos de receptores de esteroides se dimerizan. Dos subunidades receptoras se unen para formar una unidad funcional que se puede unir al ADN y permite la entrada al núcleo celular. Una vez en el núcleo, el complejo ligando esteroide-receptor se une a secuencias específicas del ADN e induce la transcripción de sus genes objetivo.

1.3.3 Importancia biológica de las sales biliares⁶⁻⁸

Las sales biliares son moléculas de origen natural de gran importancia fisiológica, estructural y metabólica. Su nombre recuerda que son el componente principal de la bilis, que presenta un color entre amarillo oscuro y verdoso. El hígado segrega hasta 500 mililitros diarios y su composición varía según sea del hígado o de la vesícula biliar (*Tabla 1.2*).

Tabla 1.2. Composición de la bilis.

	Hígado	Vesícula
Agua	95-97%	80-90%
Sales Biliares	1-2%	6-10%
Colesterol	0,2-0,4%	0,5-5%

Las sales biliares actúan en el intestino delgado disminuyendo la tensión superficial de los ácidos grasos de cadena larga provocando la emulsión de los mismos. La incorporación de los lípidos a las micelas orienta los enlaces éster de los lípidos hacia la superficie de la micela, logrando que sean accesibles a la digestión por parte de lipasas pancreáticas (que se encuentran en forma soluble). Una producción defectuosa de sales biliares implica la expulsión de las grasas en forma de heces (esteatorrea). Las lipasas pancreáticas digieren los triacilglicéridos hasta ácidos grasos libres y monoacilglicerol, y estos productos de la digestión se transportan en las micelas al epitelio intestinal donde son absorbidas a través de la membrana plasmática. El colesterol es parcialmente

absorbido y el resto precipita. Esta solubilización de los productos de la digestión de grasas de la dieta mejora la solubilización de otros lípidos importantes como las vitaminas liposolubles. Las sales biliares tienen una acción catártica suave, mejoran el drenaje biliar y evitan la presencia de infecciones, ya que la bilis es un excelente caldo de cultivo.

El correcto funcionamiento del metabolismo de estos compuestos en los seres vivos es de gran importancia dado que está íntimamente implicado en la síntesis de hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D. Las sales biliares naturales, sintetizadas en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos, proceden en su mayoría de la modificación enzimática del colesterol. El cuerpo humano produce aproximadamente 800 mg de colesterol al día y la mitad (400-600 mg) lo transforma en sales biliares. Alrededor del 90% de las sales biliares secretadas en el intestino son reabsorbidas por el transporte activo en el íleon en lo que se conoce como circulación enterohepática.

Los ácidos cólico, quenodesoxicólico y ursodesoxicólico y sus derivados, se han utilizado en el tratamiento de deficiencias en sales biliares, en patologías relacionadas con el hígado y en la solubilización del colesterol de la vesícula. Las propiedades antivirales y antifúngicas de algunas sales biliares han sido estudiadas con resultados prometedores.⁹⁻¹⁰

La alta especificidad y capacidad de transporte de un sistema de ácidos biliares a través del sistema enterohepático es fuente de una amplia corriente de investigación para elaborar ácidos biliares que transporten de forma específica un medicamento para ser liberado en el hígado o para mejorar la absorción intestinal de medicamentos que de otra manera no se absorberían.¹¹

1.3.4 Estructura y propiedades de las sales biliares.

En esta introducción se resumen las propiedades fisicoquímicas más importantes de los ácidos biliares. Se utilizarán indistintamente las denominaciones *ácido biliar* o *sal biliar* para hacer referencia a estos compuestos de un modo genérico, sin que ello defina su estado de ionización.

La configuración general de las sales biliares *normales* es *cis* entre los anillos A y B y un hidrógeno β en la posición 5. Si la posición de este hidrógeno es α se denominan allosteroides. En general provienen del ácido 5β-colanoico,¹² tienen grupos metilo en los carbonos 10, 13 y 20, una cadena lateral en el carbono 17 y se diferencian entre sí, principalmente, en el número, posición y orientación de los grupos hidroxilo en las posiciones 3, 7 y 12 (Figura 1.9).

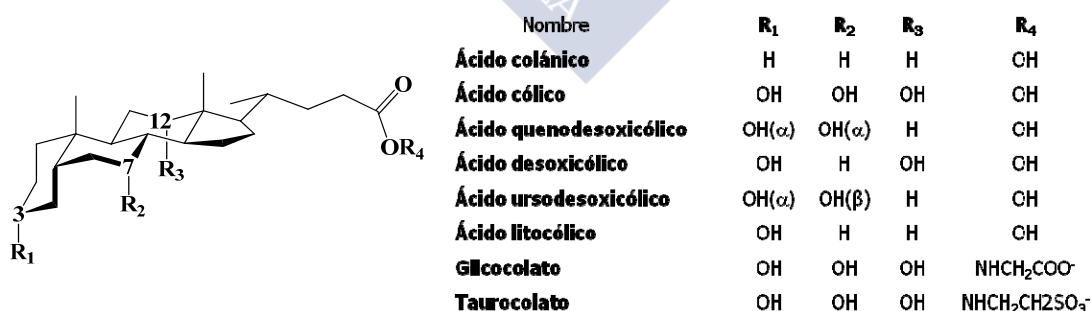


Figura 1.9. Estructura general y posición de los sustituyentes de las sales biliares más importantes y de sus derivados con glicina y taurina.

El término *sales biliares conjugadas* se refiere a derivados en los que se introducen grupos que cambian las propiedades hidrófilas o la carga de la molécula. Los más importantes en la naturaleza son los que se conjugan con los aminoácidos glicina y taurina y se denominan glico- y tauro-derivados, respectivamente. El 75% de los ácidos biliares conjugados son glico-derivados y el 25% tauro-derivados del ácido cólico. En

total, estos representan el 80% de todas las sales biliares en el cuerpo humano. En la nomenclatura de sales biliares, comúnmente, se utilizan prefijos como desoxi- o hidrox-, mientras que otros prefijos como queno- o urso- denotan la estequiometría de los sustituyentes hidroxilo.

La *Figura 1.10* representa la estructura en perspectiva del ácido cólico y muestra como los grupos hidroxilo se orientan hacia la cara α de la molécula (cara hidrófila) mientras que los metilos se localizan en la cara β (cara hidrófoba).

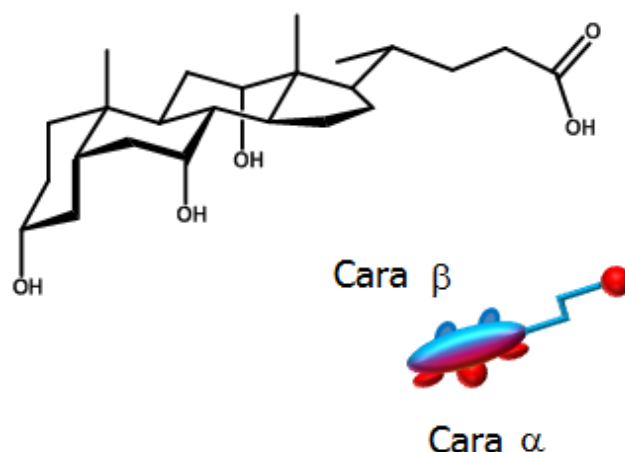


Figura 1.10. Estructura y croquis representativo del ácido cólico. El color rojo indica región polar y el azul apolar.

De esta manera, la molécula presenta una cara hidrófila, otra hidrófoba y una pequeña cadena hidrófoba con un grupo hidrófilo (grupo carboxílico) en el extremo. Esta polaridad planar explica las características de su comportamiento en medio acuoso, dando lugar, mediante auto-asociación, a agregados (comúnmente llamados micelas) a una concentración mayor de la *cmc*. Algunas de las propiedades fisiológicas más importantes de las sales biliares, como transporte de lípidos, se derivan de esta naturaleza anfipática. Se ha demostrado que por debajo de la *cmc*, las sales biliares se comportan como un electrólito 1:1 fuerte y no muestran ningún proceso de asociación tal y como ha sido demostrado a partir de medidas del punto de congelación.¹³⁻¹⁴ El valor de la *cmc* depende de las condiciones químico-físicas del medio. Los agregados de sales biliares son en general pequeños (con números de agregación típicamente menores de 10)

Modificaciones en el número, el tipo y la estequiometría de los sustituyentes pueden variar la polaridad de la molécula. En general, la polaridad aumenta con el número de grupos hidroxilo. Las sales biliares tauro-derivadas son más hidrófilas que las correspondientes glico-derivadas, mientras que las sales biliares libres son las menos hidrófilas.

Los ácidos biliares poseen una estructura tridimensional perfectamente conocida. La presencia de uno, dos o tres grupos hidroxilo apenas supone cambios en las dimensiones moleculares de los distintos ácidos biliares, haciendo que este conjunto de moléculas posea unas dimensiones y morfología prácticamente idénticas. Un ejemplo es que la diferencia de volumen entre el ácido litocólico (533 \AA^3 , con un grupo hidroxilo) y el ácido cólico (536 \AA^3 , con tres grupos hidroxilo) es de 3 \AA^3 .⁷

Sin embargo, el concepto de *cmc* aplicado a las sales biliares no es aceptado universalmente. Así, Kratochvil *et al*¹⁵⁻¹⁶ afirman que no existe una *cmc* real, sino que la transición entre monómeros y agregados es progresiva. Por su parte, Ekwall¹⁷ sugiere un proceso de agregación de tres etapas con concentraciones críticas características. En

parte, estas discrepancias surgen de la diferente sensibilidad de los métodos experimentales hacia la detección de los agregados que se formen.

A grandes rasgos, podemos agrupar los métodos para la determinación de la *cmc* (o pseudo-*cmc*) en disolución en dos categorías: los invasivos y los no invasivos dependiendo del uso o no de una sonda añadida al sistema. Los métodos denominados invasivos se basan en la medida del cambio de una propiedad o en la medida de coeficientes de partición de un aditivo denominado sonda (colorantes, fluoróforos, etc.), cuando se solubiliza en el interior de las micelas.¹⁸ Existe un gran abanico de posibilidades pudiendo citar, entre ellas, el cambio espectral de un colorante hidrosoluble, la solubilización micelar de un colorante liposoluble, la tensión interfacial en la interfase líquido-líquido o el coeficiente de partición entre la fase acuosa y una fase inmiscible no-polar. Entre los métodos no-invasivos, cabe destacar la medida de la tensión superficial y de otras propiedades como conductividad, turbimetría, osmometría, difusión de la luz, índice de refracción o propiedades electromagnéticas como RMN, velocidad y absorción de sonido. El resultado de todo ello es una enorme dispersidad de los valores publicados para las *cmc* de las sales biliares (Figura 1.11).

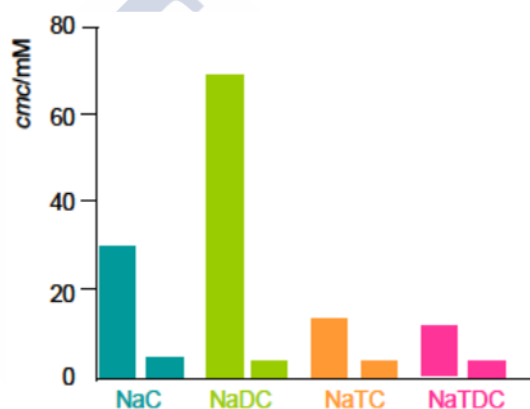


Figura 1.11. Valores máximos y mínimos publicados para la *cmc* de cuatro sales (sódicas) biliares representativas: colato (NaC), desoxicolato (NaDC), taurocolato (NaTC) y taurodesoxicolato (NaTDC).^{14,18}

Por otra parte, se puede encontrar una discusión detallada sobre los méritos de tales aproximaciones en el trabajo de Carey.¹⁹ En nuestra opinión, los métodos no invasivos suministran valores de *cmc* más realistas. Por su parte, Kratochvil 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 a la utilización de un pH demasiado bajo que no asegura la completa ionización de la función carboxílica. Debemos recordar aquí que si se trabaja a pH neutro algunas sales biliares forman geles.²⁰ Incluso el grado de pureza de los reactivos es otro factor.¹³ La mayoría de las sales biliares comerciales que se encuentran en el mercado están impuras, siendo los contaminantes de naturaleza variada, aun cuando los más frecuentes son otras sales biliares. En general la *cmc* aumenta su valor al aumentar la temperatura y disminuye con la presencia de electrólitos inertes. Resulta obvio que para determinar la *cmc* de una sal biliar, ésta ha de estar pura, homogénea, termostata y en forma de sal para lo que el pH ha de ser suficientemente alto para conseguir que la molécula esté completamente ionizada.

La controversia acerca de la existencia o no de una verdadera *cmc* está íntimamente ligada al tamaño de los agregados y su polidispersidad, y alcanza a la estructura de los agregados. 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 de realizar 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 requieren una 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, la bibliografía arroja una dispersión de valores difícilmente justificable. La *Figura 1.12*, referida a los valores máximo, medio y mínimo 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 ventajosas frente a las que demandan cualquier tipo de extrapolación.

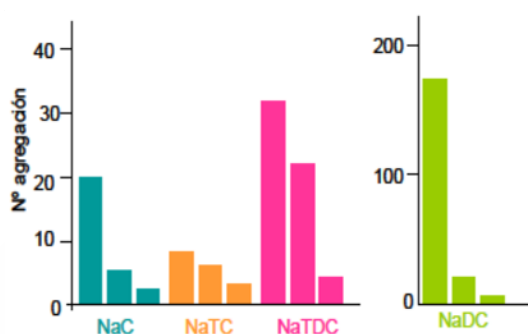


Figura 1.12. Números de agregación máximo, medio y mínimo publicados para las cuatro sales biliares indicadas en la imagen.^{14,18}

La dispersión de valores publicados de la fracción de contraiones enlazados a la micela también es notable. Por ejemplo, para el colato sódico se han publicado valores que van desde 0.03¹³ hasta 0.7.²¹ La *Figura 1.13* resume los valores máximo, medio y mínimo de la fracción de contraiones publicados para las mismas sales biliares anteriormente citadas.¹⁸

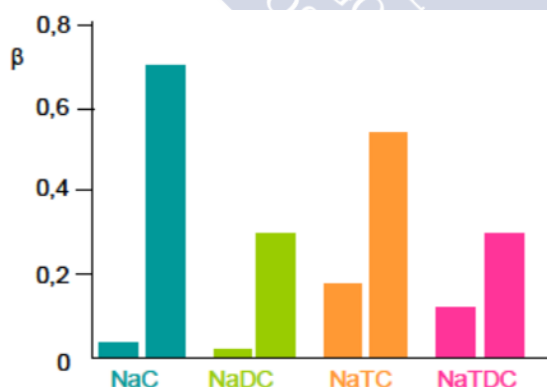


Fig.1.13. Valores mínimo y máximo publicados para la fracción de contraiones asociada a los agregados de las sales biliares indicadas.¹⁸

Además de la problemática ya comentada acerca de la pureza de los reactivos o de la influencia de variables no consideradas, también es necesario tener en cuenta 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. Al trabajo ya citado de Kratochvil, hay que añadir el estudio

de Nagarajan²² 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 surfactante 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 surfactante. Todo ello es válido también para la fracción de contraiones. En los estudios publicados, no ya sobre ácidos biliares sino sobre otros surfactantes, estas cuestiones no siempre han sido tenidas en cuenta, tal y como Nagarajan ha señalado.

No debe sorprender que se hayan propuesto diversas estructuras para los agregados de los ácidos biliares, algunas claramente contrapuestas entre sí. A continuación se analizan las dos 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 (β) de los esteroides. Este tipo de micelas, denominadas *primarias* (Figura 1.14 izquierda), tendría un número de agregación bajo (comprendido entre 2 y 10).²³ Los agregados con números de agregación mayores que los indicados corresponderían a las denominadas micelas secundarias, formadas a partir de las anteriores mediante la unión de enlaces de hidrógeno.

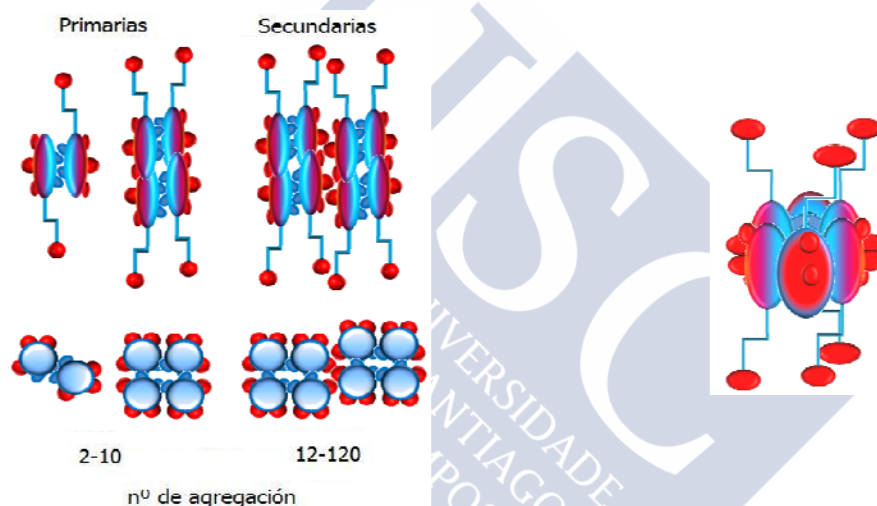


Fig.1.14. Izquierda: Estructuras de los agregados de sales biliares propuesta por Small.²³ Derecha: Estructura en forma de disco propuesta por Kawamura *et al.*²⁴ para los agregados de sales biliares dihidroxílicas.

Esta interacción entre las caras β , también denominada *espalda-contra-espalda*, ha sido apoyada por medidas de RSE utilizando sondas portadoras del grupo radical NO, trabajo debido a Kawamura *et al.*²⁴ 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 (α) dirigida hacia el disolvente (Figura 1.14 derecha). 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.*¹⁸

El anterior modelo sería posteriormente completado por Coello *et al.*¹⁴ 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 1.15). La ubicación de un contraión (normalmente 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 Coello *et al.* En la *Figura 1.15* puede verse la disposición de los contraiones para un trímero (número de agregación determinado por estos autores 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 surfactantes alquílicos de cadena larga. 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.*²⁵ 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 la sonda entre en contacto con el agua, al ubicarse hacia el exterior de las mismas,²⁶ donde residen entre 5 y 10 moléculas de agua por monómero agregado.²⁷

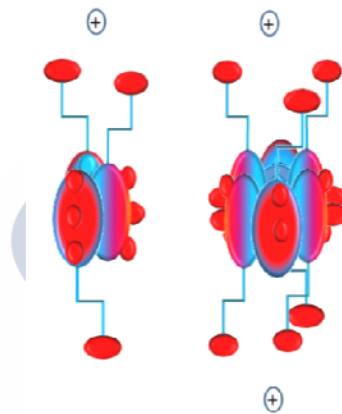


Figura 1.15. Ubicación de los contraiones en los trímeros (izquierda) y hexámeros (derecha) de sales biliarias según Coello *et al.*¹⁴

El segundo de los modelos, claramente contrapuesto a los anteriores, es debido a Giglio *et al.*²⁸ (*Figura 1.16*). Según el mismo, 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 neutralizan 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. El modelo fue inferido por Giglio *et al.* a partir de la resolución de las estructuras cristalinas de las sales biliarias objeto de estudio.

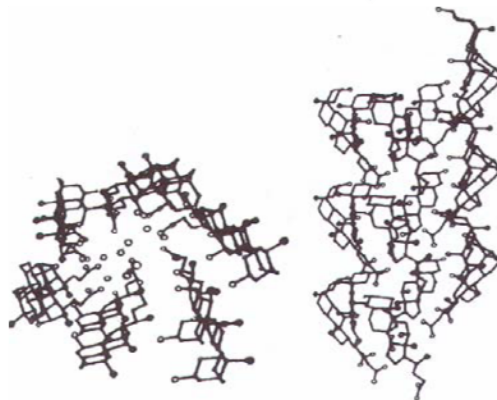


Figura 1.16. Estructura propuesta por Giglio *et al.*²⁹ para los agregados de desoxicolato sódico. Vistas a lo largo del eje de la hélice (izquierda) y transversal (derecha) al mismo.

1.3.5 Formación de complejos entre ácidos biliares y metales pesados.

La dependencia de la agregación de surfactantes iónicos con la naturaleza del contraión que le acompaña es un fenómeno ampliamente estudiado y que está relacionado con multitud de procesos biológicos, con procesos industriales y es un campo de estudio en la obtención de nuevos materiales. La ionización de los ácidos carboxílicos de los ácidos biliares, así como el tipo de catión que acompaña a la molécula, se suman a un gran número de factores, como la orientación de los grupos hidroxílicos o grupos de sustitución, que definen el comportamiento de la sustancia en disolución.³⁰⁻³² Como se ha venido comentando, el peculiar comportamiento que los ácidos biliares y sus sales en disolución hace que exista cierta controversia respecto a la interpretación de los resultados obtenidos. Se pueden presentar en disolución como moléculas libres o asociadas a otras formando micelas simples o compuestas, lo que puede provocar que los valores pK_a de los grupos carboxílicos varíen respecto de los esperados. En general el entorno en el que se encuentra la molécula es crucial para explicar los fenómenos de agregación que se producen y están directamente relacionados con factores estructurales del surfactante. En la naturaleza, cada ion metálico, que actúa como contraión de las sales biliares, ejerce una función específica. El sodio por ejemplo, que es el catión predominante en la bilis, se considera el principal catión responsable de la formación de agregados micelares. Los iones de calcio, por otro lado, interactúan con varios aniones, incluyendo las sales biliares, reduciendo su actividad.

Para profundizar en el entendimiento de cómo los ácidos biliares interactúan con iones metálicos en disolución se debe comenzar por el estado sólido. Los cristales resueltos por difracción de rayos X de sales biliares en el que están presentes átomos metálicos en la red cristalina son escasos debido a la dificultad de obtener un monocristal del tamaño necesario. Aun así las estructuras cristalinas publicadas incluyen sodio,³³⁻³⁵ calcio,^{36,37} rubidio^{35,38} y cesio,³⁹ dejando patente la implicación de los grupos carboxilato con el catión metálico. La fortaleza de este enlace no solo depende del tipo de catión metálico sino que también influyen factores estructurales de la molécula de ácido biliar. Los grupos hidroxilo pueden quedar al margen o en ciertas circunstancias pueden coordinarse con los iones metálicos.

Cuando se busca información respecto a la interacción entre las sales biliares y los iones metálicos en disolución, la bibliografía resulta mucho más extensa. Numerosos grupos de investigación, cada uno con su distinto punto de vista dentro de sus campos de estudio, muestran complejos metálicos de sales biliares con Na^+ , Re^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Au^{3+} , Al^{3+} , Tb^{3+} , entre otros.⁴⁰⁻⁴⁵ Si se centra la atención sobre el precursor de los compuestos de estudio, Feroci *et al*⁴⁶⁻⁴⁷ hacen una comparación de diferentes sales del ácido cólico obteniendo una secuencia de estabilidad de enlace $Cd^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+}$ y una de solubilidad $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+}$.

Chakrabarty *et al*⁴⁸ presentaron unos estudios morfológicos de hidrogeles de ácido cólico formados en presencia de distintos iones metálicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} and Ag^+). Asimismo, Sun *et al*⁴⁹ han reportado un tamaño de agregados entre 30-80 nm cuando interacciona el Co^{2+} con micelas formadas por el desoxicolato sódico y al mismo tiempo se plantea un hipotético modelo de interacción entre los agregados y el ión Co^{2+} (Figura 1.17). Esto podría traducirse en un incremento de la floculación y en una reducción de la coalescencia del sistema al compararlo con los agregados que se obtienen cuando se trabaja sin metal pesado.⁵⁰

En nuestra misma línea de investigación, Zhang *et al*⁵¹⁻⁵² sintetizaron bolsos moleculares en forma de trípode a partir de trímeros formados por restos de ácido cólico, que resultaron ser capaces de solubilizar pireno en un medio polar (Figura 1.18). En estos casos, las moléculas presentan en su estructura anillos aromáticos capaces de complejar

iones metálicos a través de los electrones π . Así, una de las estructuras (estructura 1 de la *Figura 1.19*) es capaz de formar complejos con metales pesados que, junto con el pireno, se emplazarían en la cavidad formada por los trímeros del ácido cólico.

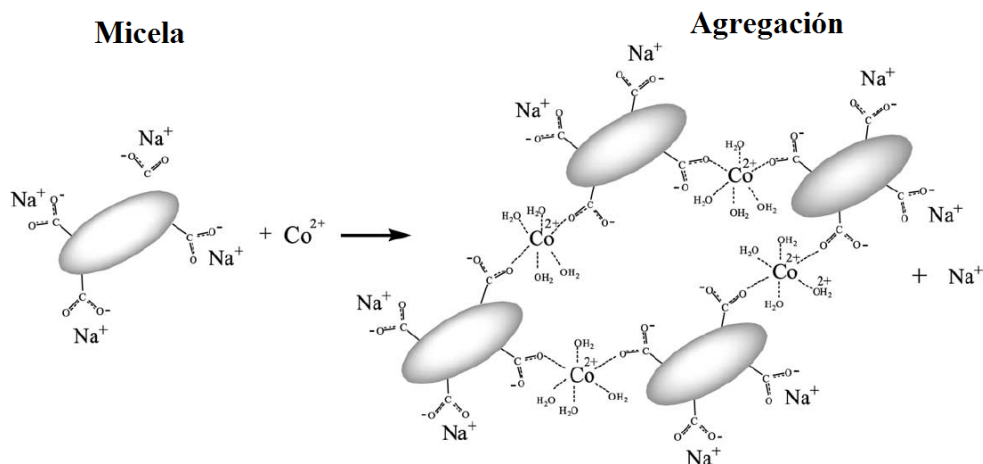


Figura 1.17. Esquema de interacción del cobalto con micelas de sal biliar por Sun *et al.*⁴⁹

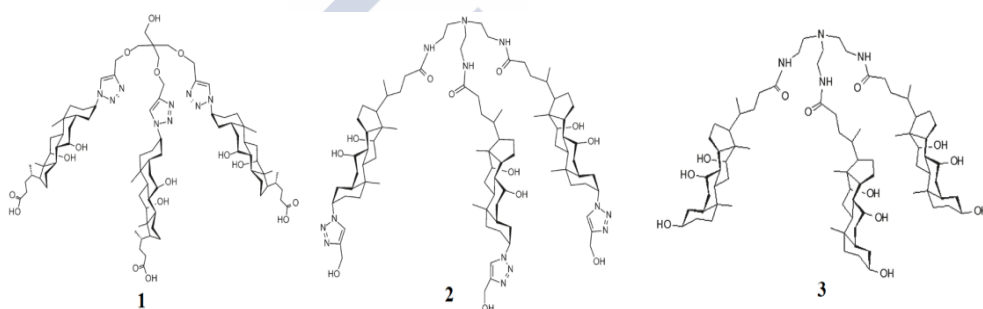


Figura 1.18. Estructura de los trímeros derivados del ácido cólico sintetizados.⁵¹⁻⁵²

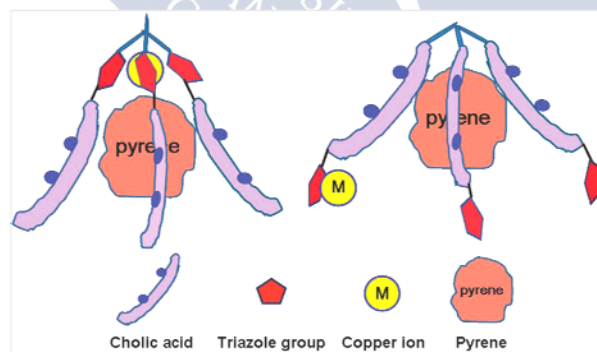


Figura 1.19. Disposiciones posibles de unión del metal y el pireno a los trímeros derivados del ácido cólico.⁵²

1.4 ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS.

Como se ha visto, el estudio de los ácidos biliares representa un campo de estudio de gran importancia, tanto desde el punto de vista biológico como terapéutico. Estos compuestos no sólo son interesantes por una actividad específica sino por que al mismo

tiempo pueden actuar como transporte y ayudar en la liberalización de otros principios activos.^{8,53-54} Por ejemplo, pueden actuar como antibióticos,⁵⁵⁻⁵⁷ compuestos quirales,⁵⁸ nuevos materiales blandos,⁵⁹⁻⁶⁰ receptores catiónicos^{61 61} y aniónicos,⁶²⁻⁶³ canales de iones artificiales,⁶⁴ liberalización controlada,⁶⁵ dendrones,⁶⁶ cestos moleculares,⁶⁷ como soporte o andamio para química combinatoria⁶⁸ y química supramolecular,⁶⁹ nuevos surfactantes,⁷⁰⁻⁷¹ y otros.^{69,72}

Un método para conseguir nuevas propiedades quimicofísicas consiste en modificar el balance hidrófilo-hidrófobo de los ácidos biliares. Esto se consigue uniendo a los grupos hidroxilo y/o al grupo carboxílico, grupos hidrófilos o hidrófobos. Esta estrategia consigue crear nuevos compuestos con nueva actividad biológica,⁷³⁻⁷⁴ capacidad de solubilización de colesterol,⁷⁵ y valores reducidos de *cmc*.⁵⁹⁻⁶⁰ Por ejemplo, la conjugación del ácido cólico con EDTA,⁷⁶ DOTA y DTPA⁷⁷ puede conducir hacia propiedades beneficiosas en el campo de la farmacología y la diagnosis, dada la capacidad que estos compuestos presentan para complejar ¹¹¹In o Gd(III) y ser empleados como transporte o como agentes de contraste. Un incremento de la polaridad se obtiene por modificación de un grupo hidroxilo en un grupo polar iónico (positivo o negativo). Los ácidos 3 α - y 3 β -amino-5 β -colan-24-oico fueron sintetizados por Bellini *et al*,⁷⁸ mientras que Broderick *et al*⁷⁹ sintetizaron el *triamino-análogo* del metil colato, el cual resultó tener una ligera tendencia a la agregación a pH 5-6 en disolución acuosa. Un diácido derivado del ácido cólico actúa como antídoto de la toxina faloidina (presente en la *Amanita Phalloides*).⁸⁰⁻⁸²

El núcleo de esteroide ha sido utilizado como estructura tridentada para unir tres residuos iónicos a los grupos hidroxilo del ácido cólico a través de espaciadores de naturaleza alquílica. Estos compuestos actúan como surfactantes de tres cabezas, formando pequeñas micelas primarias y grandes micelas esféricas secundarias.^{74,83} Cuando se modifica el balance hidrófobo/hidrófilo, por ejemplo, por eliminación de la carga negativa del grupo carboxilato por formación de ésteres o amidas aparecen nuevas capacidades de gelificación. Maitra *et al*^{54,84-85} han publicado revisiones bibliográficas de los muchos derivados de ácidos biliares sintetizados durante los últimos años.

1.5 OLIGÓMEROS DE ÁCIDOS BILIARES.

Durante los últimos años, la síntesis y el estudio de las propiedades quimicofísicas de oligómeros de sales biliares se ha convertido en un importante campo de investigación en relación con procesos de reconocimiento molecular y química supramolecular. La primera unión de dos ácidos biliares es debida a McKenna *et al*.⁸⁶ Los diferentes compuestos se pueden clasificar en derivados cíclicos y acíclicos, con o sin puentes de unión, simétricos o asimétricos, o como homo- o hetero-esteroides.⁸⁷ Dependiendo de la orientación relativa del esqueleto del esteroide, se puede obtener tres tipos de unión: cabeza (posición 3)-cola (posición 24),⁸⁸ cabeza-cabeza⁶⁴ y cola-cola.⁸⁹ Pero no sólo las posiciones 3 y 24 se utilizan para la formación de dímeros, sino que han sido empleadas otras posiciones hidroxílicas.⁹⁰⁻⁹¹ En esta línea también se han obtenido dendrímeros.^{66,92-95} Los dendrímeros con enlaces tipo éster son también candidatos atractivos para aplicaciones biológicas y de liberación de medicamentos.⁹⁴

Estos compuestos ofrecen diferentes posibilidades en cuanto a su comportamiento. Por ejemplo, en el caso de dímeros cabeza-cola el carácter hidrófobo aumenta obviamente debido a la disminución de la relación entre el número de grupos iónicos carboxilato y el

número de restos de esteroide. Algunos dímeros han sido empleados en el marcaje por fotoafinidad topológica del sistema de co-transporte Na^+ /sal biliar del íleon.⁹⁶ Se consigue una reducción fuerte en la *cmc* mediante el diseño de surfactantes tipo *gemi*. Recientemente, un nuevo surfactante esteroideo *gemi* derivado del $3\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 5β -colan-24-amina (resto de esteroide) y ácido etilendiamintetraacético (puente) fue sintetizado y caracterizado en disolución acuosa.⁸⁹ Para este compuesto la *cmc* observada en agua fue de 4.6×10^{-6} M lo que resulta tres órdenes de magnitud menor que la del desoxicolato sódico. Algunos grupos cabeza policationicos en colil surfactantes *gemi* evidencian un amplio espectro de actividad bactericida.⁹⁷ Se han utilizado dímeros cabeza-cabeza en el desarrollo de canales de iones basados en colato que pueden estar abiertos o cerrados según la adición o sustracción de paladio(II).⁹⁸

Durante los últimos años crece continuamente el número de oligómeros de esteroides que facilitan el transporte de iones y generan canales de iones artificiales.⁹⁹⁻¹⁰⁹ Los *paraguas* moleculares¹¹⁰⁻¹¹² son moléculas con dos o más unidades anfífilas unidas a un núcleo capaz de proteger un agente de un ambiente incompatible. Este sistema con dos restos de ácido cólico transporta selectivamente diferentes especies (incluyendo ATP) a través de la bicapa fosfolipídica¹¹³⁻¹¹⁵ y tienen propiedades antivirales.¹¹⁶

La unidad de ácido cólico puede dar lugar a agregación tanto en medios polares como apolares gracias a su carácter anfífilo.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Esta habilidad ha sido empleada en el diseño de cestos moleculares, que pueden actuar como micelas unimoleculares o como micelas inversas dependiendo del entorno.^{117,119} Estas moléculas actúan como agentes catalíticos sensibles al disolvente respecto a la epoxidación,¹²⁰ como ligandos unidos a iones¹²¹ y sacáridos.¹²² Han sido probados en procesos de reconocimiento de sacáridos típicos presentes en células tumorales malignas observándose una alta selectividad.¹²³ Un tetra-derivado es capaz de formar cristales líquidos termotrópicos.¹²⁴ Ariga *et al*¹²⁵ han estudiado la formación dinámica de cavidades tridimensionales.

Otro tipo de oligómeros derivados de ácidos biliares son los foldámeros,¹²⁶ que son análogos sintéticos de biopolímeros capaces de adoptar diferentes conformaciones.¹²⁷ El foldámero del ácido cólico no es soluble en medio acuoso pero se solubiliza en micelas de surfactantes permitiendo su uso como un sensor fluorescente para iones de mercurio presentes a escala micromolar en disoluciones acuosas.¹²⁸ Se han publicado modelos moleculares de un hexámero de colato plegado y desplegado.¹²⁹ Otro ejemplo de policondensación fue publicado por Gouin *et al* sobre dímeros de ácidos biliares obtenidos por unión del 3-OH de tipo diester con una cadena alquílica que actúa como puente.¹³⁰ También se han publicado aplicaciones diversas en campos de biomedicina y de farmacología.¹³¹ El quitosán modificado con ácido biliar lleva a la formación de agregados en disolución acuosa, haciendo posible que actúe como un sistema de transporte.¹³²⁻¹³³ Otros copolímeros exhiben una gran estabilidad térmica.¹³⁴ Ramificaciones triamino ortogonalmente protegidas basadas en un armazón de ácido biliar se pueden emplear para construir un amplio abanico de moléculas con tres ramificaciones y que pueden tener aplicaciones como receptores, en catálisis y farmacología. El ácido cólico se ha aprovechado como un nuevo tipo de patrón para el ensamblaje multivalente de péptidos.¹³⁵

Se han diseñado y sintetizado algunos ciclofano-esteroides, con dos restos de esteroide en un esqueleto de tetraazoparaciclofano. El ciclofano-esteroide empotrado en la bicapa lipídica actúa como un receptor de superficie celular. El reconocimiento molecular hace que estos receptores sean sensibles a diferentes medios.¹³⁶⁻¹³⁷ Ha sido sintetizada una serie de compuestos anfífilos basados en poli(cololo).¹³⁸⁻¹³⁹ El uso combinado de anfífilos (derivados de lisina, ácido cólico y espermina), y liposomas sensibles térmicamente (con 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina, DPPC) crea

liposomas TGLs (*thermally gated liposomes*).¹⁴⁰ También son agentes antivirales¹¹⁶ y son capaces de entrar en células vivas.¹⁴¹

También se han obtenido oligómeros cíclicos. Los colafanos son estructuras cíclicas empleadas como espaciadores entre esteroides (dos o más). Estructuras macrocíclicas de colafanos ofrecen espacio suficiente para unir una gran variedad de sustratos por reconocimiento molecular: fluoruros,⁶³ glucósidos,¹⁴² plata,¹⁴³ análogos de flavina,¹⁴⁴ derivados de uracilo,¹⁴⁵ cationes alquil-metálicos,¹⁴⁶ etc. Actualmente se han logrado sintetizar cicocolatos (poliésteres macrocíclicos)¹⁴⁷ y cicocolamidas (poliamidas macrocíclicas),^{87,148-149} litocolafanos cabeza-cabeza y cabeza-cola,¹⁵⁰ cicloquenodesoxicolato^{151,141} y macrocicloesteroides.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Los colafanos catiónicos se comportan como *agentes inteligentes de transferencia de fase* mostrando una clara dependencia estructural que favorece la extracción de aniones. La selectividad, desde un punto de vista supramolecular de estos compuestos, es un buen augurio para posibles aplicaciones en biología y medicina. Por ejemplo, el aumento del transporte de cloruros es relevante para un potencial tratamiento de las condiciones causadas por la ausencia o malfunción de los canales cloruro.¹⁵⁵

Toda esta información constituye razón suficiente para justificar el esfuerzo dedicado durante la ejecución de la presente Tesis Doctoral a los procesos de agregación de los nuevos derivados de ácidos biliares sintetizados y que se exponen más adelante.

1.6 INTRODUCCIÓN A LAS PORFIRINAS.

Las porfirinas son moléculas de estructura policíclica con un papel muy destacado dentro del funcionamiento de las proteínas redox. Estas proteínas poseen centros activos que cambian su estado de oxidación durante el ciclo de actividad de las mismas y desempeñan una gran cantidad de procesos metabólicos importantes que intervienen en la célula. Los centros activos contienen con frecuencia metales de transición, en cuyo caso estas proteínas redox se denominan también metaloproteínas. Uno de los centros activos redox más comunes en las metaloproteínas es el grupo hemo, constituido por un anillo de porfirina que coordina un ion hierro. Las hemoproteínas son un conjunto muy variado de metaloproteínas indispensables para la vida y contienen al menos un grupo hemo como centro activo. Desempeñan funciones muy diversas aunque no siempre implican un cambio redox. Un grupo importante dentro de las hemoproteínas redox son los citocromos, caracterizados por realizar funciones de transporte de energía química en multitud de procesos celulares claves como la respiración aeróbica, la fotosíntesis, la detoxificación o la apoptosis. El ion hierro del grupo hemo tiene un papel fundamental en la actividad de los citocromos pues cambia su estado de oxidación, entre Fe^{3+} y Fe^{2+} , durante la actividad de dichas proteínas. Con las porfirinas pueden coordinarse otros metales y realizar funciones muy relevantes. Ejemplos son las clorofilas que poseen magnesio o la vitamina B12 que posee cobalto.

Estos ejemplos simples, pero claves para cualquier organismo vivo, sugieren que el estudio de la familia de las porfirinas resulta un campo de investigación muy amplio con ramificaciones que varían entre la biología, la medicina, los materiales, la química de coordinación, transmisión electrónica, óptica, sondas, etc.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷

1.6.1 Estructura molecular y propiedades

Las porfirinas están compuestas por un anillo tetrapirrólico (*Fig.1.20*) con sustituyentes laterales que puede albergar un átomo metálico en el centro, unido mediante cuatro enlaces de coordinación. El anillo de porfirina es altamente conjugado, lo cual le

impone una geometría aproximadamente plana. Existe una gran controversia respecto a la nomenclatura de estos compuestos por lo que para evitar confusiones se utilizará el criterio de la IUPAC.

Una porfirina puede tener enlazadas una gran variedad de cadenas laterales y se clasifican basándose en el tipo y posición de los sustituyentes laterales del anillo. Según el tipo de sustituyentes las porfirinas se dividen en varias familias. Si la molécula tiene meso-sustituyentes será una mesoporfirina (Figura 1.20). Las porfirinas naturales, β -sustituidas, se clasifican según el número de ácidos carboxílicos: uroporfirinógenos (8), heptacarboxilporfirinógenos (7), hexacarboxilporfirinógenos (6), pentacarboxilporfirinógenos (5), coproporfirinógenos (4) y los protoporfirinógenos (2).

En general, excepto por omisión, en la nomenclatura de las porfirinas el nombre va acompañado de un número (de I a IV) que indica la posición de los sustituyentes. Hay dos importantes series numeradas la I y la III. Las series II y IV no ocurren en sistemas naturales. En la serie I los sustituyentes se repiten de una manera regular (AB AB AB AB), en la serie III el orden de los sustituyentes en el anillo D es inverso (AB AB AB BA) (Figura 1.21).

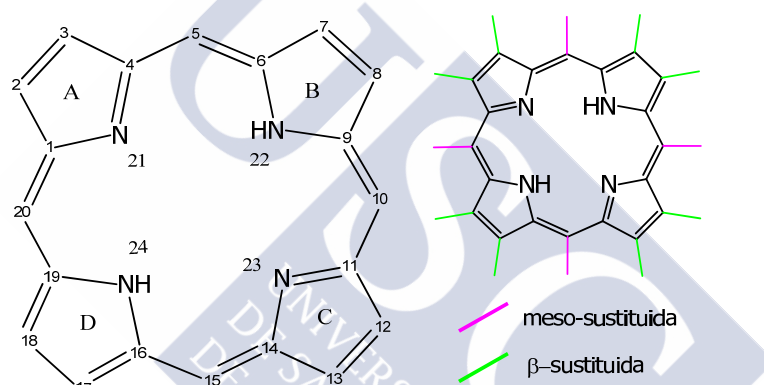


Figura 1.20. Representación del anillo tetrapirrólico de las porfirinas. Nomenclatura IUPAC y posición de los sustituyentes.

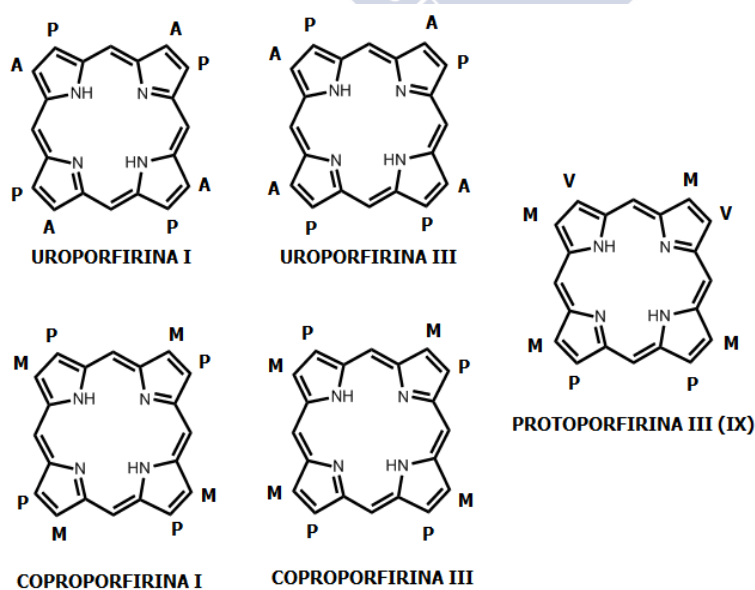


Figura 1.21. Representación esquemática de la numeración según la posición de los sustituyentes de las porfirinas. (A= carboximetil, M= metil, P= carboxietil y V= vinil).

Las protoporfirinas son las más relevantes y existen 15 isómeros, aunque en la naturaleza sólo aparece el IX (serie III), que se caracteriza por disponer cuatro grupos metilo en las posiciones 2, 7, 12 y 18, grupos vinilo en las posiciones 3 y 8, y grupos propiónicos en las posiciones 13 y 17 (*Figura 1.22*). A este grupo pertenecen la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos, entre otros.

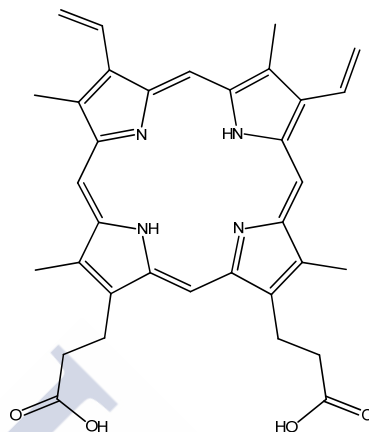


Figura 1.22. Estructura de la protoporfirina IX.

El control sintético de las entidades moleculares unidas a la periferia del macrociclo permite el diseño de porfirinas para aplicaciones específicas ya que el anillo de la porfirina ofrece distintas posibilidades de sustitución en su periferia. Se distinguen dos tipos de posiciones potencialmente funcionalizables: las posiciones β -pirrólicas y las posiciones puente, denominadas meso (*Figura 1.23*). Las porfirinas β -sustituidas presentan similitud estructural con las de origen biológico. Las porfirinas meso-sustituidas no tienen análogos biológicos directos, pero su síntesis es fácilmente accesible y se utilizan como modelos biométricos y en química de materiales. En concreto, el estudio de porfirinoides anfífilos meso-sustituidos muestra un interés creciente debido a su versatilidad en el diseño de estructuras tridimensionales por autoensamblaje.

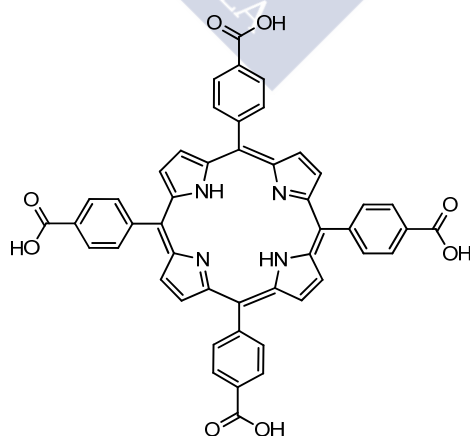


Figura 1.23. Estructura del ácido 4,4',4'',4'''-(porfirin-5,10,15,20- tetrail)tetrakisbenzoico o meso-tetra(4-carboxifenil)porfirina (TTP).

Las porfirinas son conocidas por su intenso color, que es consecuencia de una extensa conjugación del macrociclo. El sistema de enlaces conjugados hace que la

estructura sea rígida sin permitirle cambiar de estado fácilmente. Son estables en ácidos concentrados y las bases fuertes, tales como los alcóxidos, pueden retirar los dos protones ($pK_a \sim 16$) de los átomos de nitrógeno internos para formar un dianión. Por otra parte, los dos átomos libres del nitrógeno de la porfirina ($pK_b \sim 9$) pueden ser protonados fácilmente con ácidos, tales como el ácido trifluoroacético.

El sistema de enlaces conjugados de las porfirinas les otorga propiedades cromóforas con espectros de absorción ultravioleta-visible y de fluorescencia muy característicos. En general, el espectro de absorción ultravioleta-visible consiste en dos regiones distintas. En la región del ultravioleta cercano (370-430 nm) hay una intensa banda de absorción conocida como *banda de Soret* (por Jacques-Louis Soret). Esta banda, también denominada *banda B*, es característica de un sistema de 18 electrones π y tiene un coeficiente de absorptividad molar de aproximadamente de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En la región visible del espectro (500-700 nm) están presentes un número de bandas de absorción más débiles conocidas como *bandas Q* con un coeficiente de absorptividad de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹⁵⁸

Los dos tipos de bandas de absorción (la *B* y las *Q*) surgen de transiciones $\pi-\pi^*$ y pueden ser justificadas considerando el modelo de cuatro orbitales frontera (dos HOMO y dos LUMO) propuesto por Gouterman (*Figura 1.24*). La *banda B* está producida por la transición al segundo estado de excitación ($S_0 \rightarrow S_2$) mientras que las *bandas Q* están producidas por la transición al ($S_0 \rightarrow S_1$). La conversión interna de S_2 a S_1 es rápida, lo que provoca que la fluorescencia que se detecta en este tipo de moléculas surja de la transición desde S_1 . Las *bandas Q* pueden variar en número e intensidad dependiendo de varios factores. Así, el número de átomos de hidrógeno unidos a los átomos internos de nitrógeno, los sustituyentes en el esqueleto y el metal complejado de una porfirina hacen variar la simetría de los orbitales moleculares y su energía, con lo que se obtienen diferentes espectros de absorción en la región del ultravioleta-visible (*Figura 1.25*). La menor simetría de las porfirinas no metálicas causa la excitación a orbitales x e y simétricos y se pueden observar hasta cuatro *bandas Q* en el espectro, denominadas $Q_x(0,0)$, $Q_x(1,0)$, $Q_y(0,0)$ y $Q_y(1,0)$, en orden creciente de energía. El patrón del espectro de absorción cambia de cuatro *bandas Q*, para la base libre de porfirinas con una simetría D_{2h} , a dos *bandas Q* cuando la molécula se encuentra complejada con un metal o completamente protonada en cuyo caso la simetría pasa a ser D_{4h} . Para esta simetría, los orbitales frontera consisten en dos orbitales degenerados de simetrías a_{1u} y a_{2u} (llenos) y otro par de orbitales degenerados de simetría eg (vacíos).¹⁵⁹⁻¹⁶⁰

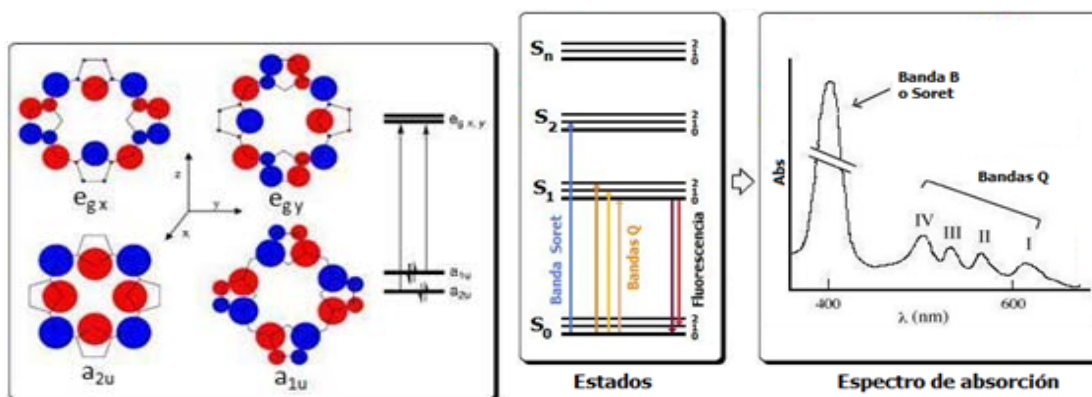


Figura 1.24. Representación general de los orbitales moleculares del esqueleto de porfirina, estados de transición asociados a las bandas de absorción y aspecto del espectro de absorción ultravioleta-visible.

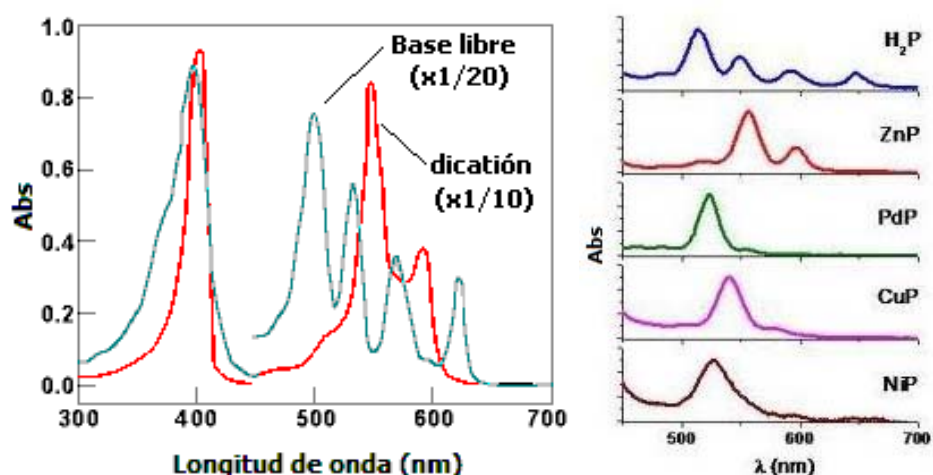


Figura 1.25. Variación de las bandas Q del espectro de absorción UV-Vis de una porfirina según el átomo metálico complejoado.

1.6.2 Homoasociación de porfirinas en disolución acuosa.

La agregación de la clorofila parece ser un factor determinante para las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de los cloroplastos. La agregación de las porfirinas en disolución afecta a la estructura electrónica del macrociclo y con ello a la intensidad y posición de las bandas. Cabe destacar la aparición de una banda entre 450 y 500 nm que se denomina *banda J* y está producida por el solapamiento de orbitales π de dos o más porfirinas. A este tipo de agregados se los denomina agregados-*J*.¹⁶¹⁻¹⁶⁷ y son producidos por superposición de orbitales π . Existen numerosos trabajos centrados en el estudio de este tipo de solapamiento de orbitales π a través de la modificación de porfirinas.¹⁶⁸⁻¹⁷⁸ En una línea paralela se han desarrollado polímeros con restos de porfirinas que solapan sus orbitales π en busca de materiales con propiedades de transferencia electrónica.¹⁷⁹⁻¹⁸³ En medicina, los oligómeros de porfirinas han mostrado ser especialmente activos en terapias fotodinámicas de tumores.

Como ya se ha comentado, la protoporfirina IX (*Figura 1.22*) es la porfirina natural más abundante en la naturaleza y la meso-tetra(4-carboxifenil)porfirina, denominada TCPP de forma abreviada, es una porfirina meso sustituida de origen sintético (*Figura 1.23*). Son moléculas con carácter anfílico dado que poseen grupos ionizables en su periferia y una gran superficie hidrófoba (*Figura 1.26*), por lo que pueden formar agregados y bicapas moleculares.

1.6.3 Protoporfirina IX.

En el caso de la protoporfirina IX, cuando se aumenta el pH en disolución acuosa, se observa un desplazamiento de la banda Soret y la aparición de la banda *J* sobre 490 nm en el espectro ultravioleta visible (*Figura 1.27*).¹⁸⁴⁻¹⁸⁵ Lo mismo ocurre cuando se trabaja con la molécula coordinada con un átomo de hierro (hemin).¹⁸⁵

Este comportamiento se ha justificado mediante un modelo en el que la molécula puede agruparse inicialmente como dímeros de protoporfirina interactuando axialmente mediante el empaquetamiento π - π y lateralmente entre los contactos hidrófobos pudiendo agruparse según un ángulo de separación de 38 ó 52°.¹⁸⁴ Estos dímeros podrían orientarse

con los anillos dispuestos cara-cara y los grupos carboxílicos ionizados en disposición cabeza-cola en disoluciones acuosas alcalinas con pH mayor de 8 (Figura 1.28 A). A valores de pH intermedios, entre 3 y 7, podrían formarse estructuras supramoleculares extendidas a través de una red de enlaces de hidrógeno entre los ácidos carboxílicos de las cadenas laterales parcialmente neutralizados que estabilizarían la formación de agregados de mayor tamaño (Figura 1.28 B). A menores valores del pH, entre 0 y 3, la molécula permanecería como monómero libre en disolución.

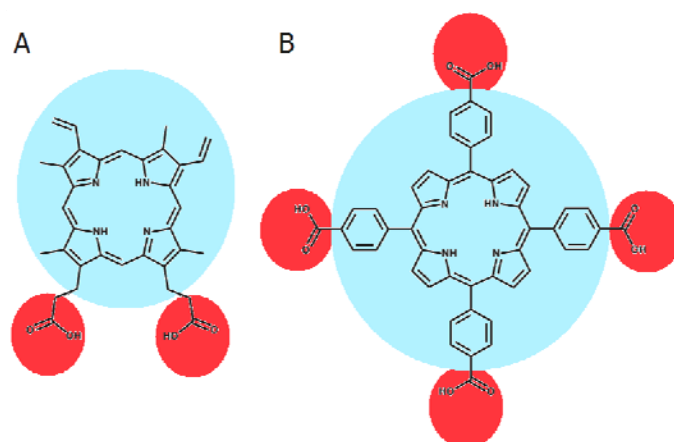


Figura 1.26. Representación de la naturaleza anfifílica de las porfirinas de interés: A) Protoporfirina y B) meso-tetra(4-carboxifentl)porfirina.

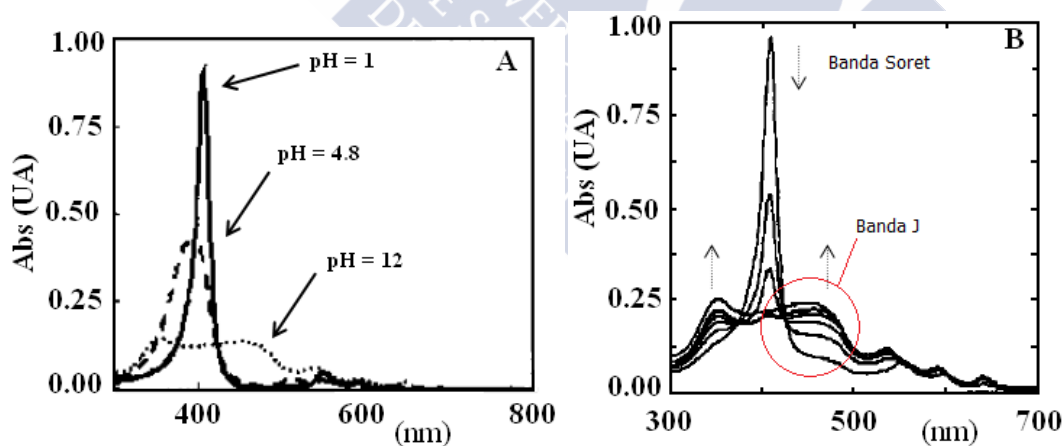


Figura 1.27. Espectros UV-vis de una disolución acuosa 5×10^{-3} M de protoporfirina IX: A) a diferente pH y B) Variación de pH de 1 a 4. Según *Scolaro et al.*¹⁸⁴

Del estudio de imágenes SEM y SNOM así como el cálculo del radio hidrodinámico a partir de medidas de dispersión de luz dinámicas, los agregados formados en disolución acuosa, a valores intermedios del pH, tienen una forma alargada con un tamaño que oscila entre 200 y 500 nm y una altura de 60 nm de media (Figura 1.29). Al considerar el carácter anfífilo de la protoporfirina IX se ha sugerido la formación de vesículas multilaminares (“capas de cebolla”). Al mismo tiempo, el análisis de las imágenes SEM reveló regiones de la muestra donde las vesículas colapsan en una estructura laminar continua.

Cabe destacar que, al igual que sucede con muchos otros tipos de moléculas, el cambio de un único grupo funcional puede hacer variar el tipo y tamaño de estructura de los agregados de forma radical. En la *Figura 1.30* se recoge un ejemplo.

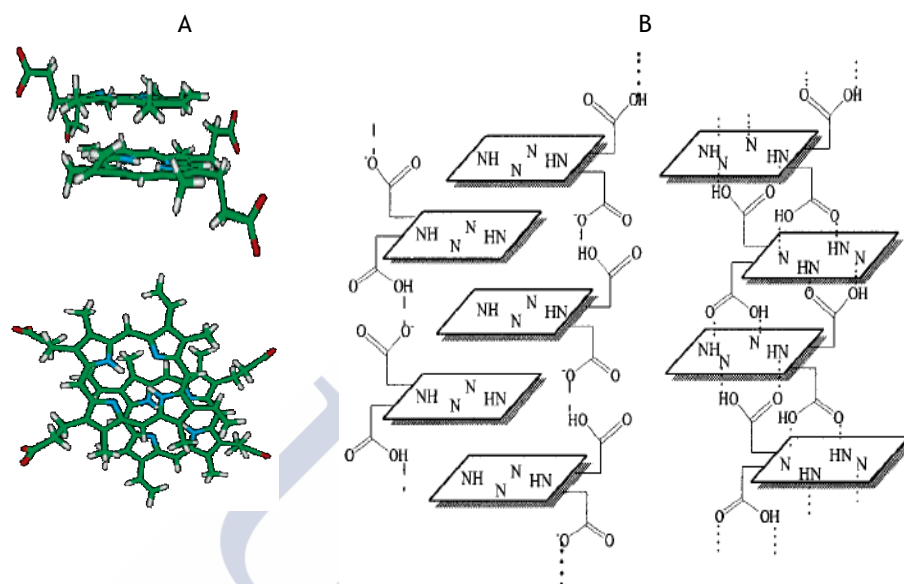


Figura 1.28. Representaciones de la posible disposición de la protoporfirina al formar (A) un dímero y (B) agregados de mayor tamaño.¹⁸⁴

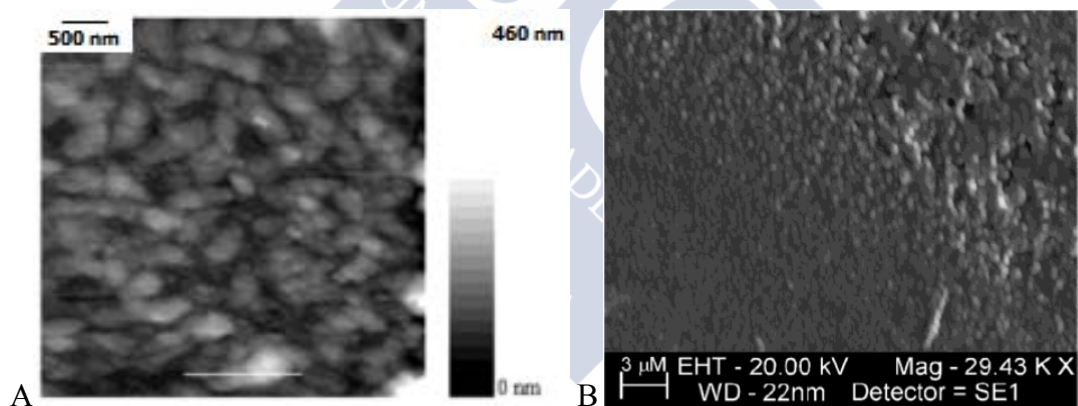


Figura 1.29. Imágenes (A) Topografía y (B) SEM de agregados de Protoporfirina IX a partir de una disolución acuosa $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ a pH 5.¹⁸⁴

Al funcionalizar la protoporfirina IX, a través de su ácidos carboxílicos, con cadenas de trietilenglicol se forman microvesículas multilaminares de aproximadamente 65 nm de diámetro en una mezcla aprótica relativamente no polar de disolventes (ciclohexano/cloroformo) y agregados micelares de aproximadamente 6 nm en una mezcla polar prótica de disolventes (cloroformo/metanol).¹⁸⁴ Si reducimos los grupos vinilo y sustituimos las ácidos carboxílicos por grupos amina en la protoporfirina IX, la diaminoporfirina es capaz de generar en disolución acuosa fibras de 25-33 nm de diámetro externo y 5 nm de diámetro interno. En una mezcla de dimetilsulfóxido y agua (1:1) se forman varillas micelares de 3 nm de diámetro.¹⁸⁶ La protoporfirina IX derivada con dos grupos aminoglicosamida puede agregarse en forma de fibras con radios de 4 a 6 nm y longitudes que varían desde 20 a 200 nm o más.¹⁶⁶

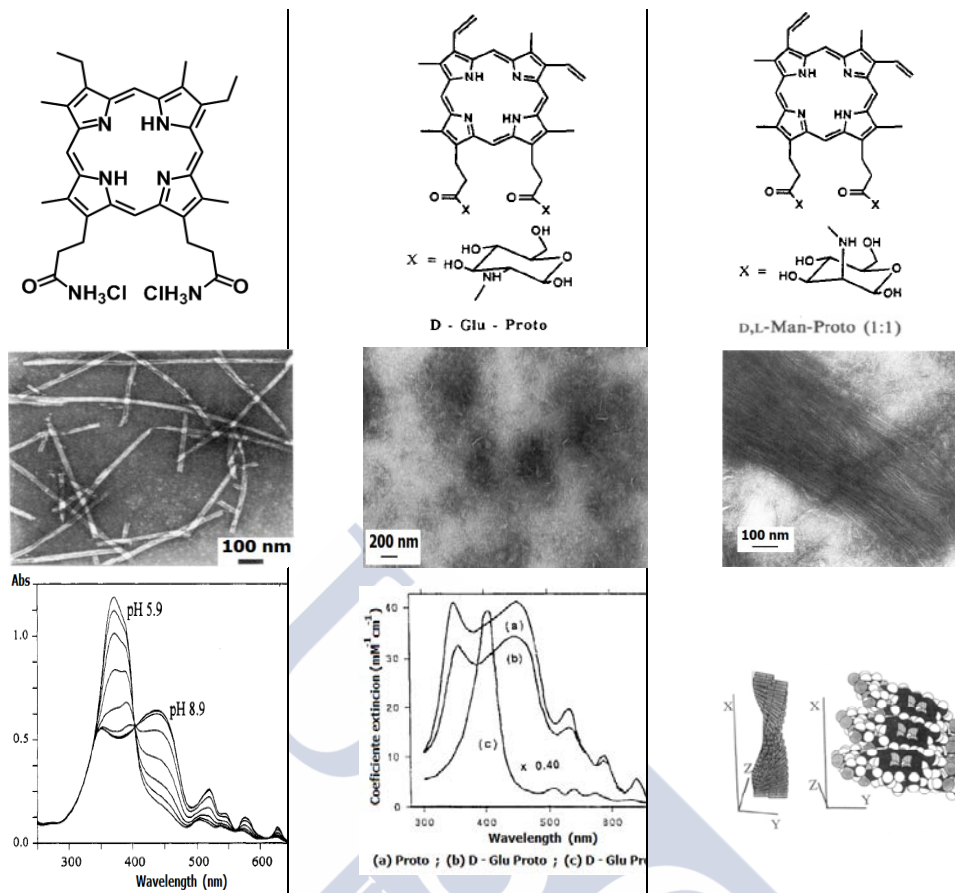


Figura 1.30. Micrografías de las estructuras generadas por derivados de la protoporfirina IX y variación del espectro de absorción UV-Vis.^{166,187}

1.6.4 Meso-tetra (4-carboxifenil) porfirina (H₂TCP).¹⁸⁸

El comportamiento de H₂TCP en disolución es el esperado para cualquier tipo de porfirina, presentando una banda *Soret* a 414 nm y cuatro bandas *Q* a 516, 552, 591 y 645 nm (Figura 1.31).

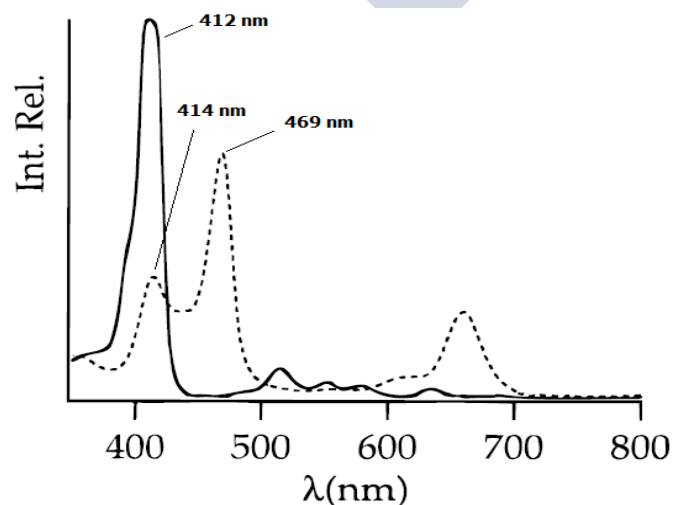


Figura 1.31. Espectro de absorción de H₂TCP en agua en ausencia (línea continua) y en presencia (línea discontinua) de ácido trifluoroacético (10% vol). Por Akins *et al.*¹⁸⁸

Los cambios en el espectro que se producen cuando se añade ácido trifluoroacético han sido atribuidos a la protonación de los átomos de nitrógeno del anillo porfirínico al mismo tiempo que se forman agregados. El desplazamiento de la banda *Soret* (desde 404 hasta 440 nm), la reducción del número de bandas *Q* y la aparición de la banda *J* han sido observados en diferentes estudios que pueden constatarse en la bibliografía (*Figura 1.32 y Tabla 1.3*).^{177,188-189}

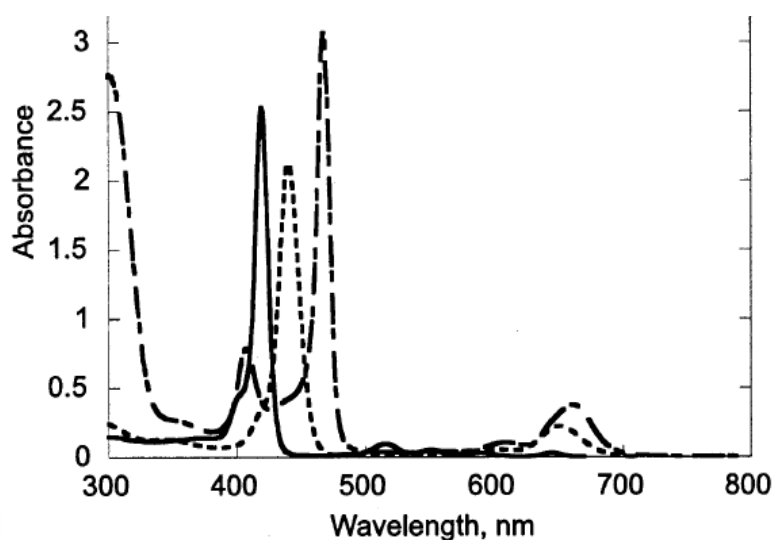


Figura 1.32. Espectro de absorción de TCPP en agua a pH 10 (línea continua), de H_2TCPP^{2+} en metanol acidificado (línea de puntos) y de agregados de H_2TCPP^{2+} en agua con HNO_3 a pH 0.9 (línea discontinua). Concentración de porfirina de 5×10^{-6} M.¹⁸⁹

Tabla 1.3 Tabla de máximos de absorción de las bandas *Soret* y las bandas *Q* de la TCPP.¹⁸⁹

Porfirina	Disolvente	λ_{max} , nm	
		Banda Soret	Banda Q
TCPP	H_2O , pH 10	414	516, 552, 591, 645
TCPP	EtOH	416	513, 545, 588, 644
H_2TCPP^{2+}	EtOH/0.3M H^+	440	599, 651
H_2TCPP^{2+}	H_2O , pH 1.2	404, 444	520, 555, 592, 648
H_2TCPP^{2+}	H_2O/HNO_3 , pH 0.9	406, 467	610, 662
H_2TCPP^{2+}	H_2O/HCl , pH 0.9	417	664

La estructura de los agregados que se ha propuesto parte de la consideración de la conformación plana de las especies moleculares interactuantes, de las fuerzas intermoleculares, de la transferencia de carga intramolecular o la protonación y de los alineamientos intermoleculares que llevan a una reducción de la energía electrostática. Como resultado, se puede predecir que las subunidades moleculares en los agregados se disponen en un ordenamiento cofacial que al mismo tiempo puede tener un desplazamiento con respecto a la molécula vecina de forma que los grupos de cargas opuestas se posicionen uno cerca del otro. La bibliografía recoge diferentes posibilidades de alineamiento molecular (*Figura 1.33*) donde estas estructuras se verían estabilizadas por interacciones electrostáticas. Choi *et al*¹⁸⁹ han propuesto un apilamiento longitudinal cara-cara cuando la molécula se encuentra en medio acuoso en presencia de HCl (*Figura*

1.33 C), mientras que al utilizar HNO_3 se produce un desplazamiento en el apilamiento de una molécula respecto de la vecina (Figura 1.33 D). Para los dímeros han propuesto una disposición perpendicular de una molécula frente a la otra (Fig. 1.33 A). Akins *et al*¹⁸⁸ han propuesto únicamente estructuras de agregación en las que el apilamiento se ve reforzado por interacciones del tipo electrostático (Figura 1.33 B y D).

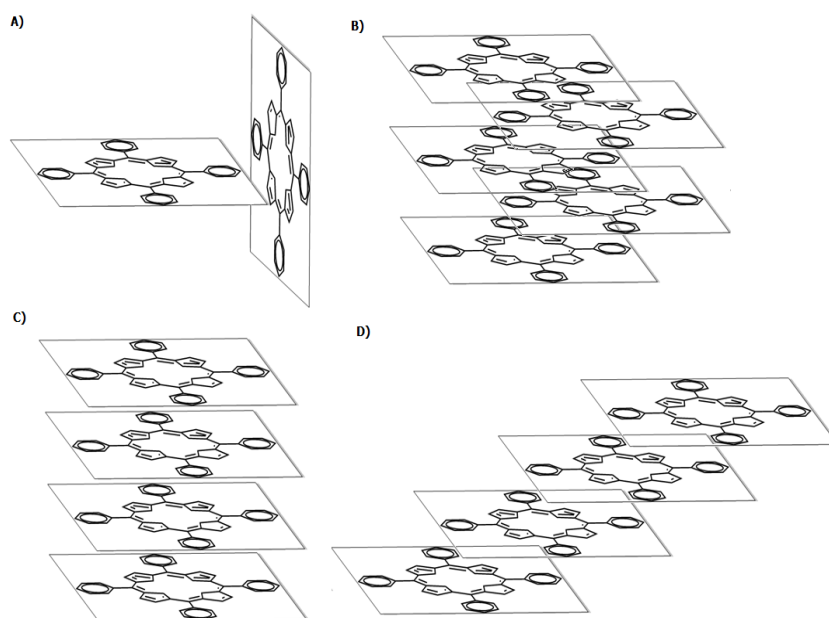


Figura 1.33. Representación de los posibles alineamientos moleculares de TCPP donde se omiten los grupos carboxílicos.¹⁸⁸

Por lo tanto, el estudio del espectro de absorción ultravioleta-visible de este tipo de moléculas es una herramienta muy útil para elucidar el tipo de apilamiento que da lugar a la formación de agregados *J* y en consecuencia a sus propiedades morfológicas. De una forma general, Okada *et al*¹⁷⁷ han propuesto una relación entre el deslizamiento en el apilamiento de derivados de tetrafenilporfirinas y el desplazamiento de las bandas *Soret* y *Q* (Figura 1.34).

La forma y el tamaño de los agregados de $\text{H}_2\text{TCPP}^{2+}$ en disolución acuosa ácida han sido estudiados por Doan *et al*.¹⁹⁰ Las imágenes de AFM (Figura 1.35) muestran una clara tendencia de la molécula a agregarse siguiendo una única dirección. Al trabajar con HNO_3 aparecen varillas de entre 3 y 4 nm de diámetro, mientras que al utilizar HCl , los agregados pueden presentar forma de anillo de entre 200-2000 nm de diámetro y entre 4-5 nanómetros de altura. En ambos casos aparecieron estructuras amorfas y se observó que los agregados formados en presencia de HNO_3 fueron cinéticamente menos estables que los formados en presencia de HCl . Los resultados obtenidos muestran también que a valores del $\text{pH} < 1$ se confirma la existencia de una especie libre asignada como dímero. Al relacionar este trabajo con el realizado por Okada *et al*,¹⁷⁷ y comparar los espectros de absorción ultravioleta-visible, la formación de agregados cuando se trabaja en presencia de HNO_3 se produciría a través de un apilamiento con una distancia corta de deslizamiento. Al trabajar con HCl la agregación se produciría a través de un apilamiento con una distancia más larga. La menor estabilidad cinética de los agregados estaría pues relacionada con el apilamiento con distancia corta de deslizamiento, lo que se traduce en una menor eficacia de las interacciones electrostáticas.

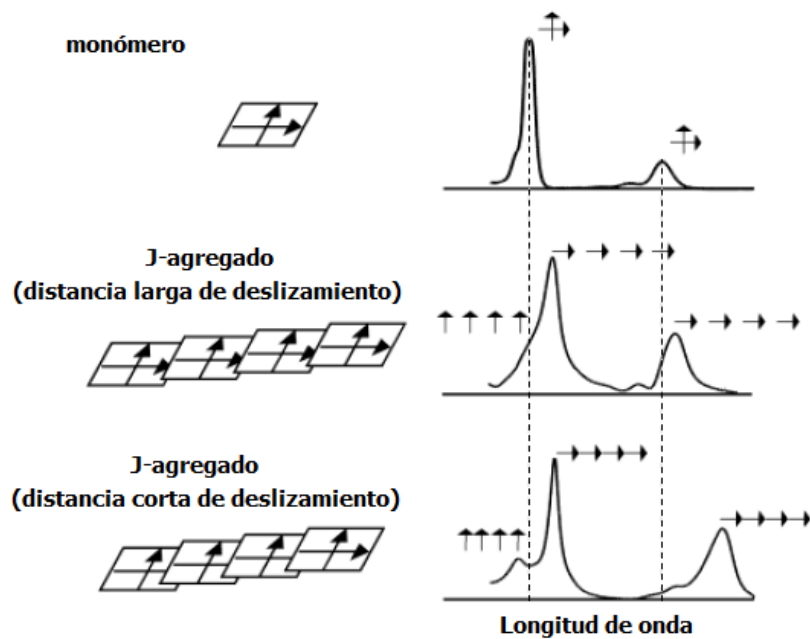


Figura 1.34. Representación esquemática de la relación entre la distancia de deslizamiento y el espectro de absorción UV-Vis de los agregados *J*.¹⁷⁷

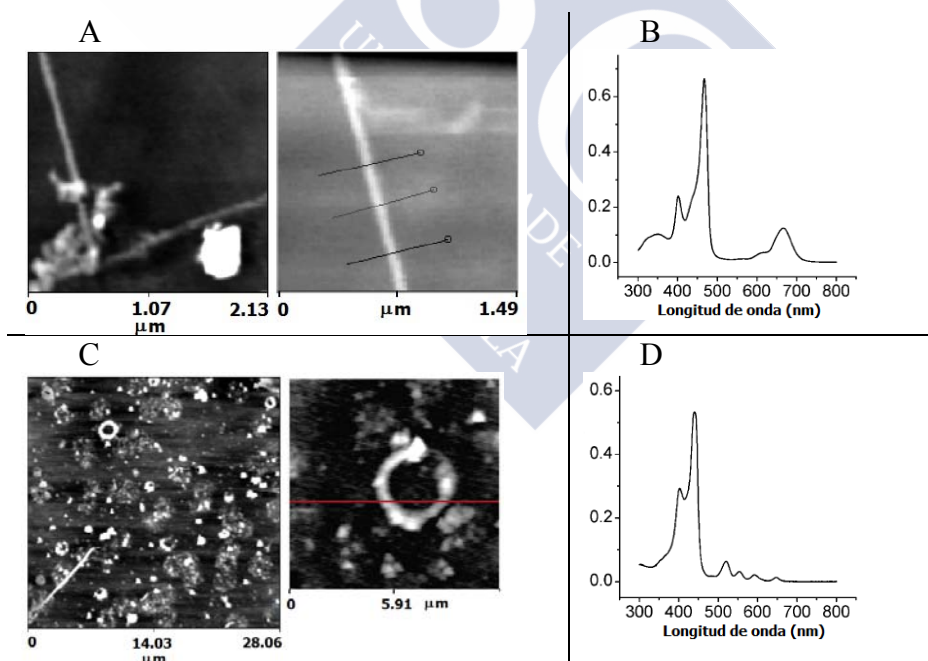


Figura 1.35. Imágenes de AFM y espectro de absorción UV-Vis de agregados generados por H_2TCPP^{2+} . A) Nanofibras generadas sobre sílice a partir de una disolución con HNO_3 . B) Disolución acuosa con HNO_3 a pH 0,8. C) Nanoanillos generados sobre sílice a partir de una disolución con HCl. D) Disolución acuosa con HCl a pH 1,2.¹⁹⁰

Si de nuevo se compara el efecto que producen diferentes grupos funcionales en el esqueleto de la tetrafenilporfirina, se observa que puede variar el tipo y tamaño de la estructura de los agregados. La tetrafenilporfirina sin grupos funcionales forma unas películas suaves en un rango de varias micras en presencia de 0.2 M de HCl. Si el HCl se

aumenta hasta 2 M se forman unas finas capas continuas en forma de granos con un tamaño de 3-5 μm (Figura 1.36).¹⁹¹⁻¹⁹² Esto parece el resultado de la unión de varias partículas de entre 200-400 nm.

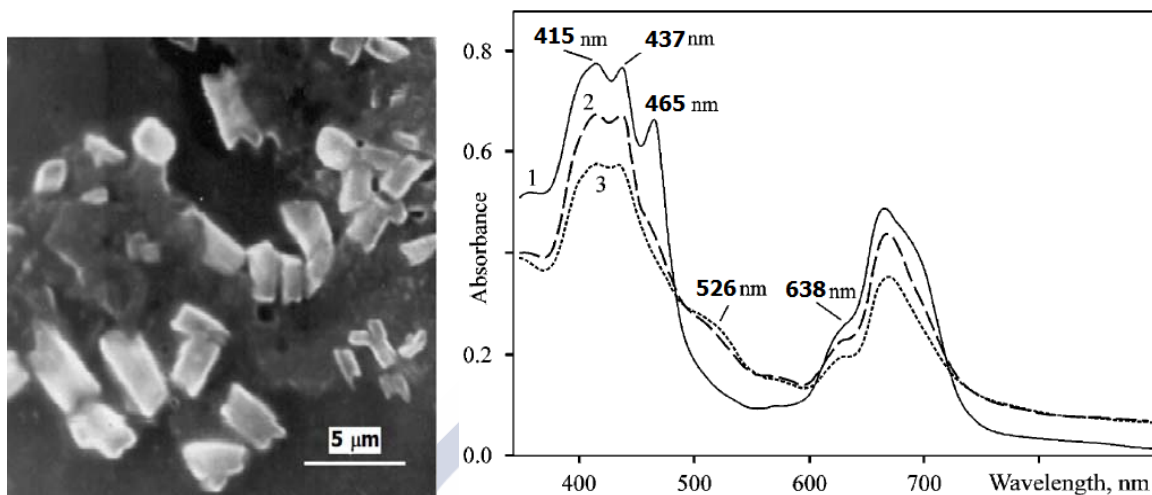


Figura 1.36. Micrografía SEM de agregados formados por TPP al evaporarse una disolución 0.86 Molar en agua/THF en presencia de HCl 0.4 Normal. Variación del espectro de absorción UV-Vis de una disolución de TPP 15 μM en agua/THF en presencia de HCl 2 Normal, transcurrida 1) 1 hora, 2) 24 horas y 3) 68 horas.¹⁹²

También Udál'sop *et al*¹⁹² han propuesto la estructura molecular del dímero de tetrafenilporfirina con dos moléculas de agua que intervendría en la formación de los agregados de mayor tamaño (Figura 1.37).

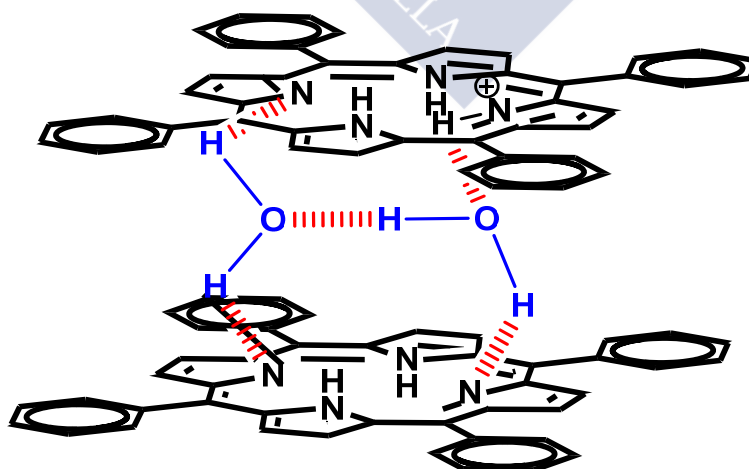


Figura 1.37. Estructura molecular del complejo dimérico agua-TPP.¹⁹²

Los grupos CN, NO₂ y OMe unidos a los grupos fenilo en posición 4 forman monocristales al depositar la muestra sobre una superficie de vidrio (Figura 1.38).¹⁷⁷

A través de interacciones iónicas se han obtenido nanotubos, de 60 nm de diámetro y varias micras de longitud, utilizando dos porfirinas diferentes, una catiónica y la otra aniónica (Figura 1.39).¹⁷³

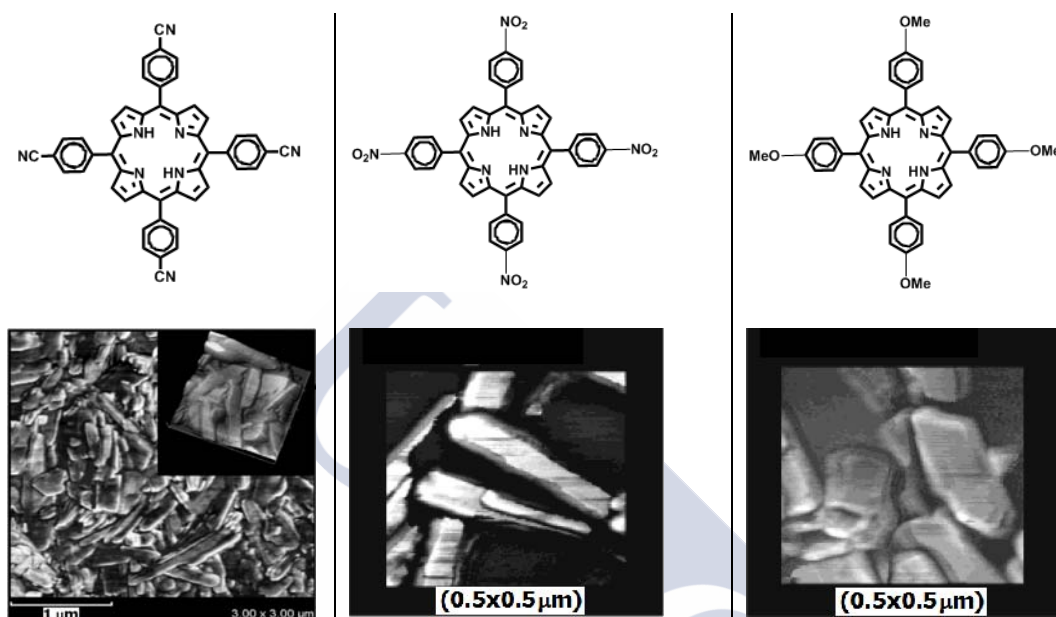


Figura 1.38. Imágenes AFM de monocristales al evaporarse una disolución sobre una superficie de vidrio y las estructuras correspondientes.¹⁷⁷

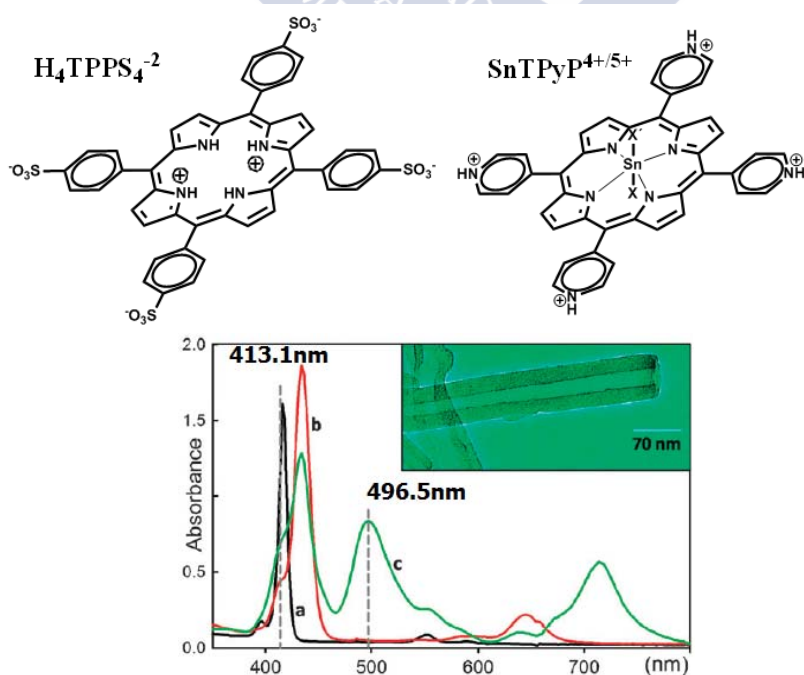


Figura 1.39. Estructuras de las porfirinas, espectro de absorción Ultravioleta-visible y micrografías TEM de A) SnTPyP^{4+/5+}, B) H₄TPPS₄⁻², y C) suspensión coloidal de nanotubos.¹⁷³

1.6.5 Metaloporfirinas

Las especiales características de algunos productos sintetizados (*vide infra*), derivados de la porfirina, hacen necesario un último repaso bibliográfico de conceptos en los que aun no se ha centrado la atención. La habilidad de los macrociclos porfirínicos para coordinar metales es una de las aéreas más estudiadas en la química de las porfirinas, siendo las piezas clave de los procesos de transferencia electrónica, respiración y fotosíntesis.

La formación de metaloporfirinas se debe a la habilidad de la base libre de porfirinas para complejarse con casi cualquier ion metálico con los átomos de nitrógeno pirrólicos gracias a la formación de enlaces σ N-metal.¹⁹³⁻¹⁹⁴ Esta área específica de la química de porfirinas está bien desarrollada y le acompañan el estudio de los quelatos de los centros metálicos, el estudio del enlace metal-metal y sistemas organometálicos. Los metales se pueden coordinar también a las porfirinas a través de enlaces σ o π a átomos de carbono según la estructura y la presencia o no de grupos con capacidad para ello, como grupos carboxilato o sistemas aromáticos.¹⁹⁵ Existe un gran número de posibilidades estructurales para la síntesis de porfirinas organometálicas conteniendo uno o más enlaces metal-carbono. Se puede hacer una clasificación por grupos según el número de iones metálicos, el tipo de enlace y la proximidad al anillo tetrapirrólico (*Figura 1.40*).

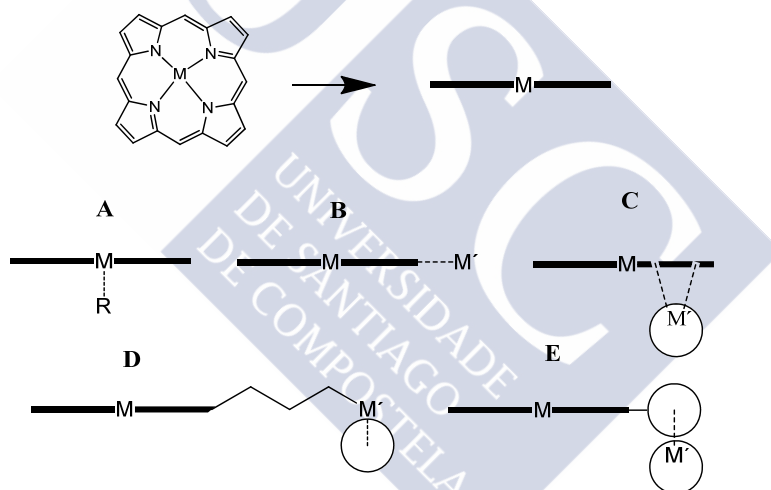


Figura 1.40. Tipos de posibles interacciones metal-porfirina.¹⁹⁵

La estructura del tipo A es la más común y sencilla y se caracteriza por tener enlaces σ con el metal a través de los nitrógenos pirrólicos. El número y disposición de los ligandos que acompañan al metal puede variar (*Figura 1.41*). Los ejemplos más representativos en la naturaleza son el grupo hemo, la cianocobalina (vitamina B12) o la clorofila, habiéndose sintetizado numerosas estructuras. También se pueden incluir dentro del tipo A los compuestos con varios anillos tetrapirrólicos.¹⁹⁶⁻¹⁹⁷

La estructura tipo B se caracteriza por tener enlaces σ con el metal a través de los nitrógenos pirrólicos, como la estructura A, pero a mayores posee un enlace M-C en la periferia del anillo. Así, aparecen en la bibliografía moléculas con níquel-paladio,¹⁹⁸ níquel-platino,¹⁹⁹ por nombrar algunos ejemplos.

Las estructuras C, D y E (*Figura 1.40*) se caracterizan por formar enlaces π con el metal a través de sistemas aromáticos periféricos por interacción directa con el sistema π aromático de la porfirina o por complejación con grupos amino. Si se utiliza la

nomenclatura específica, el tipo A se define como η^1 -pirrol y el tipo C se define como $\eta^1:\eta^5$ -pirrol (Figura 1.41). En la bibliografía se muestra cómo la estructura tipo C puede interactuar con dos metales pesados simultáneamente (Figura 1.42).²⁰⁰⁻²⁰¹

Las estructuras D y E únicamente se diferencian en la distancia que separan los sustituyentes moleculares con capacidad para complejar metales del sistema tetrapirrólico. En muchos casos se trata de sistemas η^6 -fenilo, η^5 -ciclopentadienilo y η^1 amino. Hasta la fecha, existen numerosos trabajos para estos dos tipos de moléculas dada la versatilidad estructural que plantea. Entre algunos ejemplos se mencionan estructuras moleculares con níquel, cobre, cinc o manganeso en posición pirrólica, y paladio o platino en posición periférica. En realidad en muchos de estos trabajos se plantean estructuras en las que el segundo metal (que no interactúa con la porfirina) ejerce un papel conector como en la estructura de un copolímero y en algún caso ejerciendo un papel catalizador en la formación de enlaces covalentes.²⁰²⁻²⁰⁹

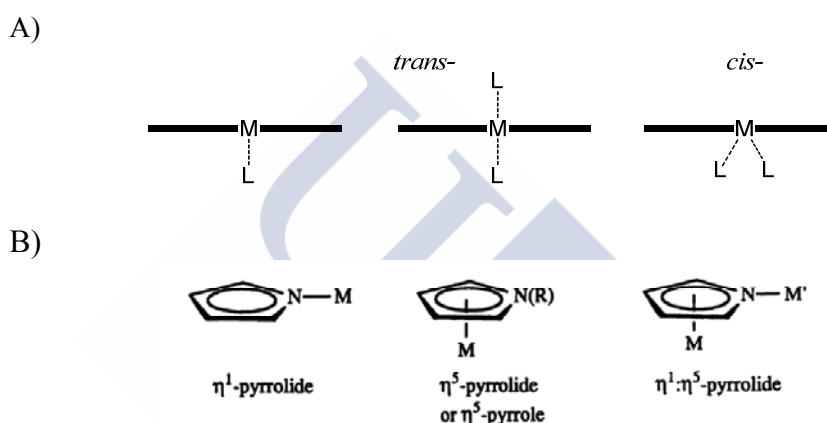


Figura 1.41. A: Disposición de los posibles ligandos unidos al metal dentro del anillo de la porfirina. B: Tipos de unión del metal a un anillo pirrólico.

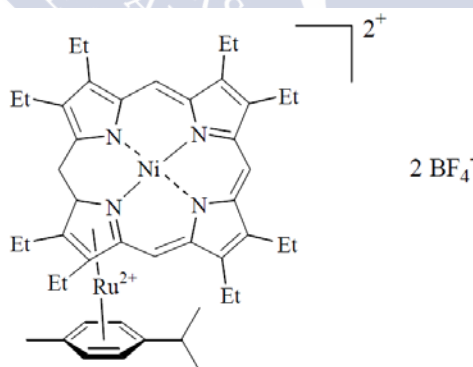


Figura 1.42. Estructura del $[(\eta^6\text{-cymene})\text{Ru} \eta^5\text{-}\{\text{Ni}(\text{OEP})\}](\text{BF}_4)_2$ con dos metales pesados.²⁰¹

1.6.6 Antecedentes bibliográficos de esteroide-porfirinas.

La idea de añadir a un esqueleto de porfirina un nuevo sustituyente es un concepto que ha dado paso a un campo de estudio de gran envergadura. Teniendo en cuenta las cualidades que poseen las porfirinas, al pegar moléculas de diferente naturaleza, se originan nuevos materiales de propiedades muy variables y de gran interés. Grupos de investigación, dentro del campo de la Química supramolecular y en busca de nuevas aplicaciones farmacológicas o de nuevos materiales, ya se han centrado en el concepto

común de “esteroide-porfirina” dando como resultado la publicación de numerosas moléculas.^{87,149,210} Las Figuras 1.43 y 1.44 recogen algunas estructuras publicadas.

Los tetrámeros de esteroide unidos por un puente de porfirina son los primeros compuestos de esta clase en aparecer a finales de los 80 y principios de los 90. Distintos esteroides se unen con enlaces amida, por la cola hidrocarbonada, a la posición orto del grupo fenilo de la tetrafenilporfirina (Figura 1.43 A y B). Las posibilidades son múltiples, desde extender el brazo de unión entre porfirina y esteroide (Figura 1.43 C) hasta la combinación de distintas moléculas a la vez como un “esteroide-porfirina-fullereno” (Figura 1.43 D). También aparecen trabajos con esteroides cíclicos (Figura 1.44 A), con distintos enlaces de unión (Figura 1.44 B y C) e incluso octámeros (Figura 1.44 D).

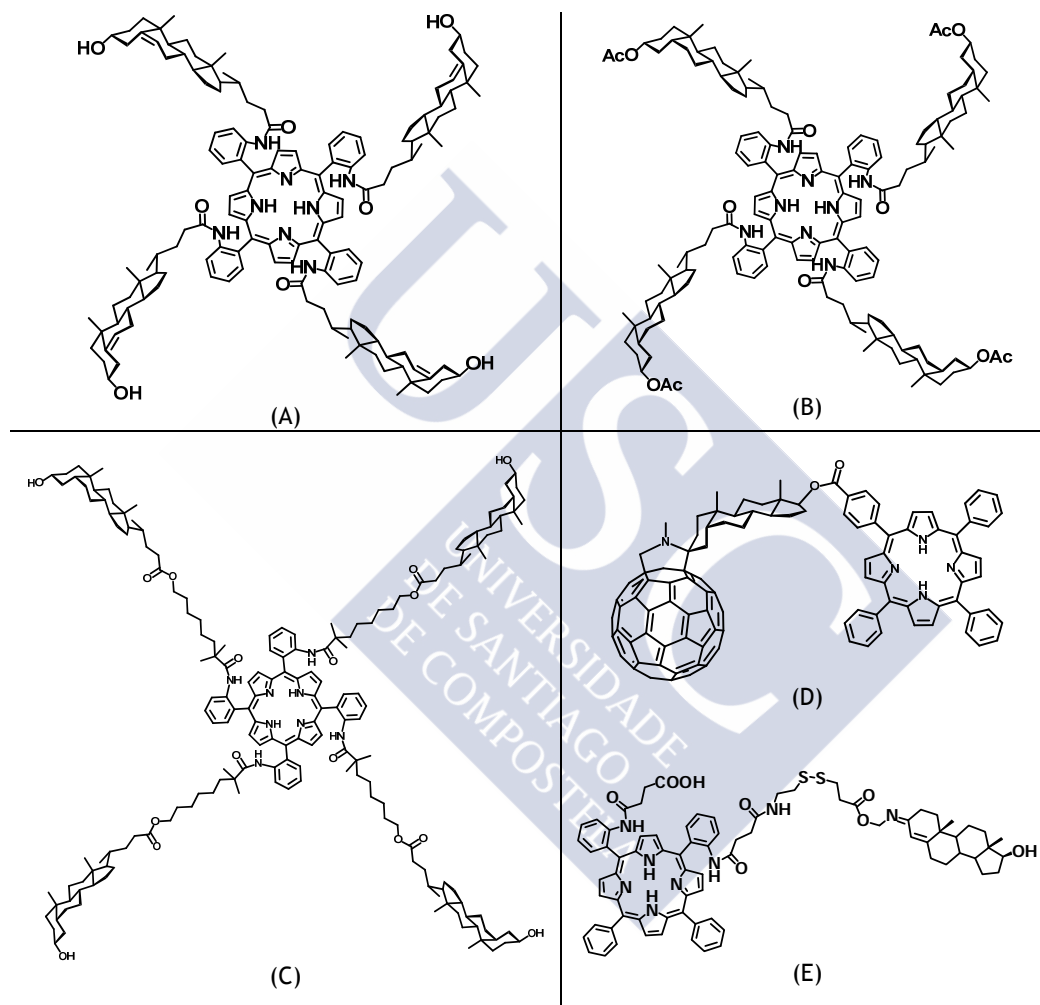


Figura 1.43. Estructuras de esteroide-porfirinas publicadas por Groves *et al*²¹¹ (A), Tsuchida *et al*²¹² (B y C), Schuster *et al*²¹³⁻²¹⁵ (D) y Girenti *et al*²¹⁶ (E).

A partir de un dímero de esteroide (Figura 1.45 A), Bonar-Law *et al*^{153,217-219} sintetizaron una serie de moléculas con restos de porfirina unidos a través de enlaces amida. Estas moléculas se pueden presentar como porfirinas recubiertas por capas de esteroides.

El campo de estudio en el que se engloba la síntesis de este particular tipo de moléculas resulta de lo más variable y está enfocado desde la química supramolecular hacia la creación de enzimas de origen sintético, el estudio de dinámica de membranas o los fenómenos de transferencia. Gracias a los restos de esteroide la molécula puede poseer actividad de reconocimiento molecular y la capacidad de introducirse en bicapas lipídicas

modificando sus propiedades. Por otra parte, el esqueleto de la porfirina confiere capacidad de transferencia de carga, energía y transporte. Por ejemplo, la molécula representada en la *Figura 1.43 A* se comporta como un espaciador de membrana en vesículas de fosfolípidos, ubicándose en el medio de la bicapa, con el plano que contiene al anillo de la porfirina paralelo al plano de la interfase bicapa-agua, y da propiedades de catálisis de oxidación regioselectiva. La molécula de la *Figura 1.44 A* presenta reconocimiento enantioselectivo de la molécula de morfina y las de la *Figura 1.44 (B y C)* tienen propiedades de receptor de sacáridos en medios con disolventes próticos. Las moléculas representadas en la *Figura 1.43 (B y D)* se sintetizaron con el propósito de obtener un modelo de transportador de oxígeno y en el estudio de procesos de transferencia de energía y carga producidos después de la foto-excitación, respectivamente. Las moléculas de la *Figura 1.45* presentan propiedades de reconocimiento molecular de polialcoholes.

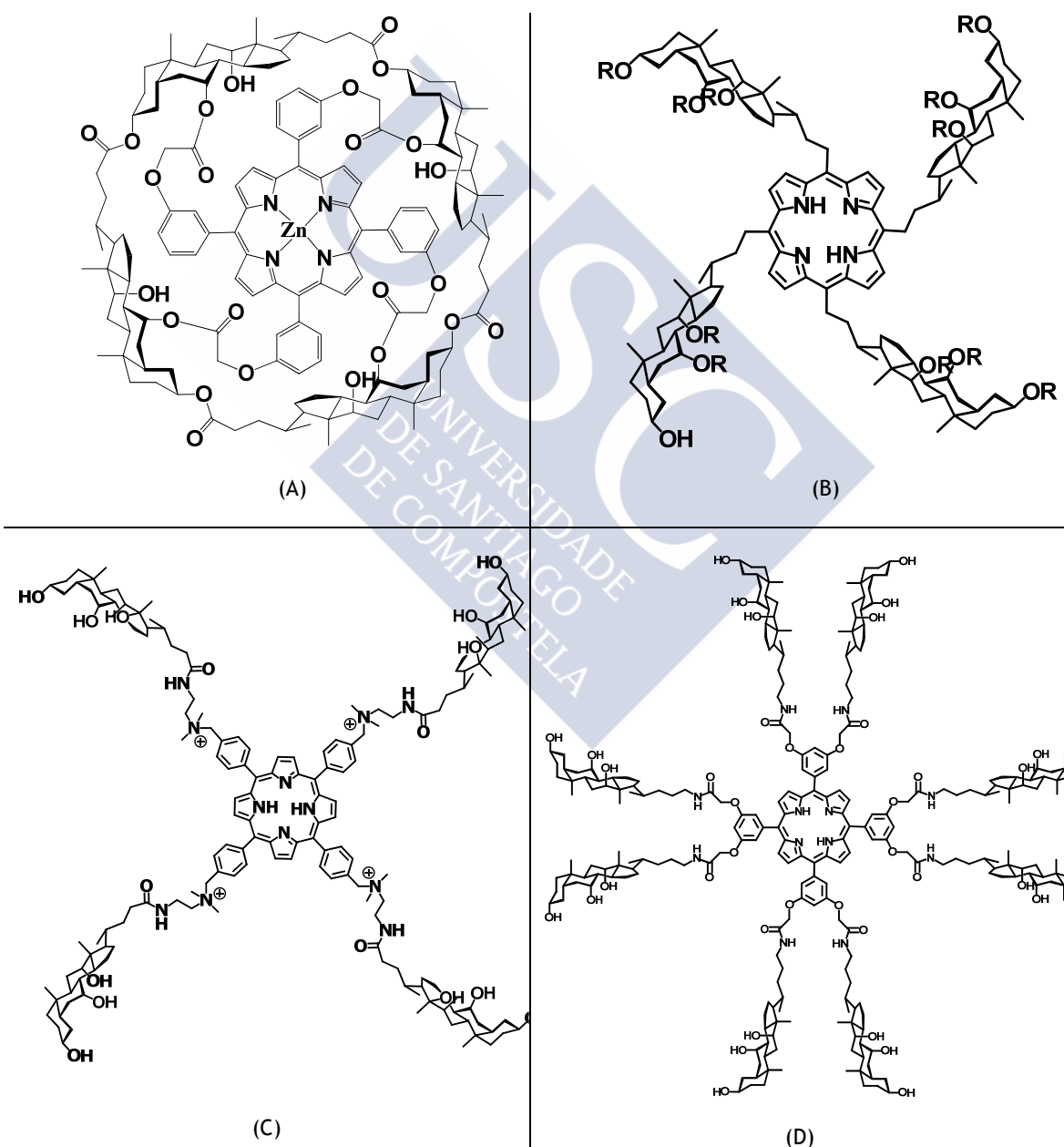


Figura 1.44. Estructuras de esteroide-porfirinas sintetizadas por Bonar-Law *et al.*,²²⁰ (A); Dukh *et al.*²²¹ (B); Koivukorpi *et al.*²²⁻¹²³ (C); Zhou *et al.*¹²⁰ (D).

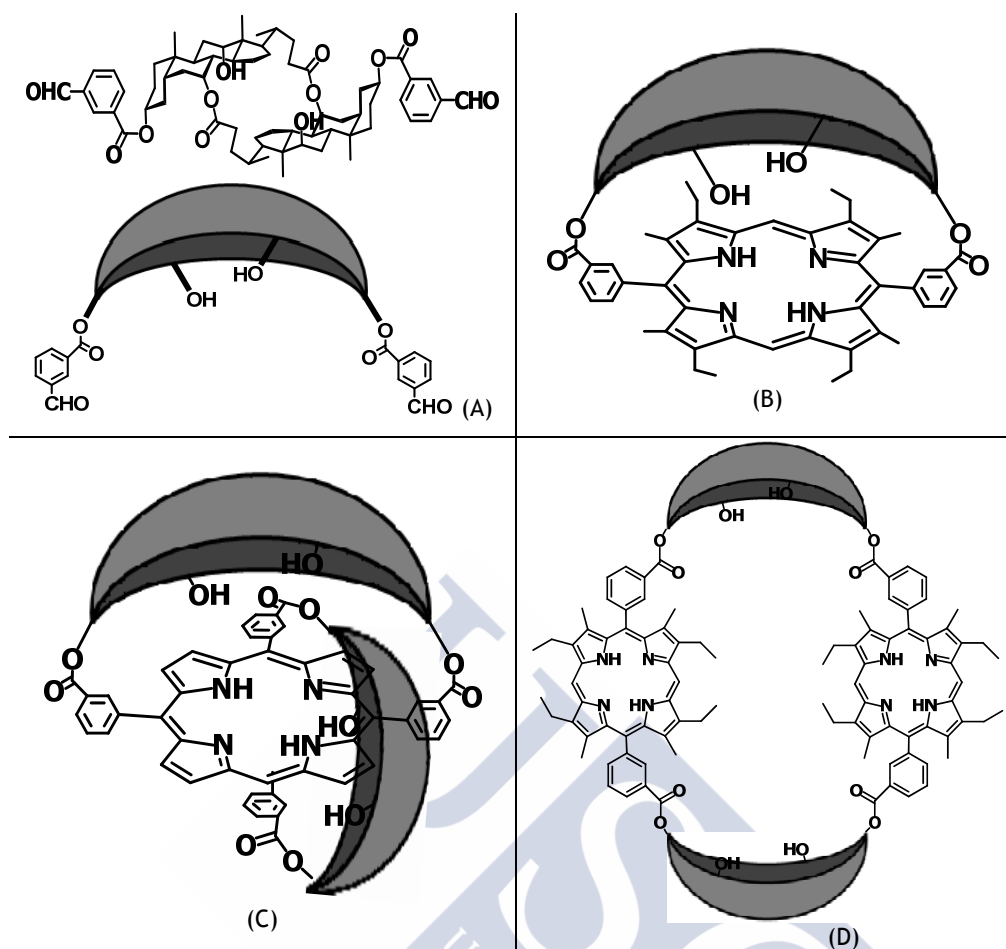


Figura 1.45. Estructuras de esteroide-porfirinas sintetizadas por Bonar-Law *et al*^{153,210,217,219}

1.7 CONSIDERACIONES ESPECIALES DE LAS ESTRUCTURAS SINTETIZADAS.

La gran mayoría de los productos que se han sintetizado en la presente Tesis han implicado la formación de al menos un enlace amida o enlace peptídico (Figura 1.46). La formación de este enlace a partir de un ácido y una amina implica la pérdida de una molécula de agua y la formación de un enlace covalente OC-N. En su estado natural, los sustituyentes de los átomos de carbono y nitrógeno adoptan una única conformación tridimensional. Ello es debido al carácter de doble enlace parcial existente entre los citados átomos.

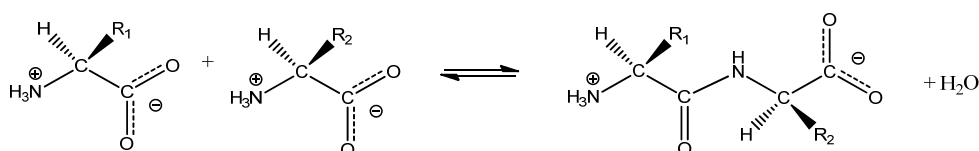


Figura 1.46. Formación del enlace amida.

Efectivamente, mediante difracción de Rayos X se ha comprobado que el enlace peptídico es más corto (133 pm) que un enlace sencillo normal (146 pm) ya que se estabiliza por resonancia. Esto implica un cierto carácter (60%) de enlace doble, razón

por la que no hay giro libre en torno a este enlace. Esta estabilización obliga a que los cuatro átomos que forman el enlace peptídico más los dos carbonos que se encuentran en posición α con respecto a dicho enlace se encuentren en el mismo plano. Sin embargo, el resto de los enlaces (N-C y C-C) son enlaces sencillos verdaderos, con lo que podría haber giro. En definitiva, la estabilización por resonancia del enlace peptídico hace que sea una unión fuerte y resistente pero restringe la conformación a una ordenación planar rígida. Esto impone restricciones importantes al número posible de conformaciones que puede adoptar una proteína. Desde el punto de vista energético, el enlace peptídico conlleva una variación de $\Delta G^\circ = 10 \text{ kJ/mol}$.

En el laboratorio, la unión entre sintones puede lograrse mediante la utilización de métodos que implican (i) la reacción de un grupo amino con un cloruro de ácido; (ii) la reacción entre el grupo carboxílico con un grupo amino utilizando catalizadores como DEPC (dietilcianofosfonato) o HOBt/DIC (hidrato de 1-Hidroxibenzotriazol/*N,N'*-Diisopropilcarbodiimida) para acelerar la formación del enlace amida (*Figura 1.47*); (iii) la reacción de un anhídrido con un grupo amino derivado; y (iv) la utilización de un cloruro de ácido.

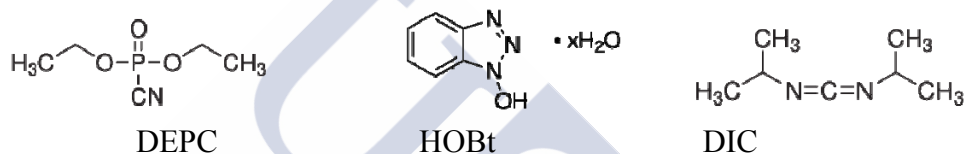


Figura 1.47. Reactivos utilizados para la formación del enlace amida.

En las síntesis empleadas para la obtención de casi todos los productos obtenidos y descritos en esta memoria se ha empleado el método con DEPC. Este método es sencillo, limpio, de un rendimiento aceptable y que, de algún modo, imita a la naturaleza a través de compuestos que contienen fósforo.

La hidrólisis del enlace amida es una reacción favorecida termodinámicamente aunque muy lenta a pH y temperatura fisiológicos. Los péptidos son metaestables y se hidrolizan mediante ácidos o bases minerales fuertes a alta temperatura (110°), enzimas proteolíticas (o proteasas) y catalizadores como el bromuro de cianógeno que rompe específicamente el enlace peptídico por el lado del ácido carboxílico de los residuos de metionina en péptidos.

La elección de este tipo de enlace reside en su mayor estabilidad, en comparación con los ésteres, en disoluciones acuosas básicas. Este hecho es importante dado que para asegurar la ionización de los grupos carboxílicos de la molécula el valor del pH ha de ser superior a 10. Pero esto no evita la posibilidad de la hidrólisis del enlace péptido en condiciones en las que cabría esperar una mayor estabilidad. Así, como se verá más adelante, al trabajar con disoluciones a $\text{pH} > 13$ este tipo de unión ya no es estable. Por otro lado, en condiciones menos drásticas, al intentar cristalizar uno de los dímeros obtenidos, el calentamiento a reflujo en metanol puede hidrolizar del mismo modo la molécula. Como resultado se obtuvieron cristales, resueltos por difracción de rayos X, de monoderivados, aun cuando se estaban buscando dímeros de ácidos biliares.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) *Supramolecular Chemistry*; Lehn, J.-M., Ed.; VCH: Weinheim, 1995.
- (2) Vázquez Tato, J. *Rev. Iberoam. Polim.* **2005**, *6*, 44.

- (3) Bergmann, M. *Angew, Chem.* **1925**, 38, 1141.
- (4) Lehn, J.-M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4763.
- (5) Ciferri, A. e. *Supramolecular Polymers, 2nd edition* **2005**, Taylor-Francis, New York.
- (6) Hofmann, A. F. *News Physiol. Sci.* **1999**, 14, 24.
- (7) Carey, M. C. *Sterols and bile Acids.* H. Danielsson, J. Sjövall. Elsevier Sci. Publ. **1985**, 5.
- (8) Monte, M. J.; Garcia Marin, J. J.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *World J. Gastroenterol.* **2009**, 15, 804.
- (9) Berlati, F.; Ceschel, G.; Clerici, C.; Pellicciari, R.; Roda, A.; Ronchi, C. *Patente* **1994**, WO 9400126.
- (10) Marples, B. A.; Stretton, R. J. *Patente* **1990**, WO 9013298
- (11) Berlati, F.; Ceschel, G.; Roda, A.; Roda, E.; Ronchi, C. *Patente* **1994**, WO9400155.
- (12) *The Bile Acids. Chemistry, Physiology, and Metabolism. Volume I: Chemistry.*; Nair, V., Ed.; Plenum Press: New York, 1971.
- (13) Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10186.
- (14) Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 9.
- (15) Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Jacobs, M. A.; Aminabhavi, T. M.; Mukunoki, Y. *Colloid Polym Sci* **1983**, 261, 781.
- (16) Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Kwok, D. I. *Langmuir* **1986**, 2, 256.
- (17) Ekwall, P. *Acta Acad. Aboensis Mathematica Physica* **1951**, 17, 1.
- (18) Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, 3, 323.
- (19) Carey, M. C. *Bile Acids in Gastroenterology.* L. Barbara, R. H. Dowling, A. F. Hofmann, E. Roda. Lancaster. MTP Press Limited **1983**, 19.
- (20) Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Nunez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, 18, 987.
- (21) Sugihara, G.; Yamakawa, K.; Murata, Y.; Tanaka, M. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 2784.
- (22) Nagarajan, R. *Langmuir* **1994**, 10, 2028.
- (23) Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, 84, 31.
- (24) Kawamura, H.; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 3321.
- (25) Vethamuthu, M. S.; Almgren, M.; Mukhtar, E.; Bahadur, P. *Langmuir* **1992**, 8, 2396.
- (26) Lianos, P.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 84, 100.
- (27) Bales, B. L.; Shahin, A.; Lindblad, C.; Almgren, M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 256.
- (28) Campanelli, A. R.; Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Viorel Pavel, N.; Quagliata, C. *J. Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **1989**, 7, 391.
- (29) Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 356.
- (30) Fini, A. F.; Giorgio; Roda, Aldo *Polyhedron* **2002**, 21, 1421.
- (31) Leonard, M. R.; Bogle, M. A.; Carey, M. C.; Donovan, J. M. *Biochemistry* **2000**, 39, 16064.
- (32) Ju, C.; Bohne, C. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 3847.
- (33) Cobblestick, R. E.; Einstein, F. W. B. *Acta Cryst.* **1980**, B36, 287.
- (34) Campanelli, A. R.; De Sanctis, S. C.; Giglio, E.; Scaramuzza, L. *J Lipid Res.* **1987**, 28, 483.
- (35) D'Alagni, M.; D'Archivio, A. A.; Giglio, E.; Scaramuzza, L. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 343.
- (36) Hogan, A.; Ealick, S. E.; Bugg, C. E.; Barnes, S. *J. Lipid Res.* **1984**, 25, 791.

- (37) D'Archivio, A. A.; Galantini, L.; Gavuzzo, E.; Giglio, E.; Mazza, F. *Langmuir* **1997**, *13*, 3090.
- (38) Coiro, V. M.; Giglio, E.; Morosetti, S.; Palleschi, A. *Acta Cryst.* **1980**, *B36*, 1478.
- (39) Aburaya, K.; Nakano, K.; Sada, K.; Yoswathananont, N.; Shigesato, M.; Hisaki, I.; Tohnai, N.; Miyata, M. *Crystal Growth Des.* **2008**, *8*, 1013.
- (40) Hrbasova, M.; Vondruskova, R.; Spundova, M.; Marecek, Z.; Entlicher, G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 609.
- (41) Meyerhoffer, S. M.; McGown, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2146.
- (42) Criado, J. J.; Manzano, J. L.; Rodriguez-Fernandez, E. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 311.
- (43) Campazzi, E.; Cattabriga, M.; Marvelli, L.; Marchi, A.; Rossi, R.; Pieragnoli, M. R.; Fogagnolo, M. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *286*, 46.
- (44) Feroci, G.; Fini, A.; Fazio, G.; Zuman, P. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *178*, 339.
- (45) Feroci, G.; Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Zuman, P. *Microchem. J.* **1997**, *55*, 382.
- (46) Feroci, G.; Fini, A.; Fazio, G.; Zuman, P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4077.
- (47) Fini, A.; Feroci, G.; Fazio, G.; Zuman, P. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 251.
- (48) Chakrabarty, A.; Maitra, U.; Das, A. D. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 18268.
- (49) Sun, Y.; Yang, Z.-L.; Zhang, L.; Zhou, N.-F.; Weng, S.-F.; Wu, J.-G. *J. Mol. Struct.* **2003**, *655*, 321.
- (50) D'Alagni, M.; D'Archivio, A. A.; Galantini, L.; Giglio, E. *Langmuir* **1997**, *13*, 5811.
- (51) Zhang, J.; Luo, J.; Zhu, X. X.; Junk, M. J. N.; Hinderberger, D. *Langmuir* **2010**, *26*, 2958.
- (52) Zhang, J.; Junk, M. J. N.; Luo, J.; Hinderberger, D.; Zhu, X. X. *Langmuir* **2010**, *26*, 13415.
- (53) Hofmann, A. F. *Arch. Internal Med.* **1999**, *159*, 2647.
- (54) Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Macromol. Symp.* **2006**, *241*, 60.
- (55) Savage, P. B.; Li, C.; Taotafa, U.; Ding, B.; Guan, Q. *FEMS microbiology letters* **2002**, *217*, 1.
- (56) Savage, P. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 759.
- (57) Savage, P. B. *Current Med. Chem.-Anti-Infective Agents* **2002**, *1*, 293.
- (58) Bandyopadhyaya, A. K.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8239.
- (59) Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* **2006**.
- (60) Soto, V. H.; Jover, A.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J.; Galantini, L.; Pavel, N. V. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1752.
- (61) Nath, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3239.
- (62) Davis, A. P.; Joos, J.-B. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 143/.
- (63) Ghosh, S.; Choudhury, A. R.; Guru, R. T. N.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1441.
- (64) Yoshii, M.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2619.
- (65) Enhsen, A.; Kramer, W.; Wess, G. *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 409.
- (66) Ropponen, J.; Tamminen, J.; Lahtinen, M.; Linnanto, J.; Rissanen, K.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 73.
- (67) Zhao, Y. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 92.
- (68) del Amo, V.; Siracusa, L.; Markidis, T.; Baragana, B.; Bhattarai, K. M.; Galobardes, M.; Naredo, G.; Perez-Payan, M. N.; Davis, A. P. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3320.
- (69) Davis, A. P. *Molecules* **2007**, *12*, 2106.

- (70) Antelo, A.; Alvarez Alcalde, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Vázquez Tato, J. *12th ECSOC November 1-30* **2008**.
- (71) Álvarez, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2009**, *25*, 9037.
- (72) Nonappa; Maitra, U. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 657.
- (73) Bellini, A. M.; Mencini, E.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Fini, A. *Arch. Pharm.* **1990**, *323*, 201.
- (74) Willemen, H. M.; de Smet, L. C. P. M.; Koudijs, A.; Stuart, M. C. A.; Heikamp-de Jong, I. G. A. M.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4275.
- (75) Bhat, S.; Leikin-Gobbi, D.; Konikoff, F. M.; Maitra, U. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1489.
- (76) Betebenner, D. A.; Carney, P. L.; Zimmer, A. M.; Kazikiewicz, J. M.; Brucher, E.; Sherry, A. D.; Johnson, D. K. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 117.
- (77) Cappelletti, E.; Lattuada, L.; Linder, K. E.; Marinelli, E.; Nanjappan, P.; Raju, N.; Ramalingam, K.; Swenson, R. E.; Tweedle, M. *U.S. Pat. Appl. Publ.* **2004**, *PCT/US03/41328. CODEN: USXXCO US 2004253225 A1*, 184 pp.
- (78) Bellini, A. M.; Mencini, E.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Fini, A. *Steroids* **1991**, *56*, 395.
- (79) Broderick, S.; Davis, A. P.; Williams, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6083.
- (80) Herraéz, E.; Macias, R.; Vázquez-Tato, J.; Hierro, C.; Blázquez, A. G.; Martínez-Becerra, P.; Jiménez, F.; González-San Martín, F.; Marin, J. J. G. *J. Hepatology* **2007**, *46*, Supplement S1, S121.
- (81) Herraéz, E.; Macias, R. I. R.; Vázquez-Tato, J.; Vicens, M.; Monte, M. J.; Marin, J. J. G. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2009**, *239*, 13.
- (82) Herraéz, E.; Macias, R. R.; Vázquez Tato, J.; Vicens, M.; Monte, M. J.; Marin, J. J. G. *Toxicology Appl. Pharm.* **2009**, *239*, 21.
- (83) Willemen, H. M.; Marcelis, A. T. M.; Sudhoelter, E. J. R. *Langmuir* **2003**, *19*, 2588.
- (84) Bhattacharya, S.; Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Srivastava, A. *Molecular Gels. Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks. G. Weiss and P. Terech (eds.)*, **2006**, Chapter 17. Springer, 613.
- (85) Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 821.
- (86) McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 809.
- (87) Li, Y.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 283.
- (88) Wess, G.; Kramer, W.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Baringhaus, K.-H.; Boeger, G.; Urmann, M.; Bock, K.; Kleine, H.; Neckermann, G.; Hoffmann, A.; Pittius, C.; Falk, E.; Fehlhaber, H.-W.; Kogler, H.; Friedrich, M. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 873.
- (89) Alvarez, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 6060.
- (90) Wess, G.; Enhsen, A.; Glombik, H.; Kramer, W. **1994**, EP 624593 A2 19941117.
- (91) Bertolasi, V.; Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Perrone, D. *Steroids* **2007**, *72*, 756.
- (92) Ropponen, J.; Tamminen, J.; Lahtinen, M.; Linnanto, J.; Rissanen, K.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 73.
- (93) Vijayalakshmi, N.; Maitra, U. *Macromolecules* **2006**, *39*, 7931.
- (94) Vijayalakshmi, N.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 768.
- (95) Vijayalakshmi, N.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2727.

- (96) 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.
- (97) Ronsin, G. K.; Anthony J.; Rittenhouse, Stephen; Woodnutt, Gary; Camilleri, Patrick. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 13026.
- (98) Wilson, C. P.; Webb, S. J. *Chem. Commun.* **2008**, 4007.
- (99) Yoshino, N.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 457.
- (100) Kobuke, Y.; Nagatani, T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5094.
- (101) Goto, C.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12152.
- (102) De Riccardis, F.; Di Filippo, M.; Garrisi, D.; Izzo, I.; Mancin, F.; Pasquato, L.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun.* **2002**, 3066.
- (103) Avallone, E.; Izzo, I.; Vuolo, G.; Costabile, M.; Garrisi, D.; Pasquato, L.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; De Riccardis, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6121.
- (104) Avallone, E.; Cressina, E.; Fregonese, M.; Tecilla, P.; Izzo, I.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10689.
- (105) McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J.-B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087.
- (106) Izzo, I.; Maulucci, N.; Martone, C.; Casapullo, A.; Fanfoni, L.; Tecilla, P.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5385.
- (107) Nakia, M.; Francesco, D. R.; Barbara, B. C.; Agostino, C.; Elena, C.; Massimo, F.; Paolo, T.; Irene, I. *Chem. Commun.* **2005**, 1354.
- (108) Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 335.
- (109) Otto, S.; Janout, V.; DiGiorgio, A. F.; Young, M. C.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1200.
- (110) Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1573.
- (111) Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 640.
- (112) Jing, B.; Janout, V.; Regen, S. L. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1191.
- (113) Janout, V.; Jing, B.; Staina, I. V.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4436.
- (114) Janout, V.; Zhang, L.-h.; Staina, I. V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5401.
- (115) Janout, V. J.; Bingwen; Regen, Steven L. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 351.
- (116) Jing, B.; Janout, V.; Herold, B. C.; Klotman, M. E.; Heald, T.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15930.
- (117) Ryu, E.-H.; Zhao, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9491.
- (118) Ryu, E.-H.; Zhao, Y. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3187.
- (119) Ryu, E.-H.; Yan, J.; Zhong, Z.; Zhao, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7205.
- (120) Zhou, Y.; Ryu, E.-H.; Zhao, Y.; Woo, L. K. *Organometallics* **2007**, *26*, 358.
- (121) Kolehmainen, E.; Koivukorpi, J.; Sievaenen, E.; Kral, V. *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 437.
- (122) Koivukorpi, J. S.; Elina; Kolehmainen, Erkki; Kral, Vladimir. *Molecules* **2007**, *12*, 13.
- (123) Kralova, J.; Koivukorpi, J.; Kejik, Z.; Pouckova, P.; Sievaenen, E.; Kolehmainen, E.; Kral, V. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1548.
- (124) Xiao, W.; Zhang, B.; Cong, Y. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 938.
- (125) Ariga, K.; Nakanishi, T.; Terasaka, Y.; Tsuji, H.; Sakai, D.; Kikuchi, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 976.
- (126) Zhao, Y.; Zhong, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17894.

- (127) Zhong, Z.; Zhao, Y. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5498.
- (128) Zhao, Y.; Zhong, Z. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4715.
- (129) Zhao, Y.; Zhong, Z.; Ryu, E.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 218.
- (130) Gouin, S.; Zhu, X. X.; Lehnert, S. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5379.
- (131) Zhu, X.-X.; Nichifor, M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 539.
- (132) Lee, K. Y.; Jo, W. H.; Kwon, I. C.; Kim, Y.-H.; Jeong, S. Y. *Macromolecules* **1998**, *31*, 378.
- (133) Lee, K. Y.; Kwon, I. C.; Kim, Y.-H.; Jo, W. H.; Jeong, S. Y. *J. Controlled Release* **1998**, *51*, 213.
- (134) Kim, J.-B.; Lee, B.-W.; Kang, J.-S.; Seo, D.-C.; Roh, C.-H. *Polymer* **1999**, *40*, 7423.
- (135) Li, H.; Wang, L.-X. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3507.
- (136) Kikuchi, J.-I.; Ariga, K.; Murakami, Y. *J. Supramol. Chem.* **2003**, *1*, 275.
- (137) Kikuchi, J.-I.; Murakami, Y. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *32*, 209.
- (138) Chen, W.-H.; Shao, X.-B.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12727.
- (139) Zhang, J.; Jing, B.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13984.
- (140) Chen, W.-H.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6538.
- (141) Mehiri, M. J.; Bingwen; Ringhoff, Danielle; Janout, Vaclav; Cassimeris, Lynne; Regen, Steven L. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1510.
- (142) Bhattarai, K. M.; Davis, A. P.; Perry, J. J.; Walter, C. J.; Menzer, S.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8463.
- (143) Virtanen, E.; Koivukorpi, J.; Tamminen, J.; Manttari, P.; Kolehmainen, E. *J. Organometallic Chem.* **2003**, *668*, 43.
- (144) Chattopadhyay, P.; Pandey, P. S. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8620.
- (145) Chattopadhyay, P.; Pandey, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1553.
- (146) Valkonen, A.; Sievaenen, E.; Ikonen, S.; Lukashev, N. V.; Donez, P. A.; Averin, A. D.; Lahtinen, M.; Kolehmainen, E. *J. Mol. Struct.* **2007**, *846*, 65.
- (147) Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M. *Tetrahedron Lett* **1992**, *33*, 2071.
- (148) Tamminen, J.; Kolehmainen, E. *Molecules* **2001**, *6*, 21.
- (149) Virtanen, E.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *16*, 3385.
- (150) Chattopadhyay, P.; Pandey, P. S. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 4640.
- (151) Karabulut, H. R. F.; Rashdan, S. A.; Dias, J. R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5030.
- (152) Rivera, D. G.; Wessjohann, L. A. *Molecules* **2007**, *12*, 1890.
- (153) Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 259.
- (154) Mackay, L.; Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1377.
- (155) Sisson, A. L.; Clare, J. P.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 5263.
- (156) García Rubio, I. *Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza* **2002**.
- (157) García Ortega, H. **2003**.
- (158) Hodgson, M. J. **2005**.
- (159) Gouterman, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139.
- (160) Gouterman, M. *J. Mol. Spectr.* **1961**, *6*, 138.
- (161) Koti, A. S. R.; Periasamy, N. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 369.
- (162) Egharevba, G. O.; George, R. C.; Maaza, M. *Synthesis Reactivity Inorg. Metal-Org. Nano-Metal Chem.* **2008**, *38*, 681.

- (163) Micali, N.; Romeo, A.; Lauceri, R.; Purrello, R.; Mallamace, F.; Scolaro, L. M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9416.
- (164) Li, X. Z.; Line, Mu, Jin; Qiu, Jinlong *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3*, 169.
- (165) Maiti, N. C.; Ravikanth, M.; Mazumdar, S.; Periasamy, N.; pp *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17192.
- (166) Fuhrhop, J. H.; Demoulin, C.; Boettcher, C.; Koenig, J.; Siggel, U. *114* **1992**, 4159.
- (167) Kano, K.; Fukuda, K.; Wakami, H.; Nishiyabu, R.; Pasternack, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7494.
- (168) Koti, A. S. R.; Taneja, J.; Periasamy, N. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *375*, 171.
- (169) Koti, A. S. R.; Periasamy, N. *J. Mat. Chem.* **2002**, *12*, 2312.
- (170) Zimmermann, J.; Siggel, U.; Fuhrhop, J.-H.; Roeder, B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6019.
- (171) Ohno, O.; Kaizu, Y.; Kobayashi, H. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 4128.
- (172) Collini, E.; Ferrante, C.; Bozio, R.; Lodi, A.; Ponterini, G. *J. Mat. Chem.* **2006**, *16*, 1573.
- (173) Franco, R.; Jacobsen, J. L.; Wang, H.; Wang, Z.; Istvan, K.; Schore, N. E.; Song, Y.; Medforth, C. J.; Shelnut, J. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4072.
- (174) Khairutdinov, R. F.; Serpone, N. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 761.
- (175) Kubat, P.; Lang, K.; Prochazkova, K.; Anzenbacher, P., Jr. *Langmuir* **2003**, *19*, 422.
- (176) Komatsu, T.; Yanagimoto, T.; Furubayashi, Y.; Wu, J.; Tsuchida, E. *Langmuir* **1999**, *15*, 4427.
- (177) Okada, S.; Segawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2792.
- (178) Carvalho, I. M. M.; Ogawa, M. Y. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1390.
- (179) Oyaizu, K.; Hoshino, M.; Ishikawa, M.; Imai, T.; Yuasa, M. *J. Polym. Sci, A* **2006**, *44*, 5403.
- (180) Anderson, H. L. *Chem. Commun.* **1999**, 2323.
- (181) Anderson, H. L. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 972.
- (182) Thorne, J. R. G.; Kuebler, S. M.; Denning, R. G.; Blake, I. M.; Taylor, P. N.; Anderson, H. L. *Chem. Phys.* **1999**, *248*, 181.
- (183) Huang, X.; Shi, Q.; Chen, W.-Q.; Zhu, C.; Zhou, W.; Zhao, Z.; Duan, X.-M.; Zhan, X. *Macromolecules* **2010**, *43*, 9620.
- (184) Scolaro, L. M.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Patane, S.; Cefali, E.; Allegrini, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2453.
- (185) Inamura, I.; Isshiki, M.; Araki, T. *Bull. Chem Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 2413.
- (186) Inamura, I.; Uchida, K. *Bull. Chem Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 2005.
- (187) Fuhrhop, J. H.; Bindig, U.; Siggel, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11036.
- (188) Akins, D. L.; Zhu, H.-R.; Guo, C. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5420.
- (189) Choi, M. Y.; Pollard, J. A.; Webb, M. A.; McHale, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 810.
- (190) Doan, S. C.; Shanmugham, S.; Aston, D. E.; McHale, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5885.
- (191) Udaltsov, A. V.; Tosaka, M.; Kaupp, G. *J. Mol. Struct.* **2003**, *660*, 15.
- (192) Udaltsov, A. V.; Kazarin, L. A.; Sinani, V. A.; Sweshnikov, A. A. *J. Photochem. Photobiol. A* **2002**, *151*, 105.
- (193) Buchler, J. W. *The Porphyrins, ed. D. Dolphin* **1978**, *1*, 389.
- (194) Buchler, J. W. *Porphyrins and Metalloporphyrins, ed. K. M. Smith* **1975**, 157.
- (195) Senge, M. O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1923.

- (196) Arnold, D. P.; Hartnell, R. D.; Heath, G. A.; Newby, L.; Webster, R. D. *Chem. Commun.* **2002**, 754.
- (197) Tsuda, A.; Osuka, A. *Science* **2001**, 293, 79.
- (198) Hodgson, M. J.; Borovkov, V. V.; Inoue, Y.; Arnold, D. P. *J. Org. Chem.* **2006**, 691.
- (199) Arnold, D. P.; Worthington, E. I.; Sakata, Y.; Sugiura, K.-i. *Chem. Commun.* **1998**, 2331.
- (200) Koczaja Dailey, K.; Yap, G. P. A.; Rheingold, A. L.; Rauchfuss, T. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 16.
- (201) Dailey, K. K.; Rauchfuss, T. B. *Polyhedron* **1997**, 16, 3129.
- (202) Franco, C.; McLendon, G. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 2370.
- (203) Richeter, S.; Jeandon, C.; Ruppert, R.; Callot, H. J. *Chem. Commun.* **2002**, 266.
- (204) Lange, S. J.; Nie, H.; Stern, C. L.; Barrett, A. G. M.; Hoffman, B. M. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 6435.
- (205) Ferri, A.; Polzonetti, G.; Licoccia, S.; Paolesse, R.; Favretto, D.; Traldi, P.; Russo, M. V. *J. Chem. Soc. Dalton Trans* **1998**, 4063.
- (206) Gogan, N. J.; Siddiqui, Z. U. *Can. J. Chem.* **1972**, 50, 720.
- (207) Burrell, A. K.; Campbell, W. M.; Jameson, G. B.; Officer, D. L.; Boyd, P. D. W.; Zhao, Z.; Cocks, P. A.; Gordon, K. C. *Chem. Commun.* **1999**, 637.
- (208) Minnetian, O. M.; Morris, I. K.; Snow, K. M.; Smith, K. M. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5567.
- (209) Morris, I. K.; Snow, K. M.; Smith, N. W.; Smith, K. M. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1231.
- (210) Wallimann, P.; Marti, T.; Furer, A.; Diederich, F. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1567.
- (211) Groves, J. T.; Neumann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2900.
- (212) Tsuchida, E.; Komatsu, T.; Babe, T.; Nakata, T.; Nishide, H.; Inoue, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1990**, 63, 2323.
- (213) Fong, R., II; Schuster, David I.; Wilson, Stephen R. *Org. Lett.* **1999**, 1, 729.
- (214) Schuster, D. I. *Carbon* **2000**, 38, 1607.
- (215) MacMahon, S.; Fong, R. I.; Baran, P. S.; Safonov, I.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5449.
- (216) Girgenti, E.; Ricoux, R.; Mahy, J.-P. *Tetrahedron* **2004**, 60, 10049.
- (217) Bonar-Law, R. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12397.
- (218) Bonar-Law, R. P.; Sanders, J. K. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 3085.
- (219) Bonar-Law, R. P.; Davis, A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1050.
- (220) Bonar-Law, R. P.; Mackay, L. G.; Walter, C. J.; Marvaud, V.; Sanders, J. K. M. *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 803.
- (221) Dukh, M.; Saman, D.; Lang, K.; Pouzar, V.; Cerny, I.; Drasar, P.; Kral, V. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3458.

2 ANÁLISIS DE CRISTALES DE ÁCIDOS BILIARES Y DERIVADOS.

2.1 INTRODUCCIÓN.

La resolución de la estructura cristalina de los ácidos biliares mediante difracción de rayos X ha venido siendo objeto de numerosos estudios debido a que:

- Las estructuras cristalinas que originan estos compuestos son muy diversas.
- Forman complejos de inclusión con numerosos huéspedes.
- Permiten la separación de mezclas racémicas.
- Se han utilizado para la realización de reacciones de polimerización.
- Permiten proponer estructuras para los agregados que estos compuestos forman en disolución.

Dado que el volumen de trabajos publicado al respecto para ácidos biliares naturales y sus derivados es extenso, se hará un repaso sobre las peculiaridades del ácido cólico, desoxicólico y 3β -amino cólico, ya que son el núcleo fundamental de la estructura molecular de los productos que se presentarán a continuación. En la bibliografía se incluyen los trabajos más relevantes que muestran el *modus operandi* cuando se trabaja con estos compuestos. Entre los factores cruciales a tener en cuenta cabe citar los siguientes: la influencia del número y orientación de los grupos hidroxilo existentes en el cuerpo del esteroide, la formación de complejos de inclusión con el disolvente u otros compuestos, la longitud y conformación de la cadena lateral y la formación de enlaces de hidrógeno. Además de los parámetros estructurales como los datos geométricos, estas variables caracterizan, y hacen única, cada estructura. Por todas estas razones, en este capítulo se incluirán dos cristales resueltos de derivados de ácidos biliares (mono-sustituídos) obtenidos de forma casual pero que no dejan de ser singulares en sus características.

Se ha de tener en cuenta que la estructura oligómera que poseen las moléculas sintetizadas hace, en el caso de los dímeros, duplicar al menos el número de variables. Cada brazo "biliar" de la molécula se comporta de forma independiente por lo que la cristalización de estos compuestos aumenta en complejidad. Como resultados de este tipo de estructuras, primero se presentan dos dímeros sintetizados con anterioridad al desarrollo del presente trabajo por este mismo grupo de investigación para dar paso a otras dos nuevas estructuras, ya englobadas dentro de la presente Tesis doctoral. Dado que la disposición espacial del conjunto de la molécula resulta tener unas características especiales, se expondrá un sistema de coordenadas que facilita la descripción de este tipo de estructuras.

En la última sección de este capítulo, se abordará el cálculo del área de la sección molecular para todas las moléculas englobadas en este trabajo, método que se nutre de los datos cristalográficos conseguidos.

2.1.1 Antecedentes bibliográficos.

Desde finales del siglo XIX, la comunidad científica se interesó en las sustancias constituyentes de la bilis y así comenzaron a aparecer los primeros trabajos sobre ácidos biliares naturales.¹ Se puso de manifiesto la complejidad de los cristales de los ácidos biliares por cuanto que los mismos eran verdaderamente complejos de inclusión (en la terminología aceptada en la actualidad) de diferente estequiometría.²⁻³ No tardó el reconocimiento de huéspedes tan variados como ácidos grasos, alcoholes, ésteres, éteres, fenoles e hidrocarburos saturados y aromáticos, habiendo un acuerdo general acerca de la inclusión del huésped en canales formados en la red cristalina del hospedador.⁴ En el caso del ácido desoxicólico, se aceptaba que dos moléculas del ácido biliar se empaquetaban juntas en una disposición cabeza-cola dejando un hueco cilíndrico donde alojar el huésped.⁵ También aparecieron aplicaciones prácticas de los ácidos biliares en diferentes campos:

- Farmacología.⁶
- Uso como modelos para reacciones fotoquímicas en estado sólido.⁷⁻¹⁰
- Realización de reacciones de polimerización en los canales.¹¹⁻²¹
- Síntesis de un polímero ópticamente activo.²²
- Inclusión selectiva y separación de enantiómeros.²³⁻²⁷
- Transporte de medicamentos.²⁸

Queda patente que un conocimiento detallado de las estructuras cristalinas de los complejos es fundamental para entender esos procesos y para el diseño de huéspedes que provean espacios de inclusión para el reconocimiento molecular y/o la reacción química. El número de cristales resueltos fue en rápido aumento hasta la actualidad.²⁹⁻³⁰ Se han resuelto cristales con familias completas de huéspedes: alcoholes,³¹⁻³⁶ compuestos aromáticos,³⁷⁻⁴⁰ N-nitrosaminas,⁴¹⁻⁴² lactonas,⁴³ nitrilos,⁴⁴ cetonas,⁴⁵⁻⁴⁶ derivados fluorados de la anilina,⁴⁷ derivados del alcohol bencílico,⁴⁸ derivados de la acetofenona,⁴⁹ ésteres alifáticos,⁵⁰ ... Con el fin de estudiar la influencia en la cadena lateral se ha resuelto la estructura de los cristales de los ácidos bisnorcólico, norcólico, cólico, homocólico y bishomocólico,⁵¹ que se diferencian entre sí por el número de grupos metileno existentes. Los ácidos biliares o sus complejos de inclusión con diversos huéspedes cristalizan mayoritariamente en los grupos monoclinicos y ortorrómbicos, pero también lo hacen en los triclinicos y hexagonal.

2.1.2 Ácido desoxicólico.

Desde un principio, el ácido desoxicólico despertó la curiosidad y se ha convertido en el más común y estudiado de los ácidos biliares dihidroxílicos.⁵² Esto se debe a varias peculiaridades:

- No se han conseguido cristales de este ácido biliar libres de huésped.³⁰
- Se han encontrado cuatro sistemas de cristalización monoclinico, tetragonal, hexagonal y ortorrómbico, siendo el último claramente mayoritario. Los cristales hexagonales o tetragonales se consiguen incorporando agua como un segundo huésped,⁵³⁻⁵⁵ los monoclinicos se dan con *o*- y *p*-xileno⁵⁶⁻⁵⁷ y con *o*- y *m*-nitrosotolueno.³⁶ Los cristales ortorrómbicos vienen a representar aproximadamente el 84% de los huéspedes estudiados (de ellos el 84% son P2₁2₁2₁ y el 16% son P2₁2₁2).

- La estequiometría ácido: huésped más frecuente es la 2:1.⁵⁸⁻⁶⁰

Desde un principio se puso de manifiesto la formación de canales y de redes de enlaces de hidrógeno en forma de espiral,⁶¹ y se estudió la relación de los ángulos de torsión de la cadena lateral y las diferencias existentes entre las redes de los enlaces de hidrógeno,^{58,60,62} intentando racionalizar las razones por las que el ácido desoxicólico cristaliza en diferentes sistemas cristalinos, dependiendo del tipo de molécula huésped.⁶³ La formación de tales complejos de inclusión fue explotada químicamente para la oxidación selectiva de determinadas posiciones del núcleo esteroide.^{54,64-67}

Cuando el ácido desoxicólico cristaliza en presencia de etanol y agua puede hacerlo en el sistema hexagonal P6₅, dejando canales hidrófilos donde se alojan los huéspedes.⁵³ Lo mismo ocurre con la mezcla dimetil sulfóxido:agua.⁶⁸ Sin embargo, es necesario destacar que estos sistemas pueden adoptar otras simetrías como la tetragonal P4₁2₁2 en la que no se forman canales y las moléculas de ácido desoxicólico están unidas cabeza-cola por medio de los enlaces de hidrógeno entre O3 y O24b (Figura 2.1).⁵⁵

Se pone de manifiesto que los huéspedes se acomodan en canales hidrófobos en los cristales ortorrómbicos y en canales hidrófilos en los tetragonales o hexagonales. Candeloro de Sanctis y Giglio⁶⁹ llevaron a cabo un estudio del empaquetamiento ortorrómbico mediante cálculos de energía de van der Waals permitiendo desplazar las bicapas a lo largo de *b* para diferentes valores de *a*. Todos los complejos estudiados tienen las longitudes *a* y *b* iguales, mientras que *c* se varía en múltiplos de aproximadamente 7.2 Å. Los cálculos ponen de manifiesto la presencia de filas intermedias de moléculas que no se reproducen por una traslación exacta, dando lugar a la distinción de dos estructuras de los complejos denominadas α y β . El paso de una clase a la otra va acompañado de un mayor tamaño de los canales en el plano *ab* permitiendo alojar huéspedes más voluminosos. Por otro lado, el cristal del ácido desoxicólico:norbornadieno (ortorrómbico P2₁2₁2₁; estequiometría 2:1) puede ser descrito como un ensamblaje de bicapas a lo largo del plano *bc* donde las moléculas de ácido desoxicólico están unidas en disposición cabeza-cola.⁷⁰

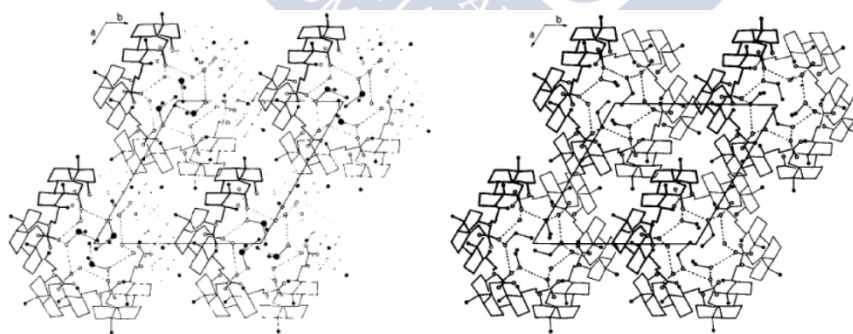


Figura 2.1. Ejemplos de empaquetamiento de los cristales formados por el ácido desoxicólico en dimetilsulfóxido:agua (hexagonal P6₅, izquierda)⁶⁸ y en etanol:agua (ortorrómbico P212121, derecha).⁵³

En 1981 Giglio⁷¹ analizó los cristales de los ácidos coleicos desde el punto de vista estructural y energético, independientemente de su empaquetamiento (hexagonal, tetragonal u ortorrómbico). Las conclusiones más importantes que se derivan de su trabajo son las siguientes:

- (i) La energía de van der Waals de la cadena lateral depende de su conformación, la cual se define mediante cuatro ángulos de torsión $\psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$, $\psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$, $\psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$, y $\psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O}$. El mapa de energía presenta cinco mínimos,⁶³ de los que tres corresponden a orientaciones del grupo carboxilo que no permiten un buen esquema de enlaces de hidrógeno, por lo

que no han sido observadas experimentalmente. Los otros dos mínimos corresponden a orientaciones denominadas *trans* y *cis*, que sí aparecen en los ácidos coleicos investigados y se caracterizan por los siguientes valores para los ángulos de torsión:

- *trans* (observada en cristales hexagonales): $\psi_1 \sim -60^\circ$, $\psi_2 \sim 190^\circ$, $\psi_3 \sim 180^\circ$;
- *cis* (observada en cristales tetragonales y ortorrómbicos): $\psi_1 \sim -60^\circ$, $\psi_2 \sim 60^\circ$, $\psi_3 \sim 180^\circ$.

- (ii) Los cristales hexagonales se caracterizan por hélices de moléculas de hospedador, generadas por el eje 6_5 , unidas por enlaces de hidrógeno. Los huéspedes polares rellenan los canales helicoidales extendidos a lo largo del eje c y participan en el esquema de enlaces de hidrógeno. La cavidad posee una forma aproximadamente circular con un diámetro de $\sim 4 \text{ \AA}$, sólo accesible a moléculas pequeñas.
- (iii) Los cristales tetragonales se caracterizan por la asociación de bicapas onduladas que se extienden por el plano ab , relacionadas unas con otras por el eje 4_1 , que no dejan espacios entre ellas. Cada bicapa se compone de la asociación de dos monocapas a través de un efectivo esquema de enlaces de hidrógeno, donde destaca la unión de moléculas de ácido desoxicólico en orientación cabeza-cola por los enlaces de hidrógeno entre el O3 y el O27 de dos moléculas consecutivas. Las moléculas de huésped se alojan en canales que discurren por el interior de las bicapas y que poseen una pequeña sección de forma casi-rectangular.
- (iv) Los cristales ortorrómbicos presentan también estructuras en bicapas pero las moléculas de huésped no participan en el esquema de enlaces de hidrógeno. Dos bicapas adyacentes antiparalelas, relacionadas por un eje 2_1 , originan canales a lo largo de c con superficies hidrófobas. Dentro de los cristales se han reconocido dos grupos, denominados α y β , caracterizados por una traslación de las moléculas de ácido desoxicólico a lo largo de c de unos 7.2 y 14.2 \AA , respectivamente. Los cristales α surgen cuando los huéspedes son planos o filiformes, mientras que cuando son aproximadamente esféricos originan cristales β . En ambos grupos, los cálculos de la energía de van der Waals muestran la existencia de tres mínimos denominados A, B y C. En el grupo α , el mínimo C corresponde a un empaquetamiento sin canales nunca observado, mientras que el mínimo A (que es el más profundo) aparece cuando los huéspedes son pequeños o filiformes, y el mínimo B lo hace con huéspedes planos (lo que requiere que a sea superior a 26 \AA). En el grupo β , el mínimo más profundo es el B y aparece con huéspedes aproximadamente esféricos, requiriendo que a sea superior a 27 \AA . Se concluye, por lo tanto, que el empaquetamiento de las bicapas puede inferirse de forma aproximada de cálculos de energía si las constantes de la celda son conocidas.

En definitiva, los cristales ortorrómbicos de ácido desoxicólico conocidos hasta principios de los años ochenta, poseen estructuras cristalinas, con bicapas de moléculas del ácido empaquetadas de tal forma que, en los canales hidrófobos que dejan libre, pueden alojarse diferentes tipos de moléculas huésped, a saber: (i) moléculas grandes y flexibles como el ácido palmítico; (ii) moléculas planas como el fenantreno o el *p*-diiodobenceno, y (iii) otras moléculas pequeñas como la acetona o la ciclohexanona.⁷² Como ejemplos podemos citar que los cristales de ácido desoxicólico con (+)-canfor,⁷² ciclohexanona, fenantreno,⁵⁸ y di-*tert*-butilacetona⁷³ pertenecen a la clase β , mientras que el cristal con ácido acético⁶¹ pertenece a la α . La localización del huésped en la estructura del cristal constituye el mayor problema en la resolución de la estructura cristalina.⁷⁴

Los cristales del ácido desoxicólico obtenidos en *o*-, *p*- y *m*-xileno poseen estequiometrías 2:1, siendo los dos primeros monoclinicos $P2_1$ y el tercero ortorrómbico $P2_12_12_1$.⁵⁷ Analizando en detalle el cristal con el *o*-xileno (*Figura 2.2*) se observa la presencia de un pseudo-eje binario entre las moléculas hospedadoras que logra que la estructura de la bicapa y sus relaciones espaciales sean muy similares a la de los cristales ortorrómbicos. Existen dos moléculas del ácido biliar que se diferencian en la conformación del anillo D (sobre y media silla), pero las cadenas laterales se encuentran plegadas.

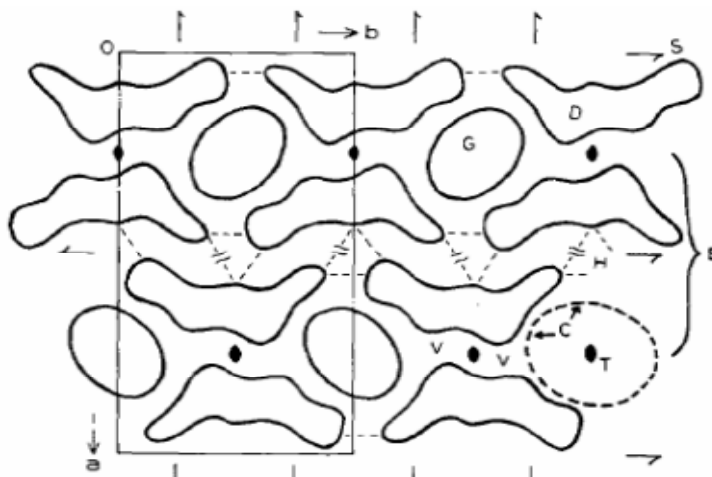


Figura 2.2. Estructura esquemática de los cristales ortorrómbicos generados por el ácido desoxicólico con diversos huéspedes: (B) Bicapa de moléculas de ácido desoxicólico (D); G: huésped; (H) esquema helicoidal de enlaces de hidrógeno uniendo las posiciones hidrófilas del ácido desoxicólico en las bicapas; (V) contactos de van der Waals entre las caras hidrófobas del ácido desoxicólico en las bicapas; (C) canales hidrófobos conteniendo el huésped a lo largo de c; (O) origen de la celda unidad. Tomada de Jones *et al.*⁷²

La conformación del anillo D, intermedia entre sobre y media silla, fue observada por Limmatvapirat *et al.*⁷⁵ al estudiar el cristal ácido desoxicólico:ácido salicílico (ortorrómbico $P2_12_12_1$; estequiometría 1:1), teniendo la cadena lateral una conformación *trans*.

Miyata *et al.*⁷⁶ dan resultados cristalográficos del complejo de inclusión 2:1 entre ácido desoxicólico y anisidina. El cristal es monoclinico $P2_1$. En este interesante artículo analizan las estructuras jerárquicas que se resumen en la *Figura 2.3*. En ella, (b) representa un ensamblaje bimolecular, (c) el ensamblaje en hélice- 2_1 , (d) un ensamblaje de ensamblajes helicoidales y (e) los canales de inclusión. El ensamblaje en hélices se retiene gracias a enlaces de hidrógeno en los que participan hidroxilos de las posiciones 3 y 12, y estos ensamblajes se apilan en la misma dirección (d) originando una disposición en forma de lámina también mediante enlaces de hidrógeno, ahora a través de los grupos carboxilo de la cadena lateral. El apilamiento de las láminas es en dirección opuesta (e). De cara al estudio de la polimerización, llevaron a cabo simulaciones con el monómero 2-metil-*trans*-1,3-pentadieno y el ácido desoxicólico, mostrando que el primero se inclina en el canal donde puede polimerizarse.

2.1.3 Ácido cólico.

El ácido cólico ha podido ser recrystalizado sin formar inclusión alguna.⁷⁷ El cristal es ortorrómbico $P2_12_12_1$ y presenta cuatro enlaces de hidrógeno [$O3 \cdots O12$, $O(\text{carboxílico}) \cdots O7$, $O(\text{carboxílico}) \cdots O12$, y $O3 \cdots O7$] que no permiten la formación de cavidades y que forman una espiral alrededor del eje cristalográfico *b* (*Fig.2.4*).⁷⁸ Este

crystal puede absorber acetofenona y pasa a ser monoclinico, de estructura idéntica a la del obtenido de manera directa.⁷⁹

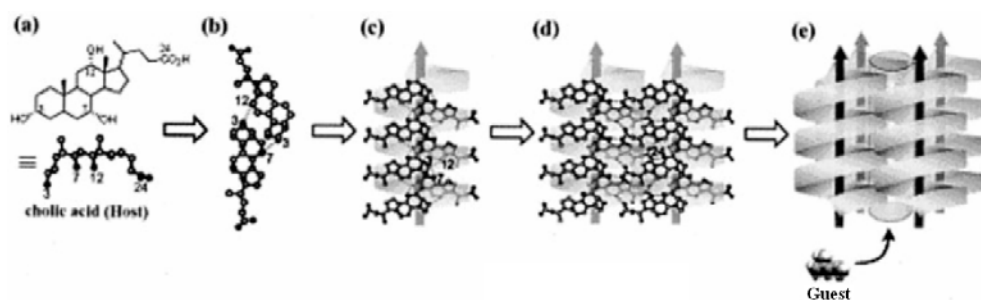


Figura 2.3. Estructuras jerárquicas del cristal del ácido desoxicólico:anisidina.⁷⁶

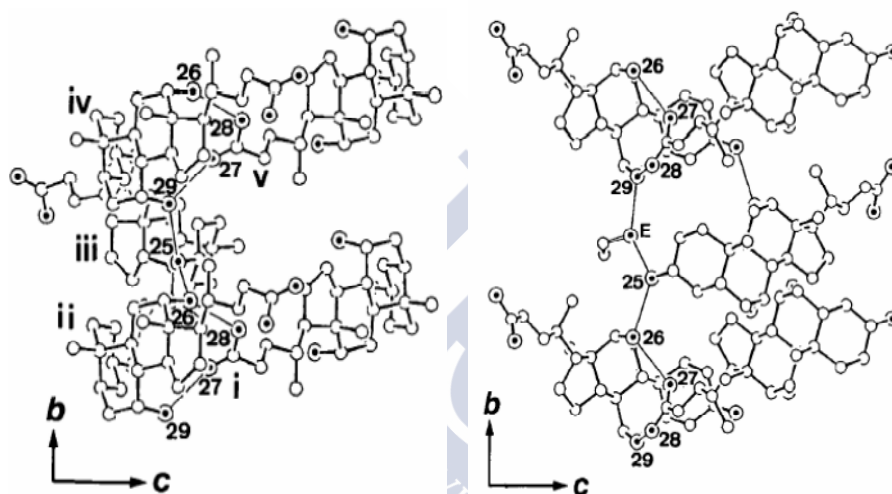


Figura 2.4. Estructura cristalina del ácido cólico sin ningún huésped.⁷⁸

Como el desoxicólico, el ácido cólico puede formar cristales de inclusión, con diversas estequiometrías y una gran variedad de moléculas huésped: alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres, ácidos, ésteres y nitrilos.⁸⁰ Los primeros cristales de ácido cólico con huéspedes (agua y etanol) se deben a Norton y Haner⁸¹ y Johnson y Schaefer (con etanol).³¹ También forma complejos con otros alcoholes como metanol y propanol.³³ El propanol se adapta perfectamente a las cavidades mientras que el metanol puede ocluir un mayor número de moléculas sin participar en la formación de enlaces de hidrógeno, lo que justifica la inestabilidad del cristal. Con butanol no se han obtenido complejos de inclusión y Yoswathananont *et al*³⁵ estudiaron los cristales con 1-pentanol y 1-hexanol (monoclinicos $P2_1$ y con estequiometría 1:1). Las estructuras son en bicapas con el mismo tipo de interdigitación, deduciéndose de los ángulos diedros ψ_2 conformaciones *trans* para el primero y *gauche* para el segundo. Los enlaces de hidrógeno son los mismos y constituyen una red cíclica en la que participan los alcoholes.

El cristal ácido cólico:agua fue objeto de un exhaustivo estudio por parte de Lessinger *et al*.⁸² Es un hemihidrato (2:1) hexagonal $P6_522$ en el que la molécula de agua está desordenada entre dos posiciones no equivalentes. La unidad asimétrica posee dos tipos de moléculas de ácido biliar con geometrías que sólo se diferencian en la posición de la cadena lateral, diferencia suficiente como para que los enlaces de hidrógeno que presentan también lo sean (cola-cola en una y cabeza-cola en la otra) originando una

compleja red de enlaces de hidrógeno. Miyata *et al*⁸³ examinaron el papel de la cadena lateral en cristales de ácido cólico con estructuras ya conocidas.

A diferencia de los cristales de ácido desoxicólico, los de ácido cólico presentan un polimorfismo⁸⁴ que depende del huésped, debido a que éste influye sobre la red de enlaces de hidrógeno. Ejemplos típicos son los que conducen a canales (acetofenona⁷⁹ o la γ -valerolactona^{23-24,84} y, en general, huéspedes grandes) y las que no los presentan (alcoholes^{31,85} o sin huéspedes⁷⁸). Dependiendo del huésped, en los cristales con disposición cola-cola, se pueden dar conformaciones tanto *trans* como *gauche* en la cadena lateral. Con la acetofenona estos autores detallan la constitución de dos *bolsillos* en los canales de inclusión. Uno de ellos está formado por dos cadenas laterales, de forma que los cambios conformacionales en ellas conducen a una modificación de forma y tamaño de los espacios de inclusión accesibles a los huéspedes.

La recristalización con derivados del benceno ha permitido la realización de diversos estudios sistemáticos. Entre los compuestos analizados cabe citar el propio benceno,⁸⁶ anilinas (incluyendo derivados fluorados),^{25,47,87} feniletilaminas,⁴⁷ nitrobenceno²⁵ y *p*-nitrotolueno,⁸⁸ cetonas⁷⁹ y tiobenzofenona,⁸⁹⁻⁹⁰ xilenos y tri- y tetra-metil derivados,⁹¹ alcoholes⁴⁸ y nitrilos.⁸⁸ Los cristales pueden presentar estequiometrías 1:1 (por ejemplo, benceno, tolueno, *m*- y *p*-xileno, 1,2,4- y 1,3,5-trimetilbenceno y 1,2,3,4- y 1,2,3,5-tetrametilbenceno) o bien 2:1 (*o*-xileno, 1,2,3-trimetilbenceno, 1,2,3-triclorobenceno, 1,2-dicloro-3-metilbenceno, 1-cloro-2,6-dimetilbenceno, 1,3-dicloro-2-metilbenceno, 1,2-dibromo-3-metilbenceno y 1-bromo-2,6-dimetilbenceno). Así, el cristal ácido cólico:benceno (monoclínico P2₁)⁸⁶ pertenece al sistema ordenado en bicapas con canales en su parte hidrófoba, estructura isomorfa con la de los cristales de este ácido con γ -valerolactona,²⁴ acetofenona,⁷⁹ nitrobenceno y anilina.²⁵ En la parte hidrófila de la bicapa se establecen cuatro enlaces de hidrógeno [O12^I-H[⋯]O24b^{II}=C-O24a^{II}H[⋯]O7^{III}-H[⋯]O3^{IV}-H[⋯]O12^I] que forman una red cíclica y que conducen a un ordenamiento molecular cabeza-cabeza y cola-cola.

Miyata *et al*⁹¹ demostraron que los ordenamientos moleculares pueden invertirse mediante la introducción de cierta clase de huéspedes. Parten del cristal ácido cólico:*o*-xileno (monoclínico P2₁), siendo el ordenamiento de las moléculas de esteroide cabeza-cola (como en el caso del ácido desoxicólico:*o*-xileno) y no cabeza-cabeza-cola-cola (como en el caso del ácido cólico:benceno). Ello es consecuencia de la red de enlaces de hidrógeno que se establece en cada caso, helicoidal para los cabeza-cola y cíclica para los cabeza-cabeza-cola-cola. La secuencia en el cristal analizado es [O3-H[⋯]O24b=C-O24a-H[⋯]O12-H[⋯]O3-H] y el grupo O7-H está conectado débilmente a la red helicoidal mediante un enlace O7-H[⋯]O24b de 3.23 Å. Además, estos autores señalaron que el ácido desoxicólico no puede formar redes cíclicas por la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 7.

Veamos ahora otros compuestos aromáticos. Nakano *et al*⁹² estudiaron el cristal ácido cólico:*n*-propilbenceno (estequiometría 1:1) que presenta una organización cabeza-cabeza y cola-cola con las cadenas laterales en conformación *trans*, formando una red cíclica de cuatro enlaces de hidrógeno. Al calentar a 90°C, proceso reversible, el cristal pierde parte del huésped y da lugar a otro cristal de estequiometría 2:1, perdiendo el huésped restante a 120°C. El cristal intermedio se caracteriza por un desplazamiento de las bicapas de forma que las cavidades resultan más pequeñas. El fenómeno no es exclusivo de este huésped.

Con *m*-nitrotolueno el ácido cólico forma cristales P2₁ (estequiometría 1:1).⁹³ El empaquetamiento y enlaces de hidrógeno son similares al de cristales del resuelto con anterioridad por estos mismos autores.^{88,94} El ángulo de torsión ψ_2 pone de manifiesto que la cadena lateral se encuentra plegada, dándose la misma secuencia de enlaces de

hidrógeno que comentamos más abajo para las acetofenonas.⁴⁹ Con *o*- y *m*-nitrosotolueno, los cristales son monoclinicos ($P2_1$ de estequiometría 2:1).³⁶ La Figura 2.5 muestra el empaquetamiento de los cristales del ácido cólico con nitrosotoluenos. A efectos comparativos se muestran también los del ácido desoxicólico.³⁶

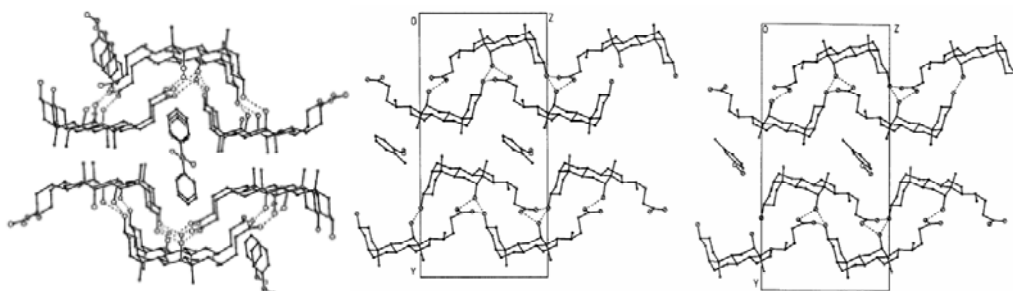


Figura 2.5. Empaquetamientos de los cristales de ácido cólico y desoxicólico con nitrosotoluenos.³⁶

Con la finalidad de comprender la capacidad de reconocimiento molecular del hospedador, Nakano *et al*³⁶ realizaron un estudio sistemático de las estructuras cristalinas de los complejos de inclusión del ácido cólico y veintiocho bencenos monosustituídos. Encontraron que todos ellos son monoclinicos $P2_1$ con una estructura en bicapas con canales monodimensionales donde se pueden incluir huéspedes. Con una única excepción, todas las estructuras cristalinas contienen los mismos enlaces de hidrógeno entre moléculas de hospedador que responden al esquema de la Figura 2.6 (izquierda). En la central se muestra la red correspondiente a la excepción, pudiendo observarse que el grupo hidroxilo del huésped inserta en la red cíclica anterior. En la de la derecha, se recoge cómo un grupo amino del huésped forma enlaces de hidrógeno con el hospedador (*vide infra*).⁸⁷

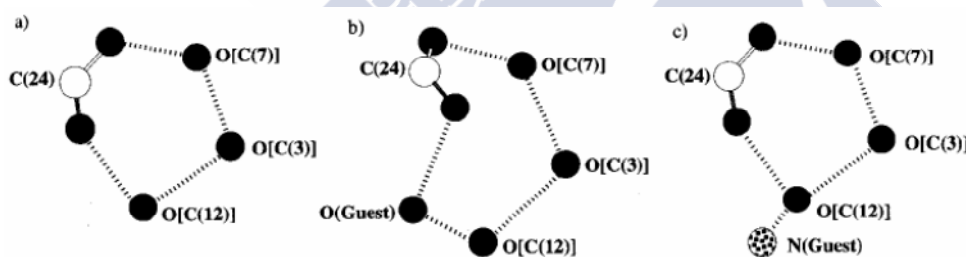


Figura 2.6. Esquema de los enlaces de hidrógeno existentes en los cristales formados por el ácido cólico y bencenos sustituidos.³⁷

Como continuación del trabajo anterior, Yoswathananont *et al*³⁸ estudiaron la formación de los cristales del ácido cólico con benceno (1), tolueno (2), etilbenceno (3), propilbenceno (4), butilbenceno (5), pentilbenceno (6) y hexilbenceno (7). Todos los cristales son $P2_1$ pero la estequiometría es 1:1 para sustituyentes de cadena corta y 2:1 para los de cadena larga ($\geq n$ -butilo). Los resultados muestran que el orden de preferencia por la inclusión en el ácido cólico es 1, 2 > 6, 7 > 3, 4, 5. Todos los complejos poseen estructuras en bicapas, incorporándose los huéspedes en la cavidad monodimensional de la capa lipófila. Clasificaron estas estructuras en tres tipos, αG , αT y βT , según el comportamiento de interdigitación de los grupos metilo en las caras lipófilas y la conformación *gauche* (G) o *trans* (T) de la cadena lateral del esteroide. Al tener en cuenta la estequiometría aparecen cuatro tipos diferenciados que parece que son los condicionantes de la selectividad en el siguiente orden: 1:1 αG > 2:1 αG > 1:1 βT ó 2:1 αT . Los cristales obtenidos mediante cristalización competitiva pertenecen a uno de los

tipos anteriores (α G, α T o β T) o a una combinación de ellos. Si los dos huéspedes pertenecen al mismo grupo en cristales individuales puros resulta ese mismo tipo, pero si son de dos grupos diferentes resultan dos tipos de cristales de inclusión, uno homogéneo con huéspedes mixtos o una mezcla de cristales diferentes. Si uno de los huéspedes de la mezcla origina el tipo α G en el estado puro, ese mismo tipo resulta con los huéspedes incorporados en la cavidad. De estos hechos se concluye que el tipo α G es preferente sobre el α T y este sobre el β T.

El mismo grupo de investigación³⁹ extendió el estudio anterior a otros huéspedes como *o*-, *m*- y *p*-xileno. Las estequiometrías son 1:1 (*m*- y *p*- xileno) y 2:1 (en dos cristales polimórficos según la temperatura con *o*-xileno). Todos ellos poseen una estructura en bicapas (Figura 2.7) con un empaquetamiento alternativo de capas hidrófilas y lipófilas, ambas antiparalelas, diferenciándose la forma I del *o*-xileno de todas las demás en que posee un empaquetamiento antiparalelo en la capa lipófila y paralelo en la hidrófila. Con la clasificación establecida en el artículo anterior, la forma II del *o*-xileno es α T, la del *m*-xileno β T y la del *p*-xileno α G. Todas ellas, así como la forma I del *o*-xileno, poseen diferentes esquemas de enlaces de hidrógeno. El que corresponde a esta última es una red lineal en la que participan los OH de las posiciones 3 y 12 y el ácido carboxílico a lo largo del eje *c*. Se conecta así cada molécula hospedadora con otras cuatro para generar una estructura en lámina bidimensional. El grupo hidroxilo de la posición 7 está conectado débilmente a la red de enlaces de hidrógeno. Los restantes grupos dan una red cíclica de enlaces de hidrógeno por medio de la secuencia O3H, O7H, O12H y O24H en la que participan todos los grupos aceptores/donantes, conectándose así cada molécula hospedadora con las doce que la rodean (Figura 2.8).

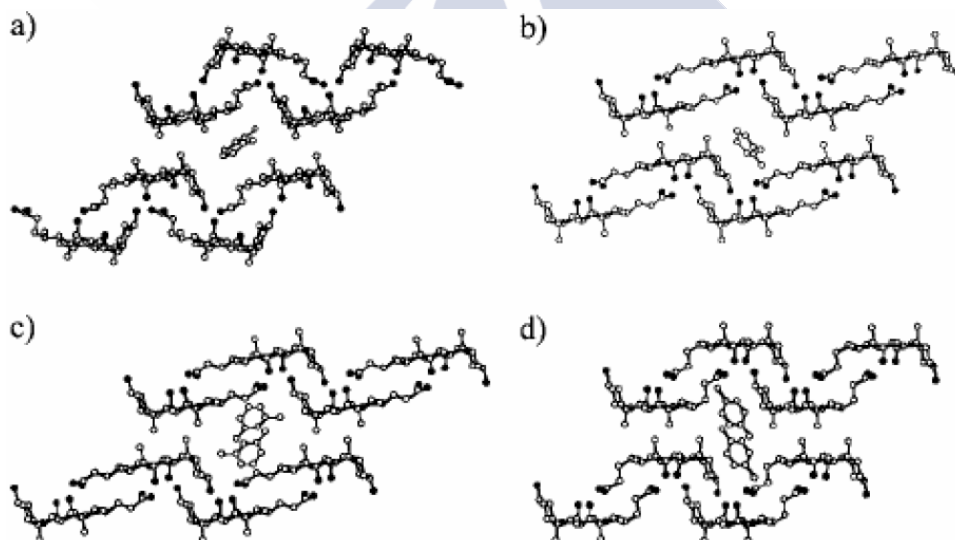


Figura 2.7. Estructuras de los cristales formados por el ácido cólico y xilenos.³⁹

El tipo α G posee el menor volumen de la cavidad y el mayor PC_{cavity} , indicando que el volumen es el más adecuado para los xilenos. Sin embargo, sólo el *p*-xileno origina este tipo de cristalización, lo que pone de manifiesto que la forma tiene también un destacado papel. Una vista de las secciones perpendiculares al eje del canal muestra que la cavidad del tipo α G se ajusta a la forma del *p*-xileno, pero es demasiado estrecha para los otros dos isómeros. Por otra parte, la sección del tipo β T es suficiente para incorporar al isómero *meta* pero no el *orto*. Consecuentemente, no puede formar complejos de inclusión 1:1 y los forma con estequiometría 2:1 bien del tipo α T o bien del tipo del ácido desoxicólico. En definitiva, lo que estos resultados ponen de manifiesto es que la

adecuación estérica de la forma y el volumen entre el huésped y la cavidad del anfitrión juegan un papel importante en el modo de cristalizar el complejo.

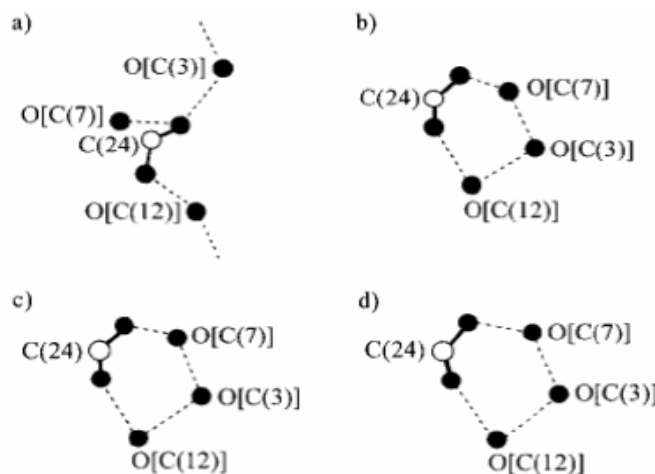


Figura 2.8. Esquemas de los enlaces de hidrógeno formados el ácido cólico y xilenos.³⁹

Para profundizar en las razones de los modos de cristalización del complejo, definen un *coeficiente de empaquetamiento* PC_{cavity} según:

$$PC_{cavity}(\%) = \frac{(volumen\ molecular) \times (n^{\circ}\ de\ huéspedes)}{volumen\ cavidad} \times 100$$

Szyrszyng *et al*⁹⁵ publicaron la estructura del cristal ácido cólico:*anti*-azobenceno (el compuesto *sin*- no es incluido). El cristal es monoclinico $P2_1$ con estequiometría 1:2 (Figura 2.9, izquierda). En él se observa que las moléculas de hospedador se autoensamblan en bicapas corrugadas por medio de enlaces de hidrógeno y los canales que quedan entre las bicapas empaquetadas se llenan con el huésped organizado en columnas. Los anillos bencénicos del huésped están girados, hecho que contrasta con la casi planaridad encontrada para el cristal del *trans*-azobenceno.⁹⁶ A efectos comparativos podemos indicar que el cristal del complejo con ácido desoxicólico es ortorrómbico con estequiometría 1:4 e isoestructural con el del huésped 4-(N,N-dimetilamino)-azobenceno.⁹⁷ La Figura 2.9 (derecha) muestra cómo las moléculas de huésped se alojan en los canales tipo α típicos de este hospedador frente a huéspedes pequeños y planos.⁶⁹

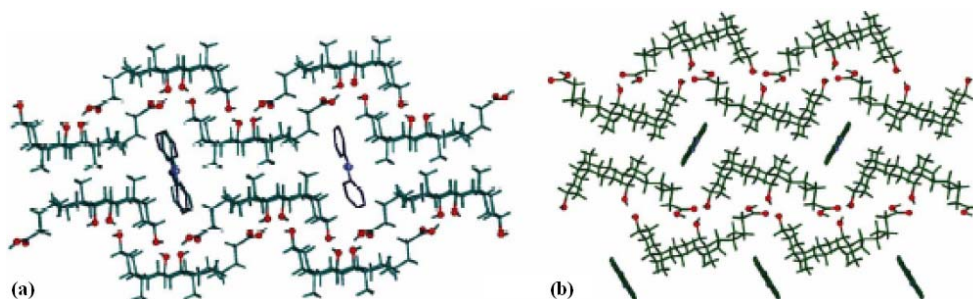


Figura 2.9. (a) Estructura cristalina de un complejo de ácido cólico con *anti*-azobenceno. (b) A efectos comparativos se incluye también el cristal con el ácido desoxicólico.⁹⁵

En relación con la formación de enlaces de hidrógeno, es interesante comentar los cristales formados por el ácido cólico con derivados fluorados de la anilina,^{47,87} ya que surgen dos esquemas. Uno consiste en un biciclo con puentes establecidos por el grupo amino (anilina, 3- y 4-fluoranilina y 3,4-difluoranilina) y el otro es un sistema cíclico sencillo (2-fluoranilina) donde el grupo amino no participa en enlaces de hidrógeno intermoleculares, apareciendo en este caso un enlace intramolecular entre los átomos de N y F. En cambio, con alcoholes 2-, 3- y 4- fluorobencílicos,^{47,87} que forman cristales del grupo P2₁, en ningún caso, el flúor interviene en la red de enlaces de hidrógeno, red que es cíclica en los complejos con 2- y 4-FBzOH: [O24a-H[⋯]O7-H[⋯]O3-H[⋯]O12-H[⋯]O(alcohol)-H[⋯]O24b]. Otros complejos estudiados, formados por el ácido cólico y derivados fluorados, han sido derivados del etanol (2-fluoretanol, 2,2-difluoretanol y 2,2,2-trifluoretanol)³⁵ y de la acetofenona.⁴⁹ En el caso de los alcoholes, como muestran los valores de los ángulos de torsión, la presencia de átomos de flúor afecta poco a la configuración *anti* que ya presentaba el complejo con etanol,³³ y tampoco lo hace sobre los empaquetamientos en el cristal. La red de enlaces de hidrógeno es de nuevo cíclica [-O12-H[⋯]O24b=C-O24a-H[⋯]O7-H[⋯]O(etanol)-H[⋯]O3-H[⋯]O12], acortándose la distancia O(etanol)-H[⋯]O3 con el aumento de átomos de flúor. En el caso de la acetofenona y derivados (3'- y 4'-fluoroacetofenona y 2'-cloroacetofenona) se ha determinado que los cuatro cristales poseen la misma red cíclica de enlaces de hidrógeno [O12-H[⋯]O24b=C-O24a-H[⋯]O7-H[⋯]O3-H[⋯]O12] y que sólo en el caso de la 4'-fluoroacetofenona se observa un enlace de hidrógeno (o una interacción débil) entre el F y el O12, de longitud 3,159 Å, que debilita el enlace O12-H[⋯]O24b. Esta red cíclica de enlaces de hidrógeno, ha sido también observada en varias cetonas alifáticas, aun cuando las estequiometrías de los cristales puedan ser diferentes.⁴⁵ Gdaniec y Polonski⁴⁶ han señalado que el cristal con 4-F-C₆H₄-COEt es monoclinico P2₁.

La participación del nitrógeno amínico en la red de enlaces de hidrógeno ha sido también confirmada en los complejos de inclusión con *p*-toluidina,⁹⁸ aminopiridina⁹⁹ y con (R)- y (S)-1-feniletilamina.¹⁰⁰ En estos últimos casos, la estructura es a base de bicapas, unidas por enlaces de hidrógeno, que dejan canales donde se aloja la amina. Los enlaces de hidrógeno son similares en ambos isómeros, siendo de destacar que el grupo amonio actúa como donante triple unido a dos oxígenos carboxílicos y al O3H del ácido biliar. Por otra parte, los OH de las posiciones 7 y 12 están unidos entre sí para mantener el plano paralelo a la capa hidrófila. Sin embargo los cristales de ambos isómeros se diferencian en el empaquetamiento en la parte de la capa hidrófoba. El cristal (monoclinico P2₁, estequiometría 1:1) con aminopiridina (*Figura 2.10*) presenta una red supramolecular de enlaces de hidrógeno que forma una hélice en la que se unen el O12 y el O24b (disposición cabeza-cola) y que no se había descrito hasta la fecha.

Al estudiar el cristal formado por este ácido biliar con la *m*-cloroanilina Yoswathananont *et al*¹⁰¹ observaron el novedoso hecho de que no hay interdigitación de los metilos 18 y 19 pero si del átomo de cloro entre los metilos de la cara opuesta (*Figura 2.11*). Llegan a esta conclusión después de describir los seis tipos de ordenamientos que pueden resultar por *deslizamiento* e *interpenetración* de capas lipófilas paralelas o antiparalelas (*Figura 2.12*).

Nakano *et al*⁴⁰ publicaron los resultados de un estudio de los cambios que sufren cristales de ácido cólico con diferentes huéspedes (*o*-toluidina, *m*-fluoranilina, *o*-clorotolueno, *o*-bromotolueno e indeno) al calentarlos. Los cristales, caracterizados todos por estequiometrías 1:2, poseen las estructuras que se visualizan en la *Figura 2.13*, con las bicapas y los huéspedes alojados en los canales bidimensionales que quedan entre capas lipófilas. En la parte hidrófila se genera una red de enlaces de hidrógeno cíclica [O3-H[⋯]O7-H[⋯]O24b=C-O24a-H[⋯]O12-H] en la que están implicadas cuatro moléculas

diferentes. Los huéspedes con grupos amino (*o*-toluidina y *m*-fluoranilina) interactúan débilmente con esa red de enlaces de hidrógeno de forma similar a como lo hace la anilina.⁸⁷

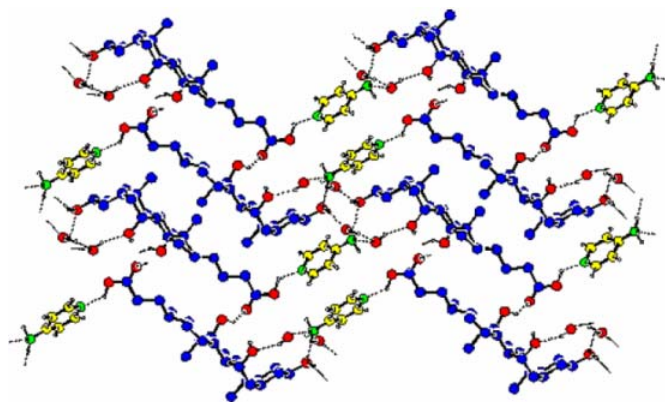


Figura 2.10. Estructura del cristal ácido cólico: 4-aminopiridina.⁹⁹

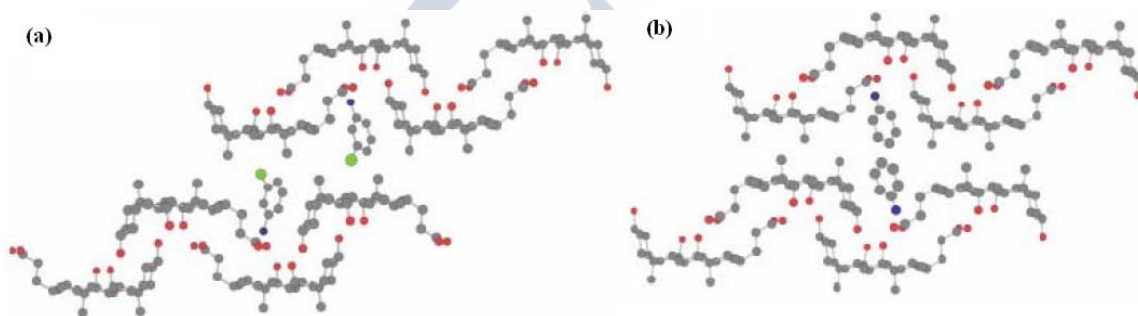


Figura 2.11. Estructura del cristal ácido cólico: *m*-cloroanilina.¹⁰¹ Como referencia se incluye la del cristal ácido cólico: anilina (derecha).^{25,87}

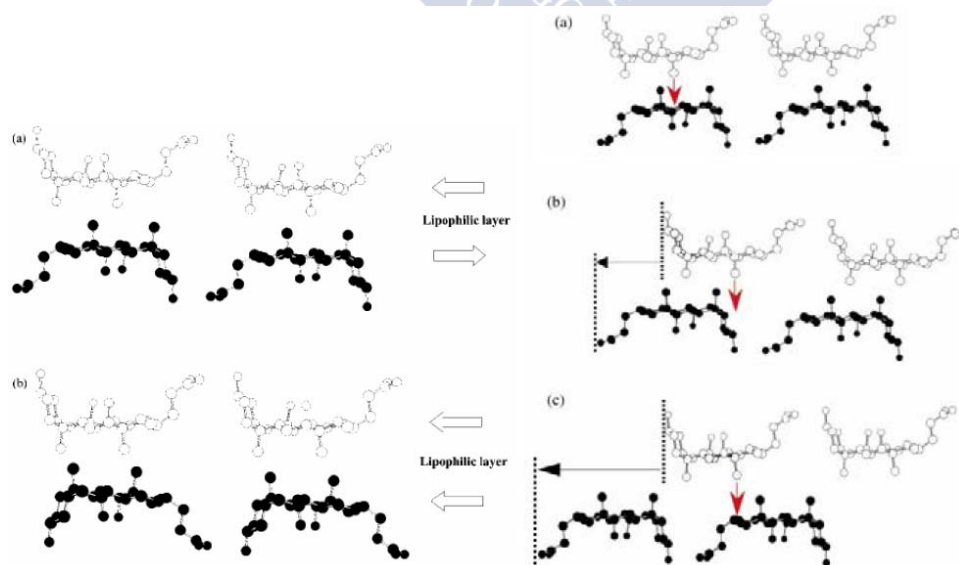


Figura 2.12. Tipos de ordenamientos resultantes del deslizamiento e interpenetración de capas lipófilas paralelas o antiparalelas propuestas por Yoswathananont *et al.*¹⁰¹

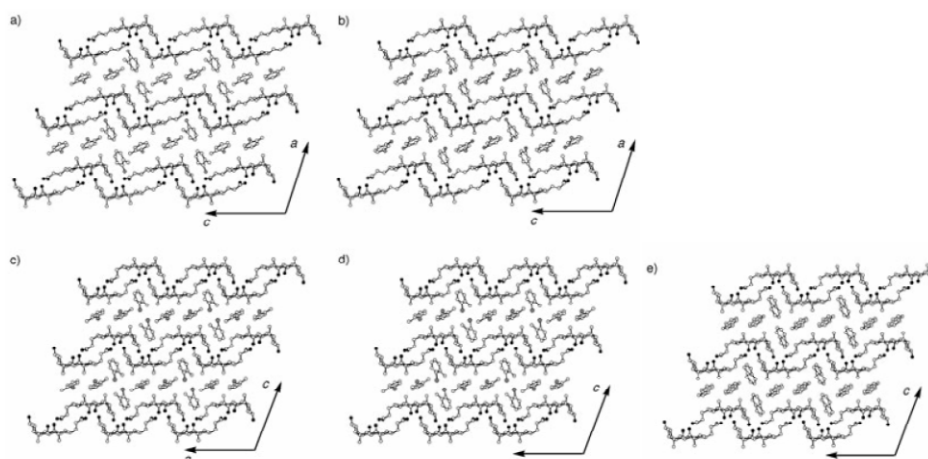


Figura 2.13. Estructuras cristalinas de los complejos de ácido cónico con *o*-toluidina (a), *m*-fluoranimina (b), *o*-clorotolueno (c), *o*-bromotolueno (d) e indeno (e).⁴⁰

Mediante experimentos de termogravimetría se comprobó que todos los cristales liberan el huésped en torno a 130 °C. Lo hacen mostrando dos picos endotérmicos a 67-82°C y 112-122°C. La pérdida de peso en cada una de estas dos etapas es dependiente del huésped. En la primera etapa, para los huéspedes *o*-cloro, *o*-bromotolueno e indeno, la estequiometría inicial, 1:2, se transforma en 2:1, mientras que para la *m*-fluoranimina la transformación es a 1:1. La estequiometría es incierta en el caso de *o*-toluidina. Por lo tanto, no sorprende que la eliminación del huésped induzca cambios estructurales en el ordenamiento del hospedador. La *Figura 2.14* esquematiza tales cambios estructurales. Estos autores demostraron además que el proceso es reversible.

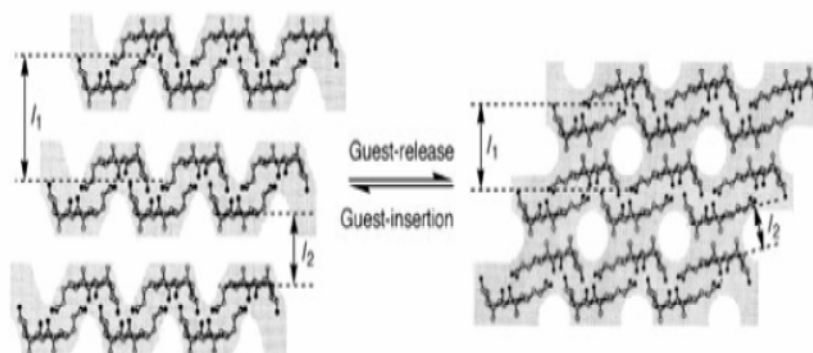


Figura 2.14. Cambios estructurales observados por termogravimetría.³⁹

Al estudiar cristales de ácido cónico y cinco ésteres alifáticos (acetatos de metilo, etilo, *n*-propilo e *i*-propilo -también estudiado por Scout-;⁹⁴ y propionato de etilo), Caira *et al*^{50,102} encontraron dos tipos de empaquetamiento diferentes que suponen canales de tamaño y orientación diferentes, permitiendo así alojar diferentes tipos de huéspedes. Los valores del ángulo de torsión ψ_2 muestran una gran diferencia entre los correspondientes al acetato de metilo y los demás huéspedes, diferencia que también se manifiesta en el ángulo de torsión ψ_4 , el cual, al describir la conformación del grupo C=O alrededor del enlace C23-C24, está de acuerdo con los requerimientos para los enlaces de hidrógeno de dicho grupo. Sin embargo, Nakano *et al*¹⁰² al obtener cristales de ácido cónico:acetato de etilo en presencia de 1-naftilmetilamina, observaron que tenían una estructura diferente (triclínico P1, estequiometría 1:1) a la publicada por Caira *et al*.⁵⁰ Ambas se presentan en la *Figura 2.15*, donde se observa que las conformaciones de la cadena lateral son diferentes (*trans* y *gauche*), lo que viene determinado por los valores de ψ_2 , hablando

entonces de *polimorfismo conformacional*. También se observan diferencias en la red de enlaces de hidrógeno y en la forma de los canales de inclusión.

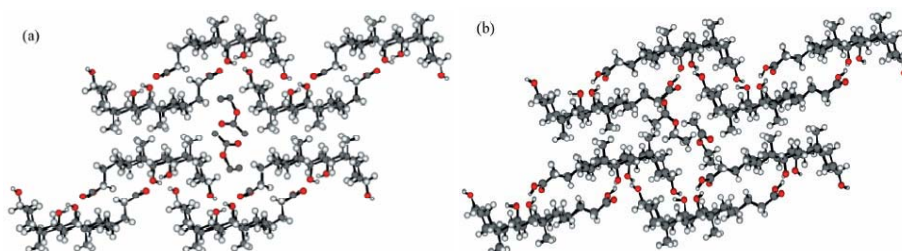


Figura 2.15.- Estructuras del cristal ácido cólico:acetato de etilo publicadas por Nakano *et al.*¹⁰² y Caira *et al.*⁵⁰

En el año 2000, Nowak *et al.*¹⁰³ revisaron la estructura cristalina del complejo ácido cólico:benzofenona para el que Miyata *et al.*⁸⁰ habían indicado una estequiometría 1:1. Sin embargo, este huésped parece ser demasiado grande para acomodarse en los canales manteniendo dicha estequiometría. El cristal, cuya estequiometría ahora se establece como 2:1, resultó ser monoclinico $P2_1$. En la celda unidad hay cuatro moléculas de esteroide simétricamente independientes, dos de las cuales tienen la cadena lateral en conformación *gauche* y las otras dos en *trans*. Las moléculas de huésped, que se encuentran desordenadas, se alojan en dos canales cristalográficamente distintos, pero topológicamente similares, en dos conformaciones diferentes. Las moléculas de hospedador se asocian mediante el sistema cíclico de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carboxilo, a la vez que dan lugar a la bicapa cabeza-cabeza-cola-cola.

En los cristales de ácido cólico pueden observarse diferentes redes de enlaces de hidrógeno aun con un mismo huésped, siempre que exista un tercer componente.¹⁰⁴ Así, se han estudiado los cristales con acrilonitrilo, obtenidos en ausencia (método A) o en presencia de ciclohexano (método B). Los cristales con acrilonitrilo obtenidos por el método A son ortorrómbicos, en los que las redes helicoidales de enlaces de hidrógeno siguen la pauta conocida $O3-H \cdots O12-H \cdots O24b=C-O24a-H \cdots O7-H \cdots O3-H$. En cambio, los obtenidos por el método B son monoclinicos y la estructura es en bicapas con redes de enlaces de hidrógeno cíclicas que siguen la pauta $O3-H \cdots O12-H \cdots O24b=C-O24a-H \cdots O7-H \cdots O3-H$. Sin embargo, los autores indican que con otros nitrilos (como acetonitrilo, butironitrilo, crotonitrilo, isobutironitrilo y valerionitrilo) se forman siempre cristales 1:1 como el anterior, incluso en presencia de un tercer componente. En definitiva, el cambio es exclusivo del acrilonitrilo.

Este fenómeno también fue observado con ácido acético:¹⁰⁴ (i) los cristales obtenidos con el método A poseen una estructura cruzada con una red helicoidal de enlaces de hidrógeno en el que está implicado el grupo carboxílico del huésped $O12-H \cdots O=C(CH_3)-O-H \cdots O3-H \cdots O7-H \cdots O24b=C-O24a-H \cdots O12-H$; (ii) los cristales obtenidos con el método B difieren en estequiometría y estructura, ahora formada a base de bicapas con dos clases de redes cíclicas de enlaces de hidrógeno que también implican al huésped, $O12-H \cdots O3-H \cdots O7-H \cdots O=C(CH_3)-O-H \cdots O12-H$ y $O24a-H \cdots O=C(CH_3)-OH \cdots O24b$.

En esta misma línea, cabe englobar el trabajo de Miyata *et al.*¹⁰⁵ en el que se describen dos cristales polimórficos de ácido cólico y metacrilonitrilo obtenidos mediante diferentes métodos de cristalización. Uno posee una estructura cruzada y el otro en bicapas, ambos con estequiometría 1:1. Por otra parte, el primero es ortorrómbico $P2_12_12_1$ y el segundo triclinico $P1$. En el primer caso, el empaquetamiento es similar al del cristal con acrilonitrilo pero la relación donante/aceptor de los enlaces de hidrógeno son contrarias, siendo ahora $O7-H \cdots O24b=CO24a-H \cdots O12-H \cdots O3-H$. El segundo de los

cristales polimórficos posee una red de enlaces de hidrógeno que implica tanto una red cíclica como otra helicoidal, aunque ambas tienen misma secuencia $O7-H\cdots O3-H\cdots O12-H\cdots O24b=C-O24a-H\cdots O7$.

Los cristales del ácido cólico estructurados en bicapas pueden clasificarse en cuatro tipos, de acuerdo con las conformaciones *gauche* o *trans* de la cadena lateral del esteroide y los dos tipos de *interdigitación*, α o β , de los grupos metilo en las capas lipófilas. Es obvio que las estructuras resultantes dependen del huésped. Un ejemplo de cada una de ellas se muestra en la *Figura 2.16*, y corresponden, respectivamente, a los huéspedes benceno (α -*gauche*), fenol (β -*trans*), fenilacetileno (β -*gauche*) y alcohol bencílico (α -*trans*).³⁷

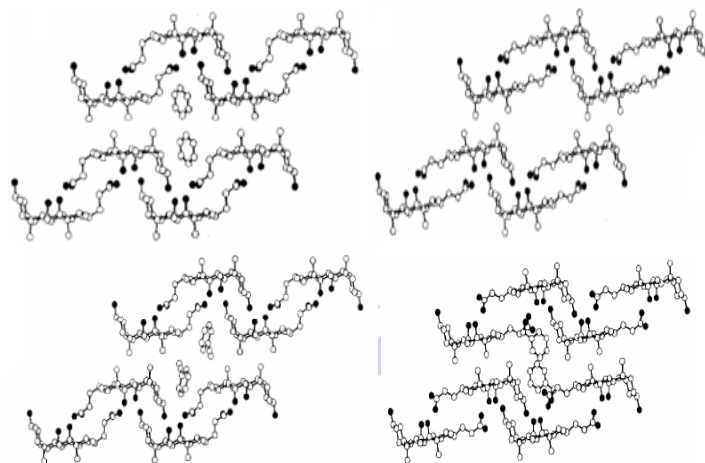


Figura 2.16. Tipos de cristales de ácido cólico según las conformaciones *gauche* o *trans* de la cadena lateral del esteroide y los dos tipos de *interdigitación*, α o β , de los grupos metilo en las capas lipófilas.³⁷

En el α -*gauche* el ángulo diedro ψ_2 está comprendido entre 58 y 65° , y en la capa lipófila el metilo 18 se localiza entre los metilos 18 y 19 de la capa opuesta. En el tipo β -*trans* el ángulo de torsión está comprendido entre -167 y -180° y ahora es el metilo 19 el que se inserta entre los metilos 18 y 19 de la capa opuesta. El deslizamiento de ~ 4.5 Å de una de las capas sobre la otra, provoca la transformación $\alpha \rightarrow \beta$. El volumen de las cavidades varía en el orden α -*gauche* < α -*trans* < β -*gauche* < β -*trans*. A través de cortes paralelos al eje de los canales, se diferencian surcos cuadrados para los de tipo *gauche* y triangulares para los *trans*.

La mayoría de los bencenos monosustituidos cristalizan en los tipos α -*gauche* y β -*trans*, la primera para los huéspedes pequeños y la última para los más grandes. Cuando los volúmenes moleculares del huésped exceden el límite superior del tipo β -*trans* (140 Å³) la estequiometría 1:1 pasa a 2:1 con una isomerización simultánea $\beta \rightarrow \alpha$ (isomerización por tamaño).

Por otra parte, los huéspedes de tamaño intermedio podrían incorporarse en las cavidades para dar los tipos α -*gauche* o β -*trans*, y el hecho real es que el resultado depende de su forma (isomerización por forma). Esta forma se puede caracterizar por la longitud del eje longitudinal de la molécula (l) y por su espesor (th), parámetros que son estimados mediante cálculos geométricos con modelos moleculares. Observan así que si $l < 9.7$ Å y $th < 4.3$ Å, resulta el tipo α -*gauche*, mientras que si $l > 9.0$ Å y $th > 4.3$ Å, resulta el β -*trans* (aunque con alguna excepción).

El coeficiente de empaquetamiento de las cavidades del hospedador (PC_{cavity}) puede utilizarse como criterio para el ajuste estérico del huésped en la cavidad. Nakano *et al*³⁷ deducen así que $PC_{cavity} = 55-70\%$ es el requisito para la formación de complejos de

inclusión estables, particularmente cuando los huéspedes se incluyen estabilizados por fuerzas de van der Waals. Las interacciones intermoleculares fuertes como las π - π o los enlaces de hidrógeno expanden el rango anterior. Por otra parte, los valores de PC_{cavity} superiores al 70%, al no dar complejos estables, tienden a reducir la relación estequiométrica hospedador: huésped.

Kato *et al*¹⁰⁶ han publicado una discusión sistemática de los ensamblajes helicoidales de cristales de inclusión de ácidos biliares y derivados actuando como moléculas hospedadoras. Tras analizar del orden de 300 estructuras cristalinas, indican que poseen la siguiente estructura jerárquica (*Figura 2.17*): a) ordenamiento de dichas moléculas para dar hélices con una dirección definida respecto al eje cristalográfico 2_1 ; b) asociación paralela de hélices a través de enlaces de hidrógeno para dar láminas quirales; c) apilamiento de estas láminas de forma paralela o antiparalela por medio de fuerzas de van der Waals, y d) llenado de los espacios quirales incluyendo huéspedes entre las láminas. Extienden su estudio a la comparación entre los ácidos desoxicólico, cólico, quenodesoxicólico y litocólico. Todas las hélices de estos ácidos son a derechas, excepto la del ácido quenodesoxicólico que es a izquierdas (*Figura 2.18*).

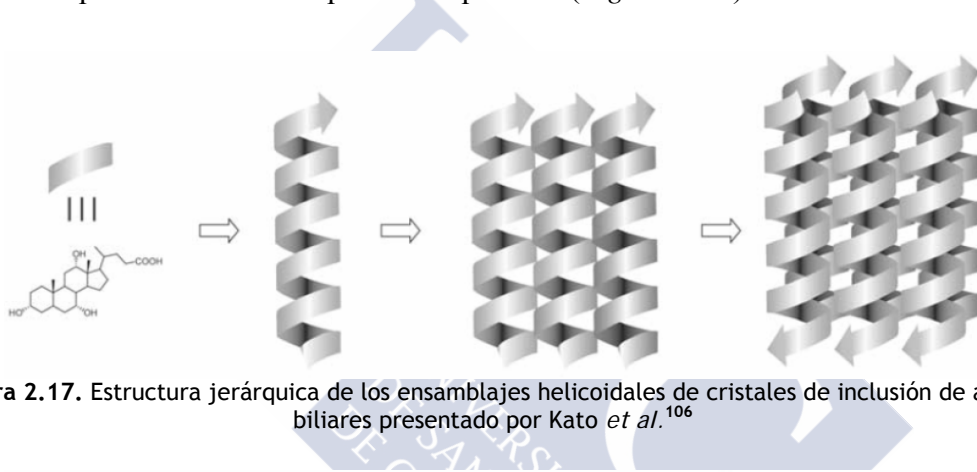


Figura 2.17. Estructura jerárquica de los ensamblajes helicoidales de cristales de inclusión de ácidos biliares presentado por Kato *et al.*¹⁰⁶

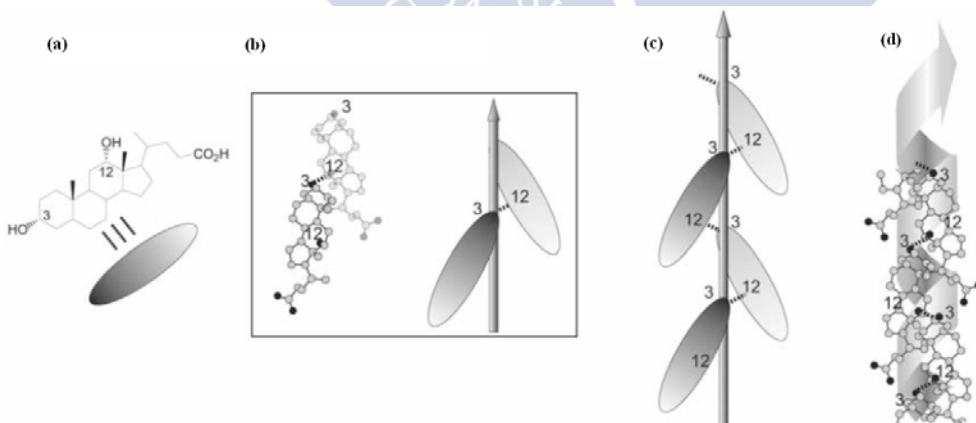


Figura 2.18. Comparación de las estructuras helicoidales de los cristales de inclusión de los ácidos de los ácidos desoxicólico (a), cólico (b), quenodesoxicólico (c) y litocólico (d).¹⁰⁶

Polonski *et al*¹⁰⁷ se plantearon cómo transformar especies ópticamente inactivas en especies activas, sin utilizar reactivos quirales. La quiralidad puede provenir de una torsión molecular en cuyo caso la estabilidad configuracional depende de la barrera energética para la rotación interna. Esta puede obtenerse en estado sólido ya que los movimientos moleculares se ven altamente restringidos. Así, uno de los primeros ejemplos conocidos de compuestos que adquieren actividad óptica en estado sólido es el bencilo (PhCOCOPh), que a temperatura ambiente cristaliza en cristales de los grupos

espaciales trigonales enantiomorfos $P3_12_1$ y $P3_22_1$, aunque su configuración absoluta no había sido determinada. Precisamente fue determinada por estos autores al obtener complejos de inclusión con ácido cólico y ácido desoxicólico (cuyas configuraciones están bien establecidas) y realizar medidas de rayos-X y dicroísmo circular. El cristal con ácido cólico posee estequiometría 2:1 y el de ácido desoxicólico 4:1. La estructura del último no pudo ser resuelta y la del primero (monoclínico $P2_1$), al igual que la red de enlaces de hidrógeno puesta de manifiesto, son típicos de clatratos de ácido cólico (Figura 2.19). También caracterizaron la conformación del huésped por medio de ángulos de torsión, la cual resulta ser diferente a la que presenta en sus cristales.

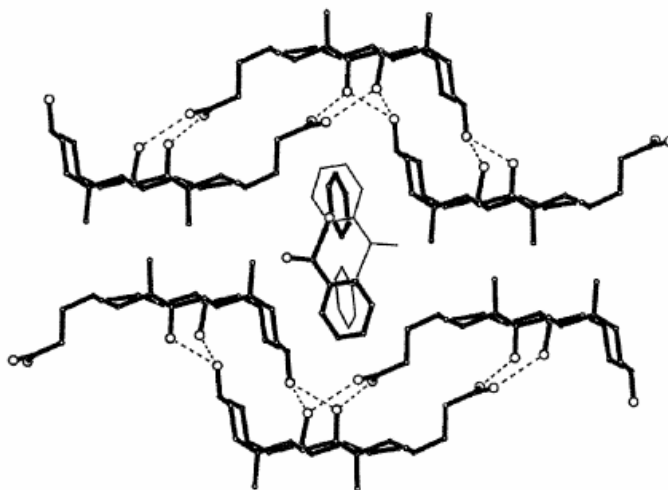


Figura 2.19. Estructura del cristal ácido cólico:bencilo.¹⁰⁷

Nakano *et al*⁴⁴ han abordado la polimerización en cristales polimórficos de ácido cólico, conocidos ya los estudios sobre el particular con los ácidos desoxicólico,^{13,17} apocólico,^{15,17} y colato de metilo.¹⁹ Los monómeros que utilizaron fueron acrilonitrilo, metacrilonitrilo, 2-cloroacrilonitrilo, acetato de vinilo y 2,3-dimetil-1,3-butadieno. La polimerización la llevaron a cabo con irradiación- γ con una fuente de ^{60}Co y estudiaron los pesos moleculares y distribuciones mediante GPC. Nakano *et al* dedujeron que la polimerización sólo tiene lugar cuando los monómeros están incluidos en canales y no en cavidades tipo caja, lo que puede justificarse porque, en el último caso, la reacción entre monómeros adyacentes se ve impedida por la presencia de moléculas hospedadoras. Asimismo, comparan la estereorregularidad que se obtiene en la polimerización de 2,3-dimetil-1,3-butadieno en diferentes huéspedes esteroideos y la explican en función del tamaño del canal en cada caso.

Por otra parte, Bertolasi *et al*¹⁰⁸ se han hecho eco de que tanto el ácido cólico como el desoxicólico forman compuestos de inclusión con diferentes cetonas cíclicas racémicas, permitiendo la separación de enantiómeros. Así, estudiaron el cristal 2:1 ácido cólico:(-)-biciclo[3.2.0]-hept-2-en-6-ona, un compuesto de importancia en la síntesis de prostaglandina. Debe resaltarse que, cuando se usa ácido desoxicólico como hospedador, cristaliza el isómero contrario, lo que pone de manifiesto que los detalles finos estructurales juegan un papel importante en el proceso de discriminación quiral. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares que se presentan son [O3-H \cdots O12, O12- H \cdots O24b, O24a-H \cdots O7 y O7-H \cdots O3]. El huésped se incluye en las capas lipófilas e interacciona con el grupo ácido cólico mediante contactos de van der Waals débiles.¹⁰⁹

Sada *et al*⁴³ estudiaron el reconocimiento molecular de lactonas de tamaño medio (ya que las lactonas de tamaño pequeño o grande conducen a cristales libres de huésped) por

su inclusión en cristales de ácido cólico. Todos los cristales de los complejos estudiados presentan estequiometría 1:1 y son monoclinicos $P2_1$. Los autores trataron de comprender el reconocimiento molecular analizando diferentes secciones de corte y en diferentes planos en las que se van visualizando las dimensiones estéricas de las cavidades y posibles cavidades donde puede entrar un sustituyente del huésped y así producirse el reconocimiento de uno de los dos isómeros de una mezcla racémica.

Muy recientemente, Nakamura *et al*¹¹⁰ abordaron el mecanismo de resolución óptica de los enantiómeros de la γ -valerolactona en los canales del ácido cólico realizado mediante un exhaustivo estudio de ^{13}C RMN y CPMAS. Primero estudiaron los espectros en el complejo de inclusión del huésped marcado con deuterio, de cada enantiómero sin marcar y de mezclas de ellos para asignar las señales. Llegaron a la conclusión de que las probabilidades de inclusión de los enantiómeros dependen de cuál haya entrado antes en los canales, siendo más alta para los isómeros S. Indican que cuando el S entra se produce un cambio en la conformación de la cola del ácido cólico de forma que se facilita la entrada de otra molécula S.

A continuación se comentan los trabajos de los derivados del ácido cólico que hacen referencia a su éster metílico. El primero de ellos data de 1987 y hace referencia al cristal del complejo 1:1 colato de metilo:metanol, hecho que lo diferencia del comportamiento del desoxicolato de metilo.¹¹¹ El cristal pertenece al sistema monoclinico $C2$ y el empaquetamiento pone de manifiesto una estructura en capas con sendas partes hidrófoba e hidrófila, siendo en esta última donde se encuentra atrapado el huésped por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos OH de la posición 12.

Más recientemente se ha publicado el cristal de colato de metilo:2-propanol.¹¹² La estequiometría y el grupo cristalográfico son los mismos que para el huésped anterior. Sin embargo, la conformación de la cadena lateral en estos dos cristales es diferente de las que presenta en los cristales de ácido cólico y de desoxicolato de metilo puesto que el ángulo de torsión ψ_3 vale 78.5° (colato de metilo:metanol), 74.5° (colato de metilo:2-propanol), 171.8° (ácido cólico)⁷⁸ y 179.8 y 163.7° (desoxicolato de metilo: metanol),¹¹³ lo que puede tener gran trascendencia a la hora del proceso de inclusión de un huésped. Finalmente, en la formación de enlaces de hidrógeno, puede observarse que el átomo de oxígeno carboxílico queda sin participar como aceptor, como ocurría en el cristal de desoxicolato de metilo:metanol.

Las estructuras de los cristales del éster metílico sin huésped ($P2_12_12$) y con acetonitrilo ($P2_1$; estequiometría 1:1), fueron publicadas en 1995 por Scott.¹¹⁴ En virtud de los ángulos de torsión determinados, el autor estableció que las cadenas laterales están extendidas en los cristales con inclusión, mientras que en el cristal sin huésped hay dos moléculas diferentes de esteroide con conformaciones de la cadena lateral y esquemas de enlaces de hidrógeno muy distintos.

En dos importantes trabajos, Sugahara *et al*¹¹⁵ y Kato *et al*⁵¹ estudiaron la influencia del tamaño de la cadena lateral en las características de inclusión de los ácidos biliares. Los primeros autores analizaron los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico (y derivados) por análisis de cristales libres de huésped o con inclusión. Discutieron primero los resultados del ácido cólico (a^0) y derivados, señalando que tanto el primero como el derivado con un grupo metileno menos (a^-) pueden incluir muchos tipos de huéspedes. Por el contrario, el derivado con dos metilenos menos (a^{-2}) sólo da cristales libres de huésped y los que tienen uno (a^+) o dos metilenos (a^{+2}) adicionales presentan unas características intermedias. Por otra parte, mientras a y a^- dan estructuras en bicapas con canales flexibles, a^{+2} se presenta en diferentes estructuras cristalinas. Finalmente hicieron referencia a la red de enlaces de hidrógeno cíclico de a^0 (Figura 2.20 izquierda), diferente del que presenta a^{+2} (Figura 2.20 central).

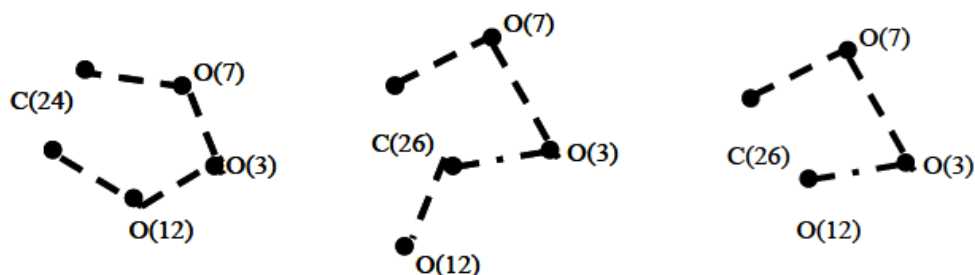


Figura 2.20. Redes de los enlaces de hidrógeno observados en los cristales resueltos por Sugahara *et al* para estudiar la influencia de la longitud de la cadena lateral en las características de inclusión de los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico y litocólico (y derivados).¹¹⁵

Respecto al ácido desoxicólico (b^0) y derivados, señalan que b^0 y b^{-1} forman cristales con inclusión con la mayoría de los huéspedes orgánicos pero con diferencia respecto a los alcoholes alifáticos (b^{-1} incluye metanol, etanol y 1-propanol y b^0 no lo hace), hecho que atribuyen a que b^0 se organiza en bicapas y b^{-1} en monocapas.¹¹⁶ Por otra parte, b^{+1} y b^{+2} originan cristales sin huéspedes.

Por su parte, Kato *et al*⁵¹ basándose en consideraciones geométricas (rotaciones y deslizamientos), restringidas a la estructura en bicapas (derecha), ilustraron diez maneras de agregarse moléculas esteroides (Figura 2.21). El artículo se centra, precisamente, en estas últimas, que pueden clasificarse en bicapas propiamente dichas (con 7 subtipos, B_a a B_g) y en “*como capas*” (con 2 subtipos, T y W). Los empaquetamientos moleculares correspondientes a ellas se muestran en la Figura 2.22.

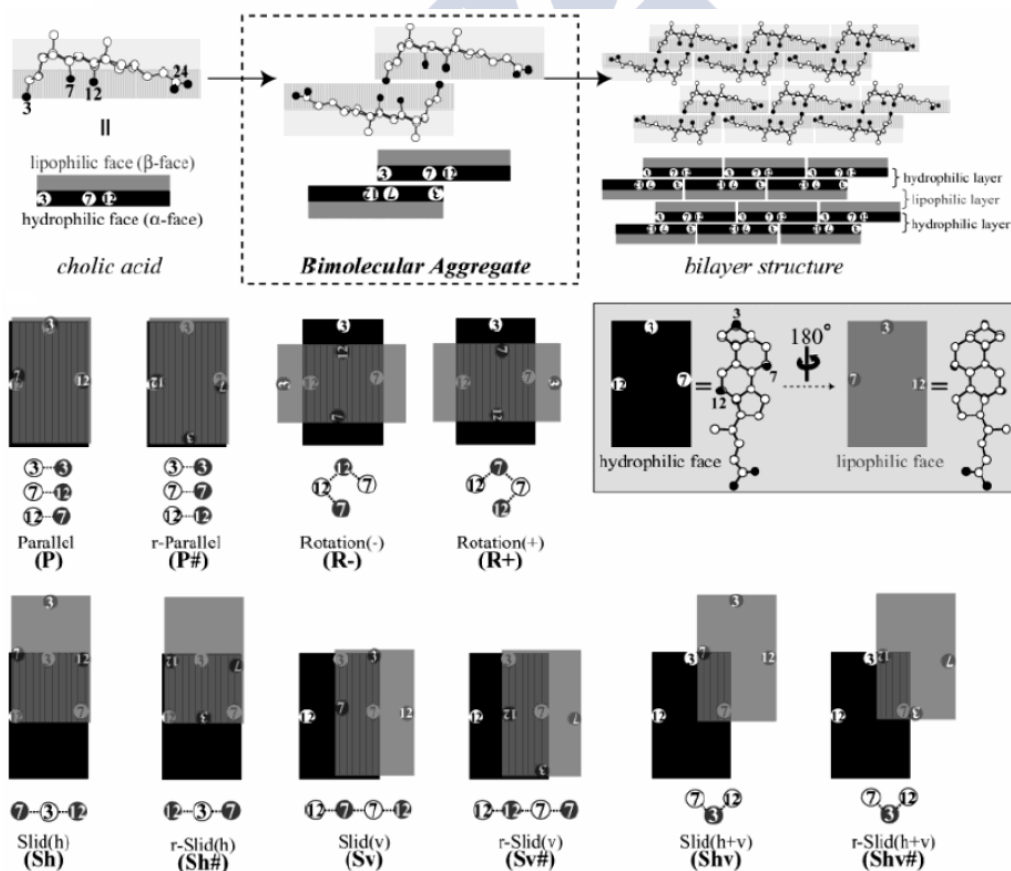


Figura 2.21. Diez maneras de agregación de moléculas esteroides basadas en consideraciones geométricas (rotaciones y deslizamientos) restringidas a la estructura en bicapas (derecha). Las líneas de puntos entre grupos OH indican que se encuentran a distancias de posibles enlaces de hidrógeno.⁵¹

Miyata *et al*¹¹⁷ han establecido relaciones entre las estructuras moleculares y las asociaciones moleculares. Para ello, se fijan en que las moléculas de hospedador se asocian para dar arquitecturas cruzadas, en capas o helicoidales, así como en las redes de enlaces de hidrógeno que establecen. Estas redes son para el ácido cólico cíclicas sin participación de huéspedes y para el 3-epicólico ($3\beta,7\alpha,12\alpha$) son ramificadas con participación de huéspedes. Mientras el ácido cólico sólo incluye alcoholes muy pequeños, el ácido 3-epicólico también incluye alcoholes de mayor tamaño. Respecto a otros isómeros establecen que el ácido 12-epicólico ($3\alpha,7\alpha,12\beta$) no incluye compuestos orgánicos, y que el ácido 3,12-epicólico ($3\beta,7\alpha,12\beta$) incluye compuestos como metanol, acetonitrilo...

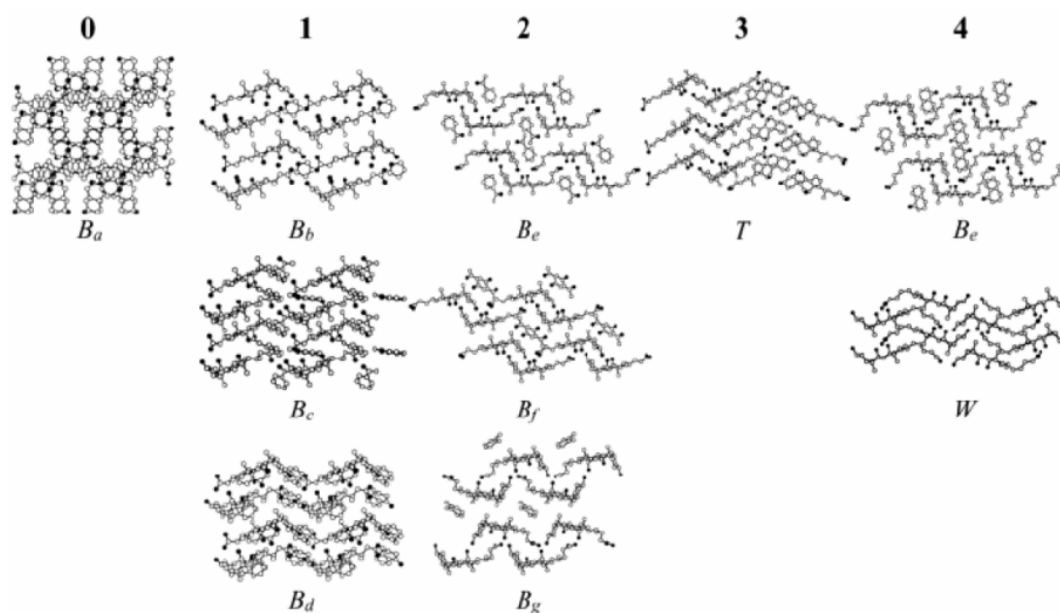


Figura 2.22. Empaquetamientos moleculares correspondientes a los siete subtipos de bicapas y los dos "como capas".¹¹⁸

2.1.4 Ácido 3 β -amino cólico

El ácido 3 β -amino cólico (*amC*) (Figura 2.23) puede considerarse la estructura básica presente en muchos esteroides sintetizados en este grupo de investigación, derivados en los que se ha incluido un grupo apolar en la posición 3 del esteroide, o bien dímeros u oligómeros de orden superior. Se discutirá su estructura cristalina de forma independiente de los ácidos biliares di- y trihidroxílicos aunque estrictamente hablando se trate de un derivado dihidroxílico del ácido cólico.

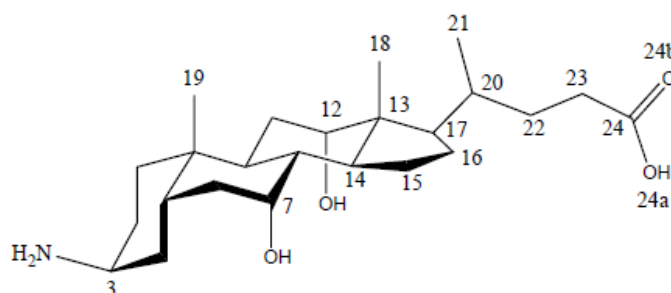


Figura 2.23. Estructura molecular numerada del ácido 3 β -amino cólico (*amC*).

Los cristales de este derivado del ácido cólico fueron obtenidos por recristalización en agua en el seno de este grupo de investigación.¹¹⁹ El estudio de difracción de rayos X pone de manifiesto que se trata de cristales tetrahidratados (aunque como una molécula de agua se encuentra en dos lugares diferentes al 50%, en las imágenes del Mercury se visualizaron cinco) ortorrómbicos del grupo espacial P2₁2₁2₁. Los parámetros de celda se recogen en la *Tabla 2.1*.

Tabla 2.1.
Parámetros de la célula del cristal ortorrómbico P2₁2₁2₁ del ácido 3β-amino cólico.¹¹⁹

a(Å)	b(Å)	c(Å)	α(°)	β(°)	γ(°)
7.749(5)	12.667(5)	27.498(5)	90.000(5)	90.000(5)	90.000(5)

Los ángulos de torsión más significativos se recogen en la *Tabla 2.2*. La conformación del anillo D se analiza siguiendo el criterio de Altona *et al*¹²⁰ por medio de los llamados *ángulos de torsión máximo posible*, φ_m, y *ángulo de fase*, Δ. Estos se calculan a partir de los 5 primeros ángulos de torsión de la *Tabla 2.2* por medio de las expresiones:

$$\operatorname{tg} \frac{\Delta}{2} = \frac{(\varphi_2 + \varphi_4) - (\varphi_1 + \varphi_3)}{3,0777\varphi_0} \quad \text{y} \quad \varphi_0 = \varphi_m \cos \frac{\Delta}{2}$$

Tabla 2.2.
Ángulos de torsión más significativos del ácido 3β-amino cólico.¹²¹

Angulo de torsión	φ (°)
C17-C13-C14-C15 ≡ φ ₀	46.02
C13-C14-C15-C16 ≡ φ ₄	-32.09
C14-C15-C16-C17 ≡ φ ₃	5.94
C15-C16-C17-C13 ≡ φ ₂	22.06
C16-C17-C13-C14 ≡ φ ₁	-41.09
C17-C20-C22-C23	-173.35
C20-C22-C23-C24	167.28

Los valores obtenidos, Δ = 20.11° y φ_m = 46.74°, son indicativos de una conformación intermedia entre media silla y β-sobre, la misma que en los cristales de ácido cólico con los huéspedes metanol, etanol y 1-propanol de estequiometrias 1:1.^{31,33} Por otra parte los valores de los ángulos de torsión alrededor de los enlaces C20-C22 y C22-C23 indican que la cadena lateral se encuentra en una conformación estirada, que supone una distancia de extremo a extremo de la molécula de 1.6 nm.

La vista de la estructura cristalina a lo largo del eje *a* se muestra en la *Figura 2.24*. Es de destacar que el compuesto cristaliza en forma zwitteriónica. En esa misma figura, observamos que el empaquetamiento es del tipo *cruzado* donde dos moléculas de *amC* enfrentan sus caras lipófilas en forma cabeza-cola. En las caras lipófilas un grupo metilo C18 de una molécula queda localizado entre los metilos C18 y C19 de la otra, disposición de *interdigitación α*. Al tener en cuenta el valor del ángulo de torsión C17-C20-C22-C23, la bicapa se dice que es del subtipo *α-trans*.

Las estructuras de tipo cruzado son conocidas para cristales de ácido cólico, bien libre⁷⁸ o con los huéspedes metanol, etanol y 1-propanol,^{31,33} así como con

metacrilonitrilo.¹⁰⁵ Por otra parte, definiendo los planos moleculares con los 13 átomos de carbono que forman los anillos B, C y D, el ángulo entre las dos moléculas de esta subestructura resulta ser de 10.25°. Otra unidad doble como la anterior se dispone de forma aproximadamente perpendicular de manera cola(1)-cabeza(2) y cabeza(1)-centro(2), con ángulos entre planos (definidos como antes) de 84.94 y 85.86°. El esquema se repite indefinidamente generando el zigzag característico de las estructuras cruzadas.

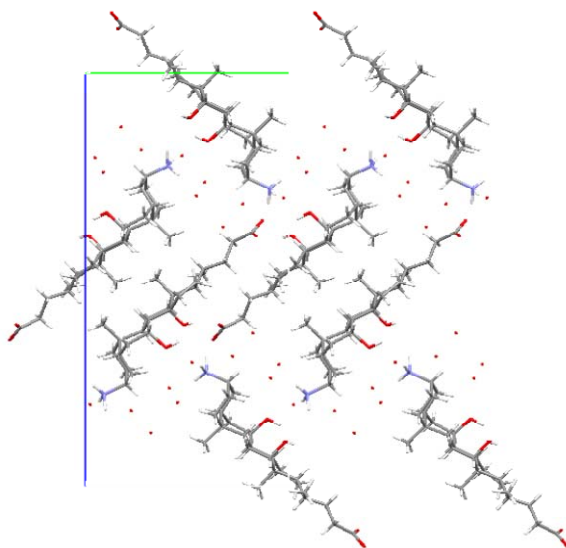


Figura 2.24. Empaquetamiento del cristal del *amC* visto a lo largo del eje *a*.¹¹⁹

En el caso del ácido cólico sin huéspedes, las subunidades son similares (*Figura 2.25*) aunque sin interdigitación de los grupos metilo, pero la disposición relativa entre ellas al crearse el zigzag es diferente de la del ácido 3 β -amino cólico, probablemente debido a la diferente conformación de los sustituyentes en la posición 3. Ahora se producen cuatro enlaces de hidrógeno helicoidales (tipo CI) que unen cinco moléculas con la secuencia O24a-H \cdots O12-H \cdots O3-H \cdots O7-H \cdots O24b. Este mismo esquema aparece en el cristal ácido cólico:metacrilonitrilo.¹⁰⁵ El huésped se aloja entre las caras lipófilas y tampoco aparece interdigitación de los metilos.

Evidentemente esta estructura está estabilizada por los enlaces de hidrógeno que establecen los grupos amonio, carboxilato e hidroxilo presentes, respectivamente, en la cabeza, cola y parte central del esteroide. Las características de los enlaces de hidrógeno intermoleculares encontrados se detallan en la *Tabla 2.3*. En todos ellos, figura el grupo carboxilato del zwitterión como aceptor por lo que la distinción de la nomenclatura 24a y 24b establecida en la *Figura 2.25* pierde su sentido. Esos tres enlaces de hidrógeno unen cuatro moléculas de esteroide. La zona central de una molécula de esteroide, concretamente los grupos hidroxilo de las posiciones 7 y 12, establecen enlaces de hidrógeno con los carboxilatos situados en los extremos de la cadena lateral de otras dos moléculas. Es el enlace de hidrógeno entre el grupo amonio de la posición 3 y el carboxilato de una cuarta molécula el que se produce donde la bicapa hace el zigzag.

En el caso del cristal ácido cólico:etanol,³¹ cinco enlaces de hidrógeno se establecen entre tres moléculas de esteroide y una de etanol. Lo mismo sucede en el caso del huésped metanol, pero para el 1-propanol aparecen dos moléculas de huésped.³³ Como en el cristal sin huésped, en estos complejos cristalinos las moléculas de ácido cólico tampoco muestran interdigitación de los grupos metilo.

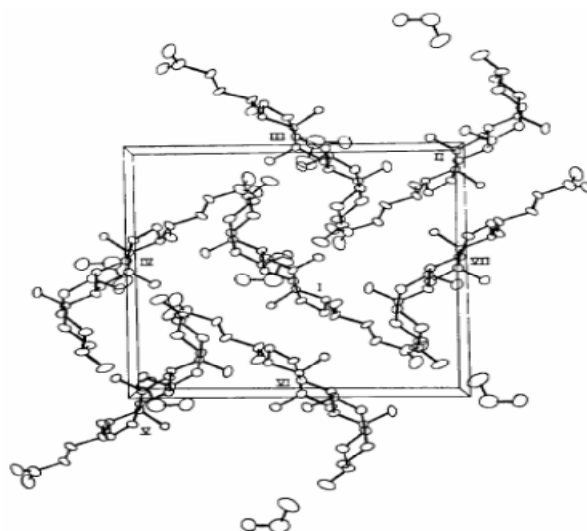


Figura 2.25. Subunidades estructurales del cristal del ácido cólico sin huéspedes.⁷⁸

Tabla 2.3.
Enlaces de hidrógeno observados en el cristal de amC.

D-H...A	d(D...A) (Å)	<DHA (°)
O(7)-H...O(24a)	2.997 (7)	156.2 (0,4)
O(12)-H...O(24b)	2.731 (8)	151.74 (0,4)
N-H...O(24a)	2.832 (8)	149.37 (4,8)

2.2 RESULTADOS OBTENIDOS CON DERIVADOS MONO-SUSTITUIDOS.

En este grupo de investigación, se han venido empleando numerosas metodologías en busca de las mejores condiciones de reacción para obtener un rendimiento y coste aceptables y, en definitiva, optimizar las reacciones químicas necesarias para el diseño de las estructuras moleculares de interés. En las distintas rutas sintéticas, así como en la descomposición de los productos sintetizados, aparecen derivados de distinta naturaleza más o menos estables. Estos intermedios de reacción, subproductos de reacciones paralelas o hidrólisis de los productos sintetizados, aun no siendo objetivo principal de este estudio, no dejan de tener interés ya que algunos son derivados de esteroides que conservan sus peculiaridades. Por ello, a continuación se presentarán cuatro moléculas cristalizadas en el transcurso de la investigación antes de dar paso a los dímeros de esteroides de mayor tamaño.

2.2.1 Monoderivado 3 β -azidacolato de metilo, C-azida.

En la síntesis química, la azida se emplea en la obtención de numerosos productos ya que es un buen grupo saliente. El derivado del ácido cólico con un grupo azida sintetizado resultó ser lo suficientemente estable como para poder estudiar su estructura cristalina. A continuación se muestran los resultados obtenidos para el cristal del éster metílico derivado de ácido cólico unido a través de la posición C3 (β) a la azida. Denominado C-azida (Figura 2.26), sus cristales han sido obtenidos en una disolución de acetato de etilo/metanol y, evidentemente, expuesto a la humedad ambiental.

El cristal incluye dos moléculas de agua, pertenece al sistema monoclinico C2 y los parámetros de la celda se recogen en la Tabla 2.4.

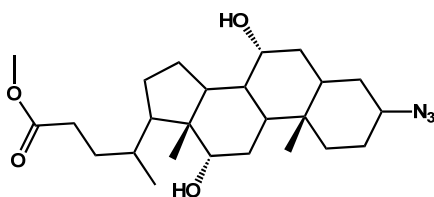


Figura 2.26. Estructura del derivado de ácido cólico del C-azida.

Tabla 2.4.

Parámetros de celda del cristal del C-azida recristalizado en metanol/acetato de etilo.

Formula Empírica	C ₂₅ H ₄₁ N ₃ O ₄ ·H ₂ O
Peso Molecular	465.62
Temperatura (K)	100(2)
Longitud de Onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, C2
a (Å)	18.9238(12)
b (Å)	16.6746(12)
c (Å)	7.6595(5)
α (°)	90
β (°)	97.790(3)
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	2394.6(3)
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.292
coeficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.09
F (000)	1016
Tamaño Cristal (mm ³)	0.33x0.24x0.16
Intervalo θ (datos) (°)	2.4-37.1
Intervalo de índices	-31 ≤ h ≤ 30 -28 ≤ k ≤ 28 -12 ≤ l ≤ 13
Datos/restricciones/parámetros	12148/8/329
Grado de ajuste en F ²	1.04
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0363, wR2 = 0.0936
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0399, wR2 = 0.0959

La Figura 2.27 muestra las vistas a lo largo de los ejes cristalográficos *a*, *b* y *c* del empaquetamiento. La disposición del compuesto en la red cristalina origina una estructura de bicapa. La capa hidrófoba está formada por la cara β del ácido biliar y los grupos azida ligeramente distorsionados y la capa hidrófila por los grupos más polares donde, al mismo tiempo, se incluye el huésped (agua) con estequiometría 1:2.

De esta manera, la estructura generada forma canales a lo largo del empaquetamiento (Figura 2.28), en la región hidrófila de la bicapa, donde una de las moléculas de agua forma un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxílico O7 y la otra con el oxígeno carbonílico de la cadena lateral.

Los ángulos de torsión de la estructura del anillo D (Tabla. 2.5) corresponden a una conformación β-sobre con unos valores de $\Delta = 26.05^\circ$ $\phi_m = 45.99^\circ$. La cadena lateral adquiere una conformación *tg*tg y, si se toman como referencia los tres nitrógenos del grupo azida y la posición C3, estos se encuentran en una conformación *trans* y con un ángulo C3-N1-N2 de 118.2°. Cabría esperar que los tres nitrógenos se situasen en línea pero como se verá a continuación, existe una interacción dipolo-dipolo en la que están

implicados el nitrógeno en posición central y el oxígeno del carbonilo de la cadena lateral de otro esteroide.

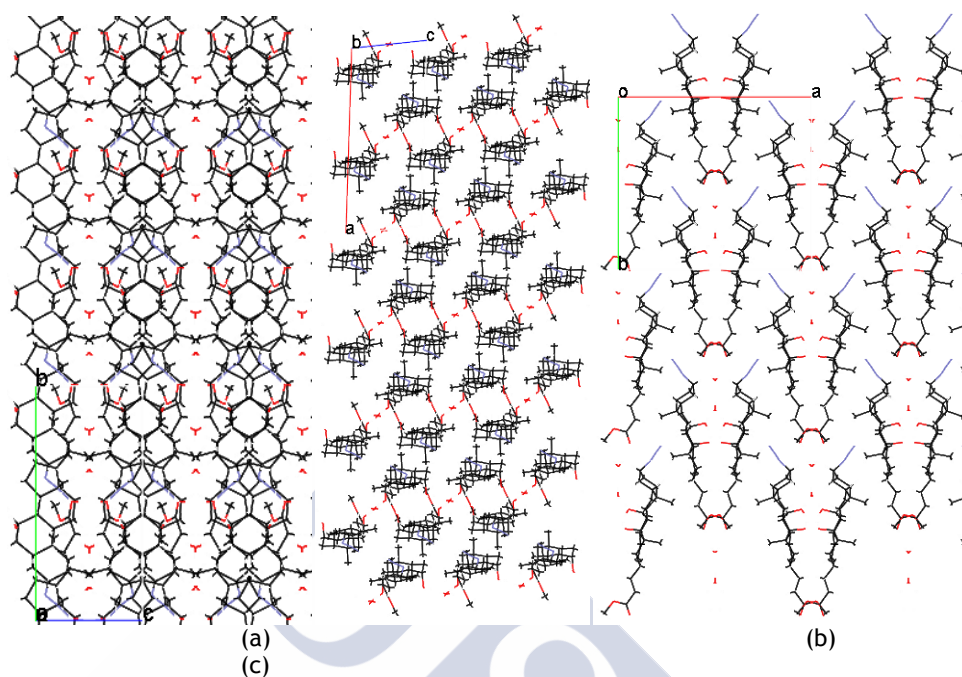


Figura 2.27. Empaquetamiento del cristal del derivado C-azida visto a lo largo de los tres ejes *a*, *b* y *c*.

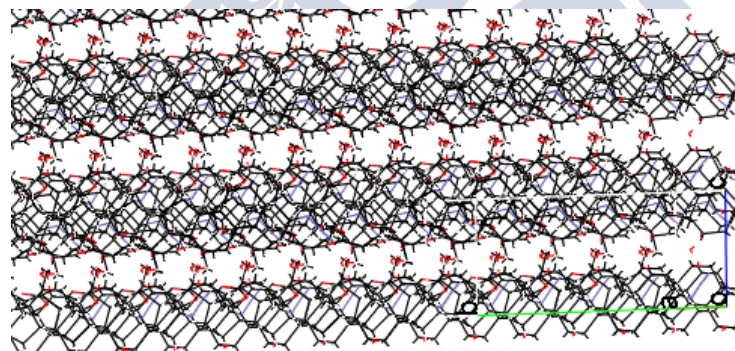


Figura 2.28. Vista del cristal del C-azida mostrando los canales donde se emplazan las moléculas de agua.

Tabla 2.5.
Valores de los ángulos de torsión más importantes del éster del C-azida.

Ángulo de torsión	φ (°)
C17-C13-C14-C15 $\equiv\varphi_0$	44.81
C13-C14-C15-C16 $\equiv\varphi_4$	-30.17
C14-C15-C16-C17 $\equiv\varphi_3$	3.52
C15-C16-C17-C13 $\equiv\varphi_2$	24.08
C16-C17-C13-C14 $\equiv\varphi_1$	-41.52
C13-C17-C20-C22	-179.10
C17-C20-C22-C23	-170.11
C20-C22-C23-C24	177.93
C22-C23-C24-O24a	21.04
C3-N1-N2-N3	-175.69

Al estudiar las interacciones que originan esta estructura cristalina resaltan algunas peculiaridades que cabe destacar. Cada molécula se une a otras dos en un plano superior mediante enlaces de hidrógeno, mediante los grupos hidroxilo en posiciones 7 y 12, por la cara α (Figura 2.29 y Tabla 2.6). Esto es muy común en este tipo de compuestos pero esta estructura se expande gracias a la interacción que se produce entre el nitrógeno central del grupo azida y el oxígeno carbonílico de la cadena lateral con lo que se logra que cada molécula interactúe con cuatro moléculas de su entorno. Esta interacción distorsiona el ángulo natural de la azida desde 180° hasta 171.7° . En total cada molécula de esteroide cuenta con 5 enlaces de hidrógeno y dos interacciones O-N.



Figura 2.29. Vista de la red de enlaces de hidrógeno (izquierda) y de la interacción del carbonilo de la posición 24 con el nitrógeno intermedio de la azida (derecha) en el cristal de C-azida.

Cuando se consideran las interacciones con el huésped surge otra peculiaridad. Los dos OH de la molécula, junto con una molécula de agua, forman un ciclo de enlaces de hidrógeno alrededor de un eje binario cristalográfico en el que los hidrógenos están desordenados al 50% en dos posiciones. Se puede decir que en el cristal se alternan al 50% los ciclos en los que los hidrógenos están dirigidos en un sentido o en el opuesto. Este desorden se representa en la Figura 2.30.

Tabla 2.6

Parámetros de los enlaces de hidrógeno observados en el cristal del diéster del C-azida
*Interacción dipolo-dipolo.

D-H...A	d(D...A) (Å)	<DHA (°)
O(7)-H...O(12)	2.769	157.52
2x OH(1)-H...O(7)	2.810	164.16
O(12)-H...O(12)	2.855	173.08
OH(2)-H...O(26b)	2.876	164.19
OH(2)-H...OH(1)	2.786	180.00
O(26b)...N(2) *	2.973	

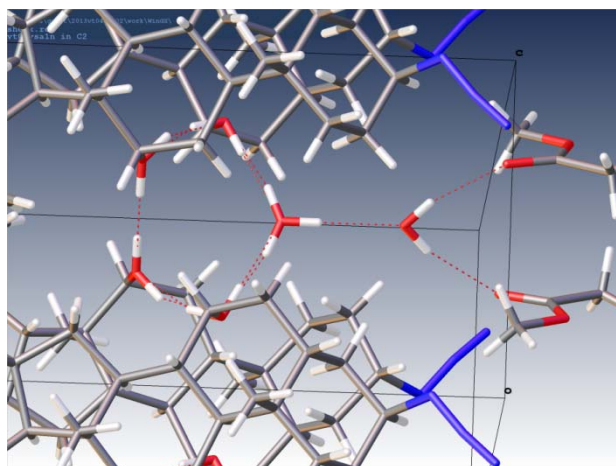


Fig.2.30. Vista del ciclo de enlaces de hidrógeno en el cristal entre C-azida y las dos moléculas de agua.

2.2.2 Monoderivado Colato-dietilfosfato, amC-dietilfosfato.

Para la formación del enlace amida, que unirá las diferentes partes de la estructura molecular final, se emplea un activador de ácidos carboxílicos, el dietilcianofosfato (DEPC). En presencia de exceso del amino derivado, esta molécula es capaz de reaccionar con el átomo de nitrógeno para formar un enlace estable P-N. Como subproducto de esta reacción se obtiene un residuo biliar esterificado que está unido a través de la posición C3 (β) al DEPC, y al que se ha denominado *amC-dietilfosfato* (Figura 2.31). Los resultados del análisis de los cristales de este derivado de ácido cólico en forma de éster, obtenidos mediante dispersión de rayos X, se muestran a continuación.

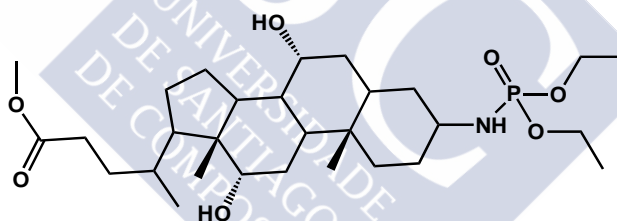


Figura 2.31. Estructura del éster derivado de ácido cólico *amC-dietilfosfato*.

El cristal, recristalizado en metanol/agua, pertenece al sistema ortorrómbico $P2_12_12_1$ mientras que el obtenido en DMSO pertenece al sistema monoclinico $P2_1$. En ambos casos el compuesto cristaliza con una molécula de disolvente (estequiometría 1:1). Los parámetros de las celdas se recogen en la Tabla 2.7.

La Figura 2.32 muestra las vistas a lo largo de los ejes cristalográficos a , b y c del empaquetamiento cuando el huésped es agua. La disposición del compuesto en la red cristalina no origina estructura de bicapa pero presenta unos huecos en los que se incluye el huésped. La Figura 2.33 muestra las vistas a lo largo de los ejes cristalográficos a , b y c del empaquetamiento cuando el huésped es DMSO. En este caso tampoco hay una estructura de bicapa propiamente dicha, aunque se forman capas como muestra la vista a lo largo del eje c .

La estructura generada con agua como huésped muestra una disposición en zigzag del *amC-dietilfosfato* que a lo largo de una dirección determinada forma ondas similares a las de estirar una hélice (Figura 2.34). Por otra parte, cuando el huésped es el DMSO, muestra una disposición alineada del compuesto pero alternando la posición de las caras α y β . Esto produce que cuando se busca la misma dirección en la que se observan las ondas

en la estructura cristalina con huésped de agua, se observen capas alineadas (Figura 2.35).

Tabla 2.7

Parámetros de celda de cristales del éster *amC*-dietilfosfato, recristalizado en metanol/agua y en DMSO.

Formula Empírica	$C_{29}H_{52}NO_7P \cdot H_2O$	$C_{29}H_{52}NO_7P \cdot C_2H_6OS$
Peso Molecular	575.70	635.81
Temperatura (K)	100(2)	120(2)
Longitud de Onda (Å)	0.71073	0.71069
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico, $P2_12_12_1$	Monoclínico, $P2_1$
a (Å)	7.6084(5)	13.850(5)
b (Å)	16.4239(10)	7.889(5)
c (Å)	23.6781(13)	15.309(5)
α (°)	90	90
β (°)	90	93.225(5)
γ (°)	90	90
Volumen (Å ³)	2958.8(3)	1670.1(13)
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.292	2, 1.264
coeficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.143	0.193
F (000)	1256	692
Tamaño Cristal (mm ³)	0.73x0.22x0.08	0.46x0.26x0.04
Intervalo θ (datos) (°)	2.48-25.85	1.93-26.37
Intervalo de índices	0 ≤ h ≤ 9 0 ≤ k ≤ 20 0 ≤ l ≤ 28	-17 ≤ h ≤ 17 -9 ≤ k ≤ 9 0 ≤ l ≤ 19
Datos/restricciones/parámetros	3192/2/379	6814/6/396
Grado de ajuste en F ²	1.065	1.117
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0302, wR2 = 0.0767	R1 = 0.0589, wR2 = 0.1455
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0371, wR2 = 0.0825	R1 = 0.0888, wR2 = 0.1592

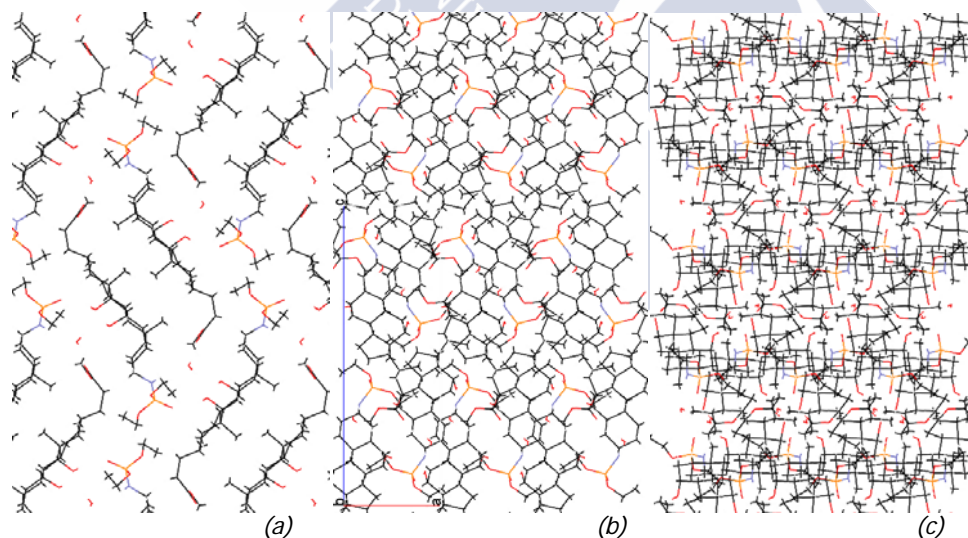


Figura 2.32. Empaquetamiento del cristal obtenido en metanol/agua visto a lo largo del eje *a*, *b* y *c* del éster del *amC*-dietilfosfato.

Si se centra la atención sobre la estructura que adquiere el resto de esteroide, el análisis de los ángulos de torsión de la conformación del anillo D, conduce en ambos casos (Tabla 2.8), a una disposición en β -sobre ($\Delta = 11.60^\circ$ y $\phi_m = 46^\circ$ para el cristal en metanol/agua y $\Delta = 12.34^\circ$ y $\phi_m = 49.72^\circ$ para el cristal en DMSO). Asimismo, en los dos casos, la cadena lateral adquiere una conformación *tg*gg.

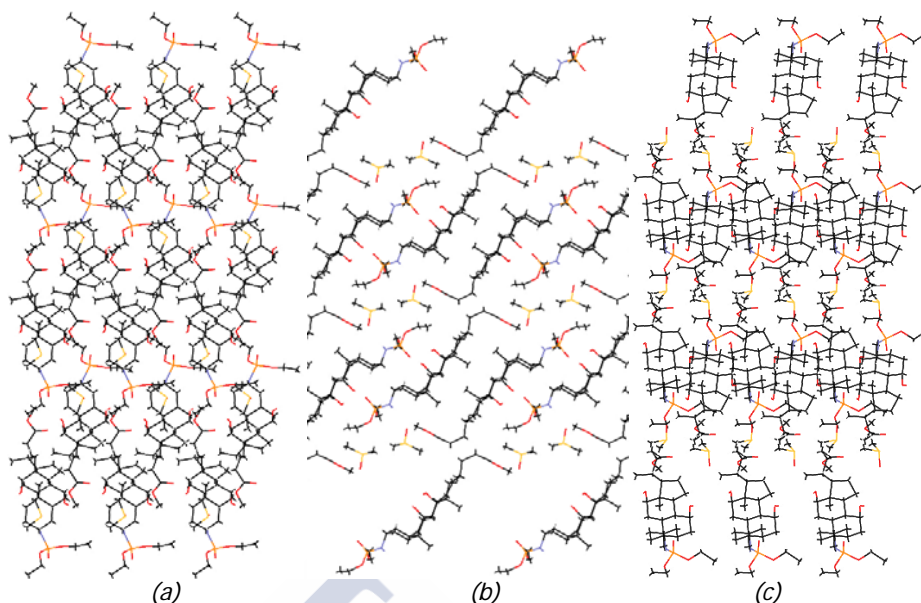


Figura 2.33. Empaquetamiento del cristal del *amC*-diethylfosfato obtenido en DMSO visto a lo largo del eje *a*, *b* y *c*.

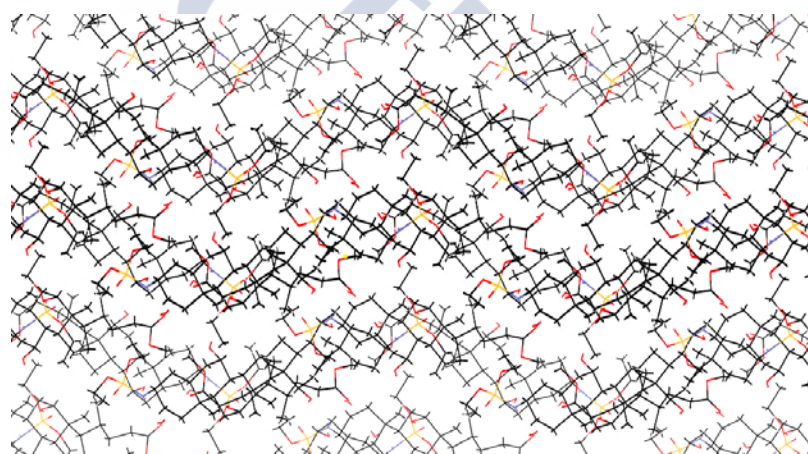


Figura 2.34. Vista de las ondas que forma el cristal recrystallizado en metanol/agua del *amC*-diethylfosfato cuando se observa desde una determinada dirección.

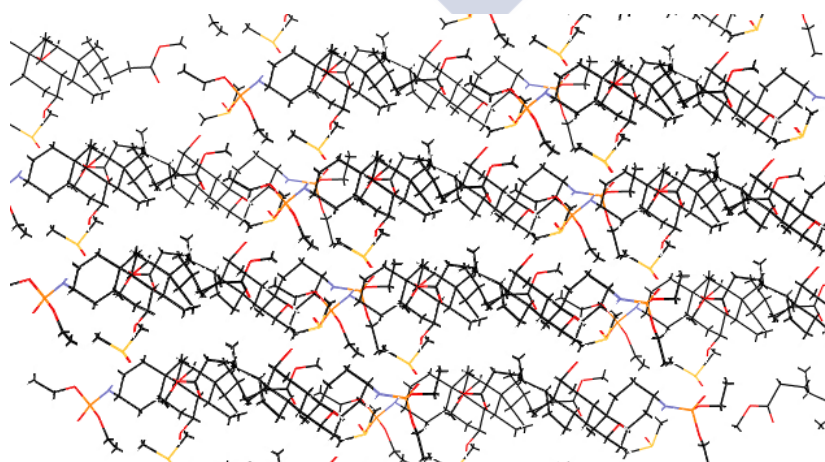


Figura 2.35. Vista de las capas que forma el cristal recrystallizado en DMSO del *amC*-diethylfosfato cuando se observa desde una determinada dirección.

Tabla 2.8.

Valores de los ángulos de torsión más importantes del éster del *amC-dietilfosfato*.

Ángulo de torsión φ (°)	Cristal en metanol	Cristal en DMSO
C17-C13-C14-C15= φ_0	45.77	49.44
C13-C14-C15-C16= φ_4	-34.13	-36.72
C14-C15-C16-C17= φ_3	9.10	9.41
C15-C16-C17-C13= φ_2	18.84	20.60
C16-C17-C13-C14= φ_1	-38.70	-41.99
C13-C17-C20-C22	-178.96	178.29
C17-C20-C22-C23	-167.68	160.96
C20-C22-C23-C24	65.08	71.42
C22-C23-C24-O24a	44.60	-123.22
C3-N25-P-O27	-175.56	-19.90

En la red de enlaces de hidrógeno del cristal en metanol está presente el huésped que actúa como puente de unión que propaga la estructura. Cada molécula de agua interactúa con tres esteroides (*Figura 2.36*) y solo uno de los enlaces de hidrógeno es directo entre esteroides: el que se produce entre el oxígeno unido al fósforo y el grupo hidroxilo de la posición 12. Mientras el grupo hidroxilo de la posición 7 no forma enlaces de hidrógeno, el de la posición 12 lo hace de forma cíclica con otra molécula de esteroide y una de agua siguiendo el patrón O(12)-H \cdots O=P-N-H \cdots O(H)-H \cdots O(12).

Cada molécula de agua interactúa con tres moléculas a través del nitrógeno del enlace amida, el carbonilo terminal de la cadena lateral y con el hidroxilo de la posición 12. La *Tabla 2.9* recoge los parámetros de los enlaces de hidrógeno que forman la red en ambos cristales.

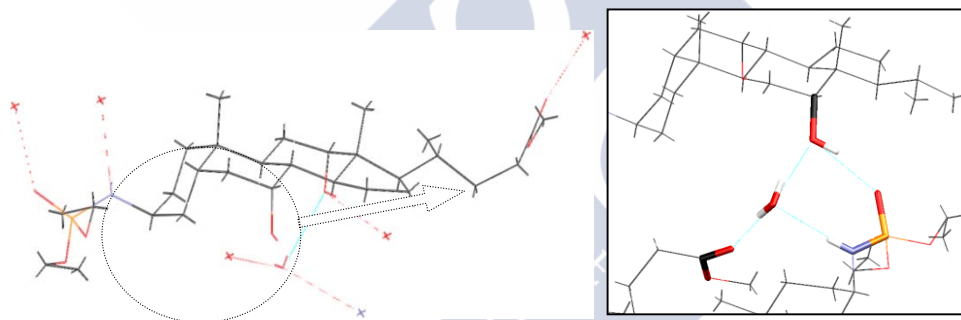


Figura 2.36. Red de enlaces de hidrógeno del *amC-dietilfosfato* con agua y vista del sistema cíclico de enlaces de hidrógeno entorno al grupo hidroxilo de la posición 12.

Tabla 2.9.

Valores de los ángulos y distancias de los enlaces de hidrógeno que forma la red del diéster del *amC-dietilfosfato* en ambos cristales.

D-H \cdots A	d(D \cdots A) (Å)	<DHA (°)
(agua ^I) O-H \cdots O(12)	2.777	166.35
(agua ^{II}) O-H \cdots O(24b)	2.838	171.94
RN-H \cdots O(agua ^{III})	3.053	171.01
O(12)-H \cdots O=P(EtO) ₂ R ^I	2.749	161.20
O(12)-H... O(RDEP) ^I	2.775	165.11
O(7)-H... O(RDEP) ^{II}	2.781	168.76
RN-H... DMSO	2.865	167.09

Sin embargo, en el cristal con DMSO la red de enlaces de hidrógeno es distinta con una única unión entre hospedador y huésped, por lo que no actúa como puente. Esta unión es a través del átomo de nitrógeno hacia el oxígeno del DMSO y con la misma orientación que los grupos metilo, casi el línea a éstos (distancias al plano C6-C13-C18 -

C19: del N = 0.023 Å y del O = 0.061 Å). Cada esteroide interacciona, vía el oxígeno unido al fosforo, con otros dos por medio de los hidroxilos en posición 7 y 12 (Figura 2.37).

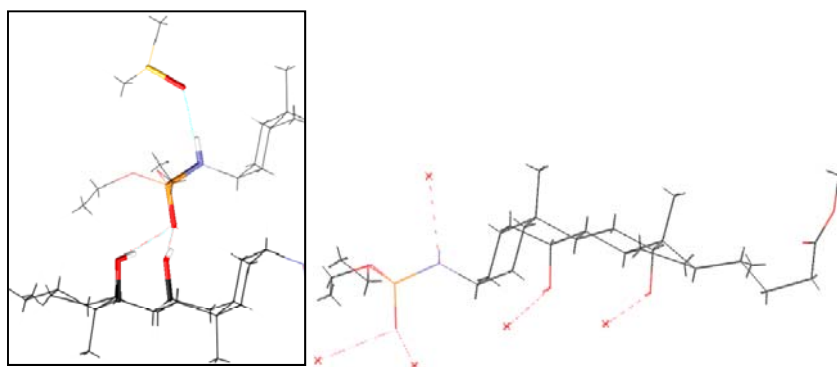


Figura 2.37. Red de enlaces de hidrógeno del compuesto *amC-dietilfosfato* con DMSO y vista de enlaces de hidrógeno en torno al fosforo y nitrógeno, y las posiciones 7 y 12 del esteroide.

Esto implica que la estructura se propaga solo en dos dimensiones a través de los enlaces de hidrógeno (Figura 2.38). Por ello, las interacciones de corto alcance juegan un papel importante para que se propague la estructura en las tres dimensiones.

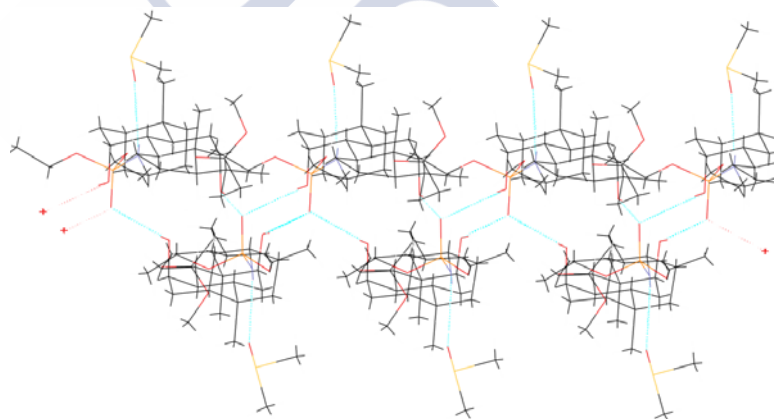


Figura 2.38. Red de enlaces de hidrógeno del compuesto *amC-dietilfosfato* con DMSO.

2.2.3 Monoderivado *amC*-aminoisoftálico.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el cristal del derivado del ácido cólico con los grupos ácidos protegidos en forma de diéster, en el que el residuo biliar está unido a través de la posición C3 (β) al ácido 5-aminoisoftálico y al que se ha denominado *amC*-aminoisoftálico (Figura 2.39).

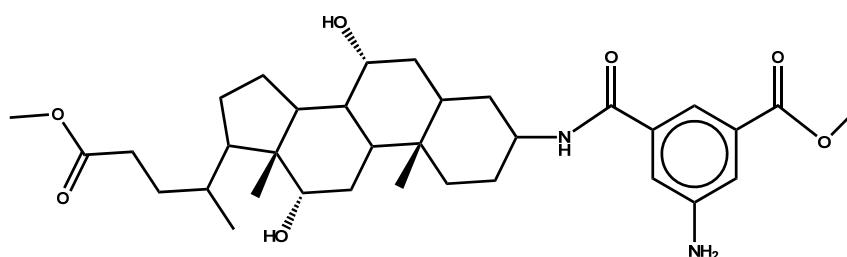


Figura 2.39. Estructura del *amC*-aminoisoftálico en forma de diéster.

El cristal, que se obtuvo gracias a la hidrólisis del enlace amida cuando se calienta la disolución para mejorar la solubilidad del dímero *amC*₂-aminoisofáltico, fue recristalizado en metanol/agua. Cristaliza con una molécula de agua y pertenece al sistema monoclinico P2₁. Los parámetros de la celda se recogen en la *Tabla 2.10*.

Tabla 2.10.
Parámetros de celda del cristal del *amC*-aminoisofáltico, recristalizado en metanol/agua.

Formula Empírica	C ₃₄ H ₅₀ N ₂ O ₇	Volumen (Å ³)	3155.68(10)
Peso Molecular	616.78	Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.298
Temperatura (K)	100(2)	Coefficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.092
Longitud de Onda (Å)	0.7107	F (000)	1336
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclinico, P2 ₁	Tamaño Cristal (mm ³)	0.21x0.1x0.05
a (Å)	13,608(3)	Intervalo θ (datos) (°)	1.35-26.81
b (Å)	7,704(10)	Intervalo de índices	-17≤h≤17 -9≤k≤9 -38≤l≤38
c (Å)	30,284(5)	Datos/restricciones/parámetros	7250/3/845
α (°)	90	Grado de ajuste en F ²	1.011
β (°)	96,345(10)	Índices R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0.0518, wR2 = 0.0978
γ (°)	90	Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1016, wR2 = 0.1157

La *Figura 2.40* muestra el empaquetamiento visto a lo largo de los tres ejes cristalográficos. La disposición del compuesto en la red cristalina origina una estructura de bicapa (*Figura 2.40C*). La capa hidrófoba está formada por la cara β del ácido biliar dejando los anillos aromáticos y los grupos más polares en la región hidrófila donde al mismo tiempo se incluye el huésped (agua).

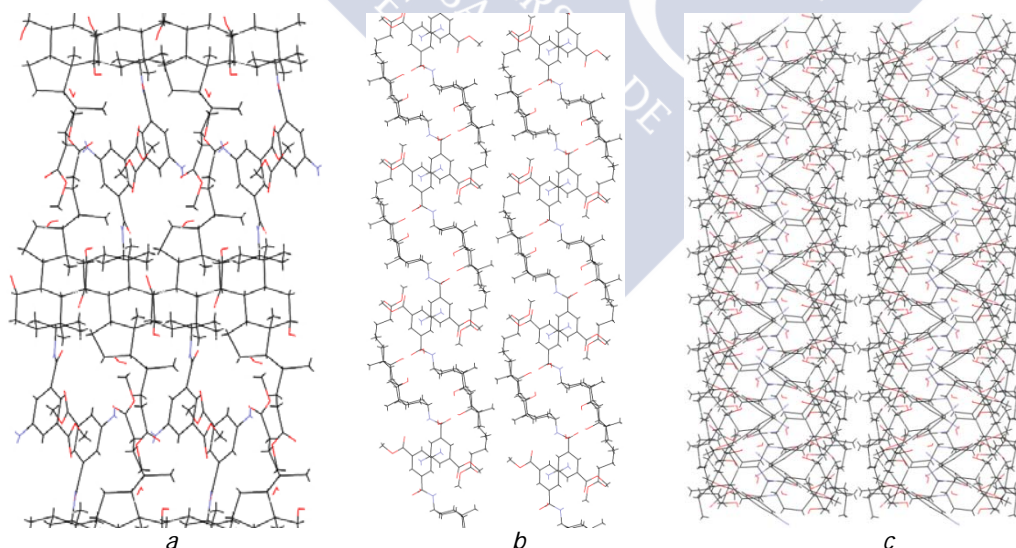


Fig.2.40. Empaquetamiento del cristal visto a lo largo de los ejes *a*, *b* y *c* del diéster del *amC*-aminoisofáltico.

La estructura generada por *amC*-aminoisofáltico muestra que, en vez de generar grandes huecos en el empaquetamiento en la región hidrófila de la bicapa, las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo O12 de cada esteroide situándose de forma intercalada entre los ácidos biliares. Dado que el cristal está

constituido por dos tipos de simetría molecular existen dos tipos de posición para el huésped (*Figura 2.41*), como se mostrará más adelante.

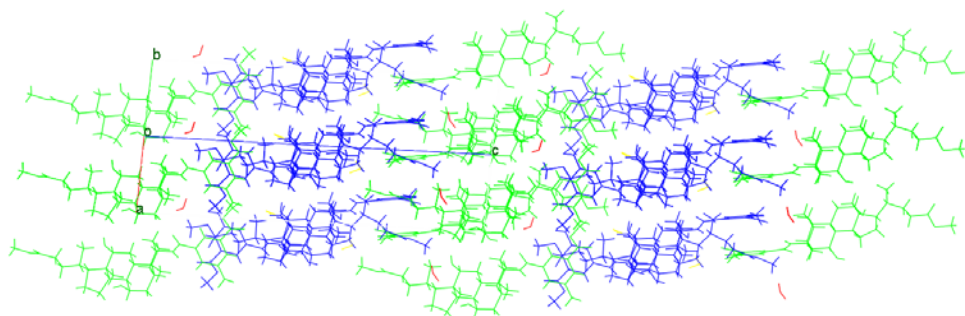


Figura 2.41. Vista del cristal del diéster *amC*-aminoisoftálico mostrando la equivalencia simétrica de las moléculas del compuesto (verde y azul) y del agua (rojo y amarillo).

Al centrar la atención sobre la disposición que cada molécula presente en el cristal, se observa la existencia de interacciones entre los anillos aromáticos del grupo sustituyente derivado del ácido 5-aminoisoftálico. Las moléculas de cada par se sitúan de forma que el ángulo formado por los planos que contienen a los anillos aromáticos está muy próximo a 0° (*Figura 2.42*). Del mismo modo, el ángulo entre los planos del esqueleto del esteroide (definido por los átomos de carbono de los anillos del esteroide B, C y D y el C20 de la cadena lateral)¹²² de las dos moléculas resulta en una disposición casi paralela. Para diferenciar ambas simetrías se denominará molécula “A” a la destacada en verde y molécula “B” a la azul.

Los ángulos entre el plano del esqueleto del esteroide y el anillo aromático de cada molécula son ligeramente distintos, 52.14° y 59.67° , lo que muestra sus diferencias estructurales (*Figura 2.43*). Esto supondrá valores de los ángulos de torsión y otros parámetros para cada tipo de simetría.

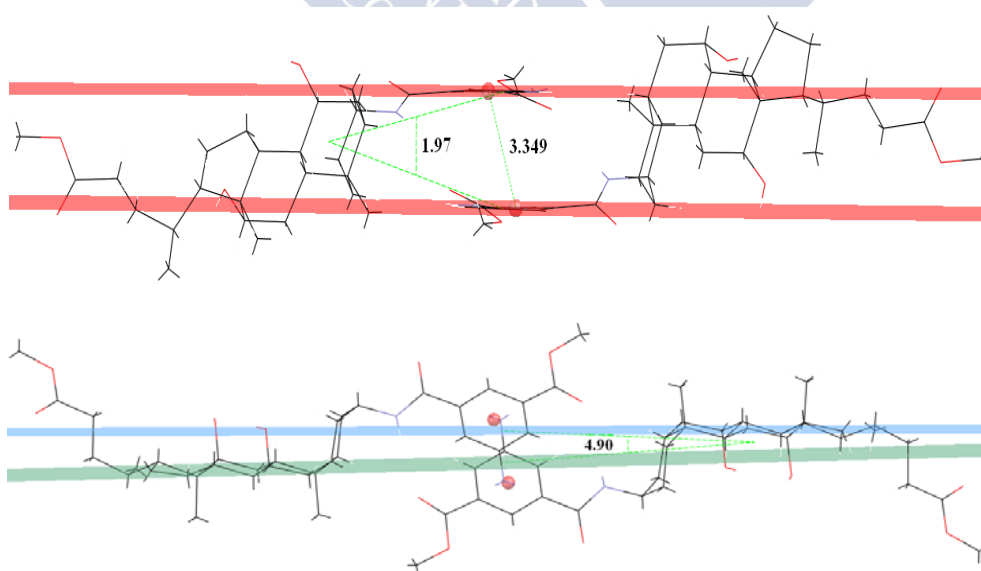


Figura 2.42. Ángulo entre los planos de los residuos aromáticos (arriba) y entre los planos del esqueleto de los residuos de ácido cólico de dos moléculas del diéster del *amC*-aminoisoftálico simétricamente distintas que interactúan a través de los anillos aromáticos (abajo). Los planos que contienen los esqueletos de esteroide se representan en azul y verde para diferenciar las simetrías. La posición de los centroides de los anillos aromáticos se indica con los círculos en rojo, y la distancia entre ellos se muestra en Å.

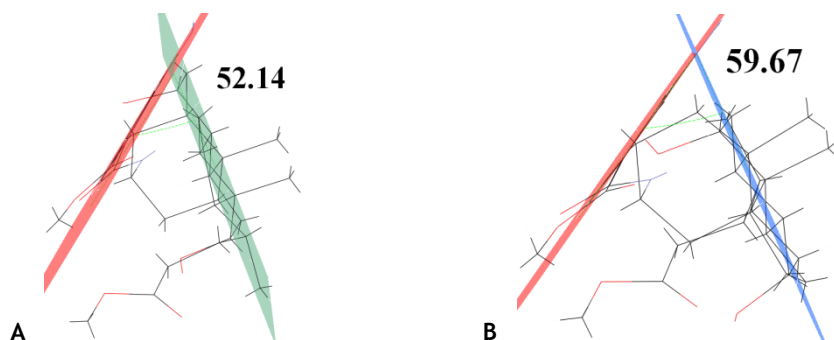


Figura 2.43. Ángulo formado por el residuo aromático y el esqueleto del esteroide de las dos moléculas del *amC*-aminoisofáltico simétricamente distintas. El color verde se corresponde con la molécula “A” y color azul con la denominada “B”.

Tabla 2.11

Valores de los ángulos de torsión más importantes del diéster del *amC*-aminoisofáltico.

Ángulo de torsión	A φ (°)	B φ (°)
C17-C13-C14-C15= φ_0	46.08	47.56
C13-C14-C15-C16= φ_4	-33.39	-37.82
C14-C15-C16-C17= φ_3	7.29	13.27
C15-C16-C17-C13= φ_2	20.83	15.67
C16-C17-C13-C14= φ_1	-40.28	-38.46
C13-C17-C20-C22	-178.99	178.08
C17-C20-C22-C23	57.67	58.61
C20-C22-C23-C24	151.94	174.92
C22-C23-C24-O24a	147.83	-157.78
C3-N25-C26-C27	170.36	-173.16

Del análisis de los ángulos de torsión se deduce que la estructura del anillo D es muy similar en las dos moléculas de esteroide participantes en el cristal (*Tabla 2.11*) y las mayores diferencias se encuentran en la disposición de las cadenas laterales. La conformación del anillo D para la molécula A está más próxima a media silla que en el caso de la molécula B, que está más próxima a β -sobre ($\Delta = 16.49^\circ$ y $\phi_m = -46.56^\circ$ para la A, y $\Delta = 2.38^\circ$ y $\phi_m = -47.57^\circ$ para la molécula B). Las cadenas laterales adquieren una conformación *tggg* en el caso de la simetría A y *tgtg* en el caso de la simetría B. La sustitución en el C3 se encuentra muy próxima a una conformación *trans* o estirada en ambos casos.

Otra característica destacable de esta estructura cristalina es que cada sustituyente (C)₃-aminoisofáltico se sitúa participando en ambos lados de la bicapa, cuyo espesor es 13.608 Å. En el margen superior derecho de la *Figura 2.44* la bicapa incompleta muestra el emplazamiento del compuesto con la cara β a un lado, cruzando la región hidrófila y ubica los metilos del grupo éster del ácido 5-aminoisofáltico en el otro extremo de la bicapa.

Cada molécula se une mediante enlaces de hidrógeno por la cara α a otras dos en un plano superior. Cada molécula se une a otras simétricamente equivalentes y en direcciones opuestas respecto a la de referencia (*Figura 2.45*). La red de enlaces de hidrógeno establecida es sencilla ya que solo intervienen las posiciones O(7)-H y O(12)-H de los grupos hidroxilo y el átomo de oxígeno del grupo amida que enlaza el sustituyente al esteroide. No participan en la red ni el grupo éster ni la amina de dicho grupo.

Como cabría esperar, existen pequeñas diferencias entre las redes de enlaces de hidrógeno de cada simetría (*Tabla 2.12*). Para la simetría A la distancia donante-aceptor

varía en el intervalo 2.786-2.885Å, y para la simetría B entre 2.861-2.957Å. La molécula de agua se emplaza sobre la cara α del esteroide, uniéndose a este por la posición O(12) lo que conlleva a dos tipos de posiciones. La distancia del enlace de hidrógeno varía de 2.9 a 2.7 si se pasa de simetría A a B, y el ángulo aumenta de 114 a 158°.

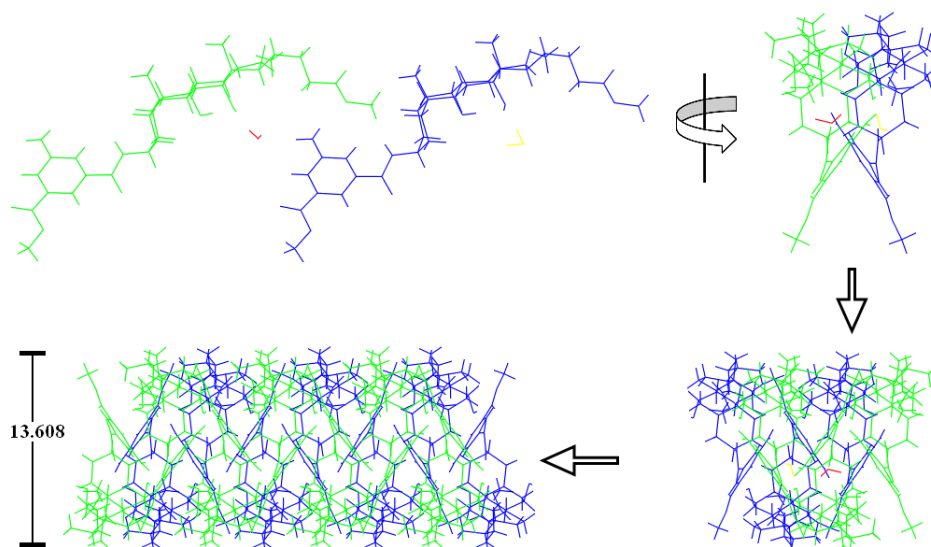


Figura 2.44. Esquema de formación de la estructura de bicapa en el cristal de *amC*-aminoisofáltico (en color verde y azul se representan las dos simetrías moleculares presentes en el cristal). Distancia en Å.

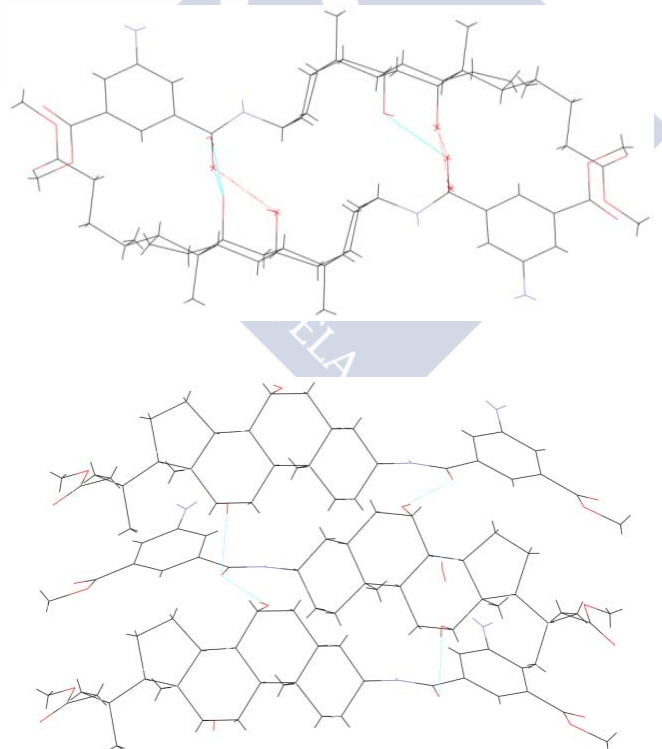


Figura 2.45. Vistas de la red de enlaces de hidrógeno en el cristal del diéster del *amC*-aminoisofáltico.

Desde el punto de vista de las interacciones intermoleculares existentes en la red cristalina originada, la interacción entre los anillos aromáticos de dos moléculas vecinas

juega un papel importante. Tal interacción, que tiene lugar entre moléculas simétricamente no equivalentes, es la responsable de que se extienda la estructura ya que, como se ha visto, la red de enlaces de hidrógeno se establece entre moléculas simétricamente equivalentes. Al analizar esta interacción con más detalle, se observa que los anillos aromáticos se encuentran desplazados entre sí, dando origen a interacciones del tipo π - π . Esto se explica mediante el modelo de Hunter-Sanders (Figura 2.46) que considera los compuestos aromáticos compuestos de un esqueleto σ (cargado positivamente) intercalado entre la nube π (cargada negativamente).¹²³ Según este modelo, las interacciones resultantes de una orientación paralela de los anillos aromáticos y en línea, serían repulsivas, mientras que si se desplazan lo suficiente se producen interacciones atractivas. Esta disposición es la observada en la estructura del grafito (Figura 2.47). Los anillos hexagonales del grafito se disponen de forma que el centroide de cada uno se sitúa encima de un átomo de carbono de un anillo en la siguiente capa

Tabla 2.12
Parámetros de los enlaces de hidrógeno de ambas simetrías observados en el cristal del diéster del *amC*-aminoisoftálico.

D-H...A	d(D...A) (Å)	<DHA (°)
O(agua) ^A -H...O(12)	2.949	114
O(7) ^A -H...O(26)	2.885	154
O(12) ^A -H...O(26)	2.786	160
O(agua) ^B -H...O(12)	2.753	158
O(7) ^B -H...O(26)	2.957	161
O(12) ^B -H...O(26)	2.861	160



Figura 2.46. Esquema del modelo de Hunter-Sanders¹²³ con el tipo de interacciones producidas.

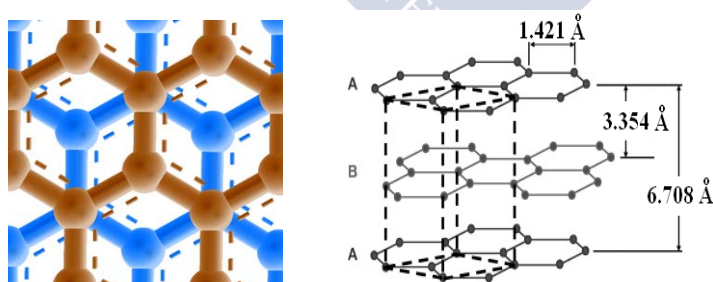


Figura 2.47. Estructura cristalina hexagonal del grafito y parámetros de la estructura cristalina.

Para el compuesto que nos ocupa, un anillo aromático se desplaza lateralmente de forma casi paralela respecto a otro anillo, favoreciendo que se produzca la interacción entre parejas de moléculas de distinta simetría (Figura 2.48a). Si se comparan los parámetros obtenidos del cristal *amC*-aminoisoftálico con los del grafito, se observa que las distancias entre los anillos aromáticos es de 3.183 Å y 3.354 Å, respectivamente, valores perfectamente compatibles entre sí, lo que avala la existencia de una interacción π - π .

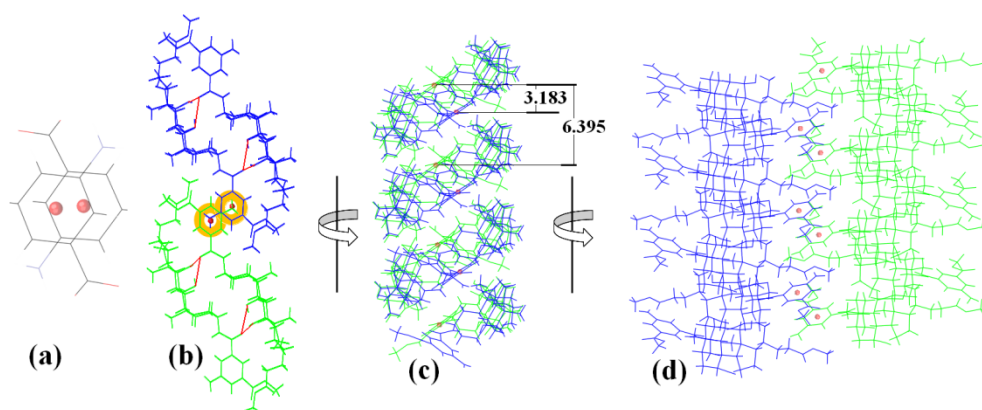


Figura 2.48. (a) Vista perpendicular al plano que contiene el anillo aromático de una de las moléculas con interacción π - π . (b) Ubicación de los enlaces de hidrógeno respecto de la simetría molecular y las interacciones π - π . (c) y (d) Vistas de la distribución en la bicapa de las parejas de anillos aromáticos. Distancias en Å.

Las interacciones π - π desarrollan un papel decisivo en la arquitectura cristalina ya que son las responsables de la cohesión entre las moléculas de distinta simetría que forman una columna (*Figura 2.48d*). Se podría considerar que cada pareja de moléculas que interactúan a través de sus anillos aromáticos se comporta como un dímero en el que los dos restos de esteroide están unidos mediante un puente covalente (*vide infra*). Como se mostrará más adelante, esta disposición de los restos de esteroide en lados opuestos de la bicapa también es característica del cristal del dímero $(amC)_2$ -succínico. La interacción de los anillos confiere estabilidad y, a priori, se podría conseguir mejorar las propiedades físicas relativas a su estabilidad mediante el aumento de la aromaticidad de una estructura molecular.¹²⁴

2.2.4 Mono derivado C-tereftálico.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los cristales del derivado de ácido cólico, en el que residuo biliar está unido a través de la posición C3 (β) por enlaces éster al ácido tereftálico, y al que se ha denominado C-tereftálico (*Figura 2.49*). Aun cuando se buscaba la cristalización del diéster del dímero C_2 -tereftálico, se encontró este monoderivado fruto de la hidrólisis del enlace éster cuando se calienta la disolución para mejorar la solubilidad. Los cristales obtenidos en una mezcla de acetato de etilo/metanol y en metanol/acetona/agua son muy similares y las diferencias en los valores de los parámetros estructurales de la celda unidad aparecen a partir del segundo decimal. El C-tereftálico cristaliza en el sistema monoclinico $P2_1$ y los parámetros de las celdas se recogen en la *Tabla 2.13* La *Figura 2.50* el empaquetamiento visto a lo largo de los tres ejes cristalográficos.

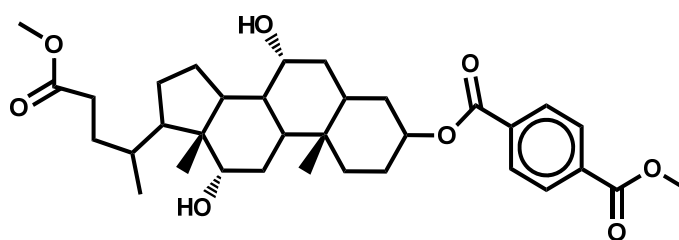


Figura 2.49. Estructura del C-tereftálico en forma de diéster.

Tabla 2.13.

Parámetros del diéster del C-tereftálico recristalizado en acetato de etilo/metanol (Cristal 1) y en metanol/acetona/agua (Cristal 2)

Formula Empírica	Cristal 1	Cristal 2
	$C_{34}H_{48}O_8$	$C_{34}H_{48}O_8$
Peso Molecular	584.72	584.72
Temperatura (K)	120(2)	100(2)
Longitud de Onda (Å)	1.5418	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $P2_1$	Monoclínico, $P2_1$
a (Å)	10.334(3)	10.3132(4)
b (Å)	7.6197(2)	7.6139(2)
c (Å)	19.4631(5)	19.4225(7)
α (°)	90	90
β (°)	101.26(10)	101.254(2)
γ (°)	90	90
Volumen (Å ³)	1503.03(7)	1495.80(9)
Z, densidad calculada (g/cm ³)	2, 1.292	2, 1.298
Coefficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.735	0.09
F (000)	632	632
Tamaño Cristal (mm ³)	0.2x0.15x0.05	0.5x0.5x0.2
Intervalo θ (datos) (°)	0.96-74.50	2.01-28.27
Intervalo de índices	-12 ≤ h ≤ 12 -9 ≤ k ≤ 9 0 ≤ l ≤ 23	-13 ≤ h ≤ 13 0 ≤ k ≤ 10 0 ≤ l ≤ 25
Datos/restricciones/parámetros	5828/1/393	3974/1/392
Grado de ajuste en F^2	1.094	1.081
Índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0424, wR2 = 0.1139	R1 = 0.0453, wR2 = 0.106
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0429, wR2 = 0.1142	R1 = 0.0638, wR2 = 0.0979

La disposición del compuesto en la red cristalina no origina la estructura de bicapa dada la disposición que adquiere el grupo sustituido en posición 3 con respecto al esqueleto del esteroide (*Figura 2.51*). Las capas hidrófobas están interrumpidas por los anillos aromáticos y los grupos éster unidos a éstos, que las atraviesan. No se observa inclusión de ningún huésped y la distancia entre los anillos aromáticos descarta cualquier interacción entre ellos.

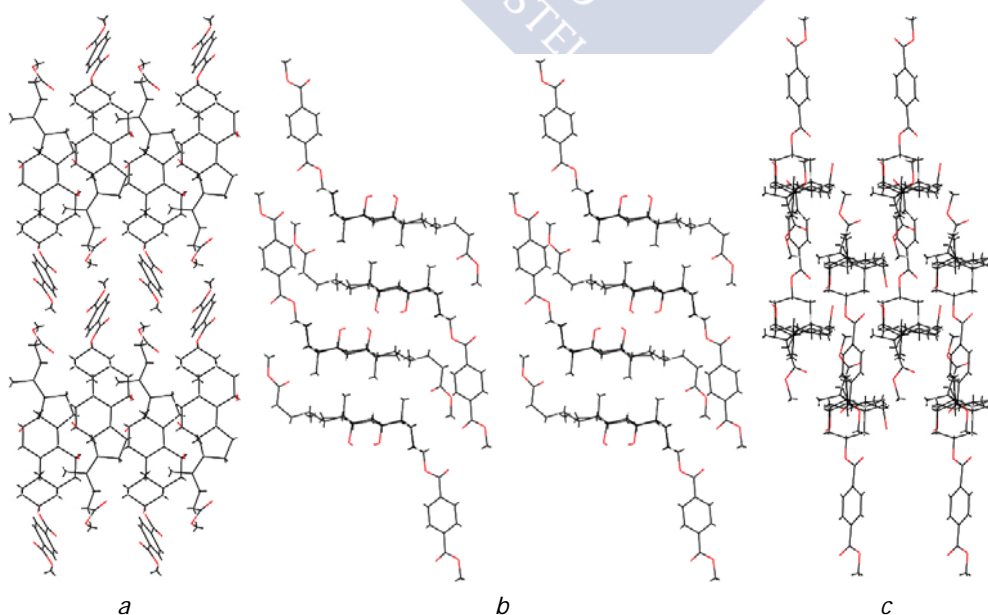


Figura 2.50. Empaquetamiento del cristal 1 del C-tereftálico a lo largo de los ejes *a*, *b* y *c*.

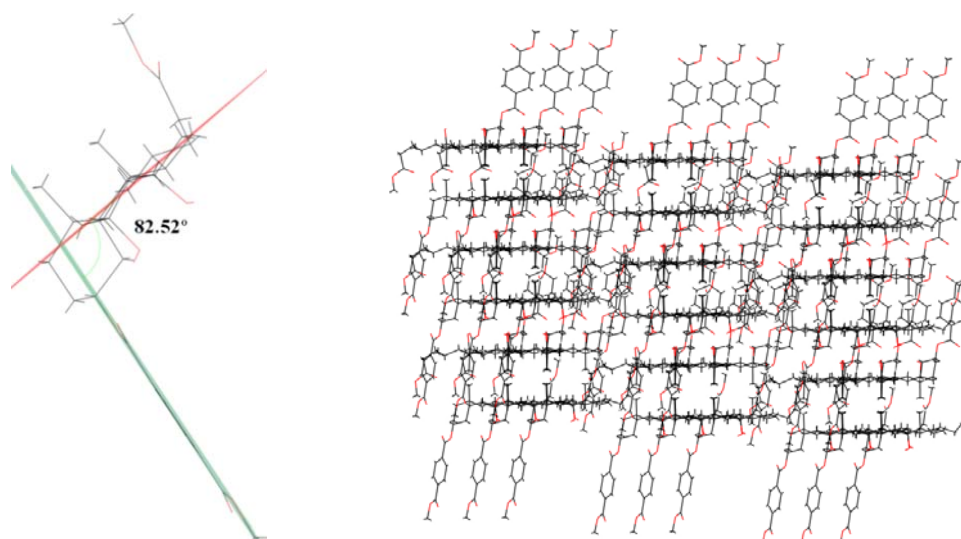


Figura 2.51. Izquierda: Ángulo formado por el plano del esqueleto del esteroide y el plano que contiene al anillo aromático. Derecha: Empaquetamiento (cristal 1) del diéster del C-tereftálico.

El ángulo entre el plano del esqueleto del esteroide (*vide supra*) y el anillo aromático resulta en una disposición próxima a la perpendicularidad, 82.52° (para ambos cristales), que junto con la cadena lateral le confiere una disposición en zigzag.

El análisis de los ángulos de torsión de la conformación del anillo D del esqueleto del esteroide conduce (*Tabla 2.14*) a una disposición más próxima a media silla que a β -sobre ($\Delta = 14.74^\circ$ para ambos cristales y $\phi_m = 45.4^\circ$ para el cristal 1 y 45.7° para el cristal 2). La cadena lateral adquiere una conformación *tggg* y la sustitución en el C3 se encuentra en una conformación *trans* o estirada.

Tabla 2.14
Valores de los ángulos de torsión más importantes del diéster del C-tereftálico.

Ángulo de torsión	ϕ ($^\circ$) (Cry. 1)	ϕ ($^\circ$) (Cry. 2)
C17-C13-C14-C15 $\equiv\phi_0$	45.03	45.40
C13-C14-C15-C16 $\equiv\phi_4$	-32.81	-33.05
C14-C15-C16-C17 $\equiv\phi_3$	7.80	7.92
C15-C16-C17-C13 $\equiv\phi_2$	19.50	19.72
C16-C17-C13-C14 $\equiv\phi_1$	-39.04	-39.25
C13-C17-C20-C22	172.99	172.77
C17-C20-C22-C23	-162.76	-162.61
C20-C22-C23-C24	63.67	63.96
C22-C23-C24-O24a	-167.08	-167.18
C3-N25-C26-C27	178.93	179.01

La red de enlaces de hidrógeno en los cristales del C-tereftálico se reduce únicamente a un enlace entre los grupos hidroxilo de las posiciones 7 y 12 (*Figura 2.52*). Si se tiene en cuenta que la mayoría de los enlaces de hidrógeno de ácidos biliares que se encuentran en la bibliografía se producen entre las posiciones 3-7 y 3-12 resulta un comportamiento peculiar al considerar que se trata de un compuesto derivado del ácido cólico. El ángulo O(7)-H \cdots O(12) es de 155.5° para el cristal 1 y 158.5° para el cristal 2, valores dentro de los recogidos para los enlaces de hidrógeno en los que intervienen grupos hidroxilo de ácidos biliares. Sin embargo, la distancia entre los átomos de oxígeno es relativamente grande (3.053 \AA para el cristal 1 y 3.048 \AA para el 2) cuando se las compara con las distancias de enlace de hidrógeno típicas de estos compuestos que no sobrepasan los 3 \AA (*Figura 2.53*).

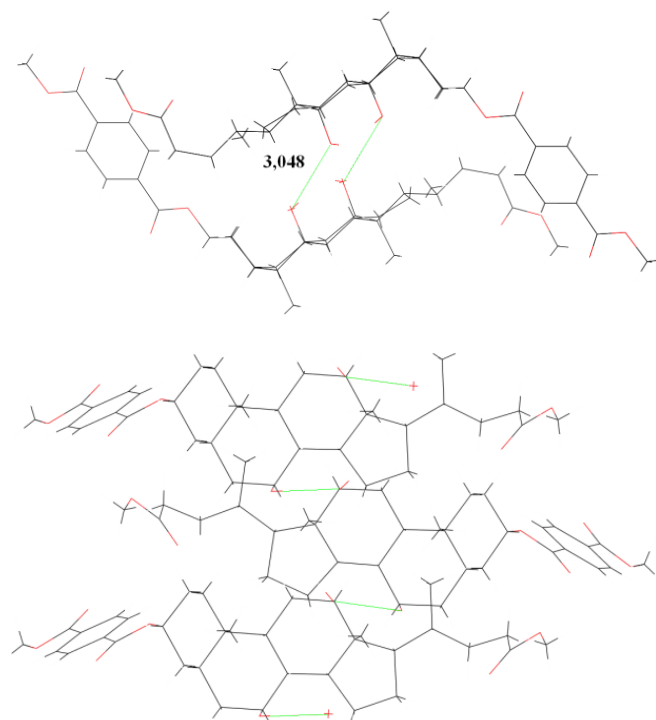


Figura 2.52. Vista de la red de enlaces de hidrógeno a lo largo de los ejes *b* (arriba) y *a* (abajo) del *C-tereftálico*.

Como ya se ha mencionado, no existe interacción π - π entre los anillos aromáticos ya que la distancia más corta entre los centroides de los mismos es de 4.762 Å y ambos anillos forman un ángulo de 64.9°. Sin embargo podría existir una interacción de tipo σ - π entre el hidrógeno aromático (en posición 3 respecto a la posición de unión al resto de esteroide) dado que la distancia es de 2.972 Å con el otro anillo. Un oxígeno de un grupo éster de otra molécula que se sitúa relativamente cerca, a 3.409 Å para cristal 1 y 3.401 Å para cristal 2, podría relacionarse con una interacción entre la nube aromática del anillo con los electrones no enlazantes del átomo de oxígeno (*Figura 2.54 arriba*).

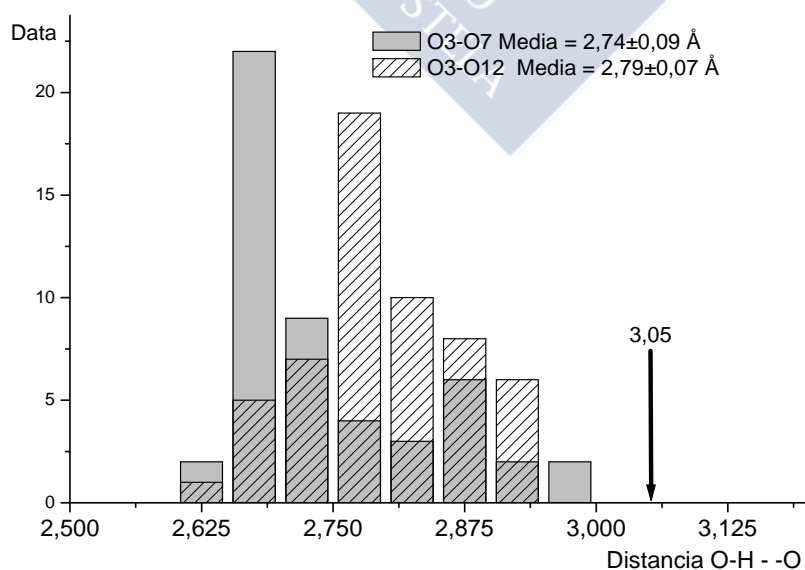


Figura 2.53. Representación de la dispersión de distancias de enlace de hidrógeno de ácidos biliares, entre las posiciones O3-O7 y O3-O12 recogidos en la bibliografía.

Los oxígenos de los grupos carbonilo unidos al anillo aromático de dos moléculas, esto es, el más cercano a la posición 3 del esteroide frente al más alejado (posición meta), pueden interactuar de forma dipolo-dipolo ya que están a una distancia de 3.525 Å (*Figura 2.54 arriba*). Todas estas interacciones de corto alcance (*Figura 2.54 abajo*) permiten la consolidación de una estructura cristalina estable. Esto también se manifiesta en la sencillez con que se obtienen cristales de este compuesto en comparación con otros derivados que, aun habiendo probado con numerosos disolventes, no se han obtenido cristales de calidad suficiente para su resolución por difracción de rayos X.

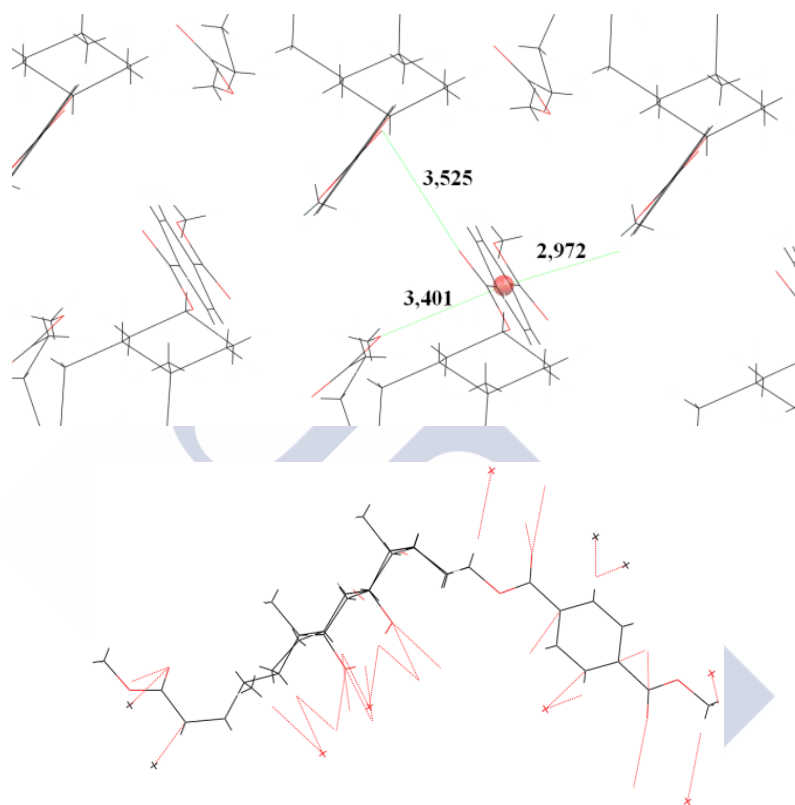


Figura 2.54. Arriba: Distancias (Å) entre los anillos aromáticos entre si y los átomos de oxígeno más próximos del Cristal 2 del C-tereftálico. Abajo: Interacciones de corto alcance.

2.3 DÍMEROS CABEZA-CABEZA DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES

Se comenzará este apartado, haciendo referencia a las estructuras cristalinas de dímeros de ácidos biliares ya resueltas con anterioridad en el presente grupo de investigación (*Secciones 2.3.1 y 2.3.2*) y determinadas mediante difracción rayos X.

La numeración que se emplea para diferenciar cada resto de esteroide es la misma que se empleará para todos los dímeros estudiados en los siguientes apartados, utilizando los superíndices I y II para hacer referencia a cada una de las moléculas de esteroide del dímero de izquierda a derecha según la orientación de la celda cristalográfica. La numeración de los átomos de carbono del esteroide es la misma que la ya ofrecida para los otros derivados estudiados.

2.3.1 Dímero Colato-succínico-Colato, amC₂-Succínico.

Los resultados obtenidos para el cristal del dímero de ácido cólico en el que ambos residuos biliares están unidos a través de una cadena alquílica flexible procedente del

ácido succínico, y al que se ha denominado *amC*₂-succínico (Figura 2.55), han sido presentados con anterioridad por el Dr. Víctor H. Soto en su Tesis doctoral realizada en este grupo de investigación.¹²⁵

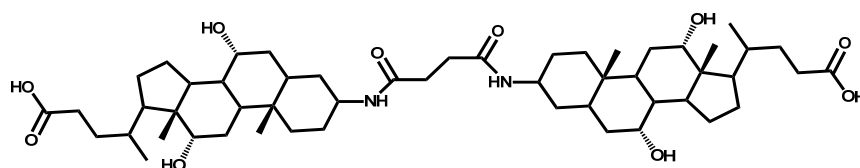


Figura 2.55. Estructura del dímero de ácido cólico *amC*₂-succínico.

No fue posible obtener el cristal del dímero en su forma ácida, pero si el correspondiente a su derivado éster dimetilico. El cristal, recrystalizado en metanol, cristaliza con una molécula de agua, pertenece al sistema monoclinico P2₁ y los parámetros de la celda se recogen en la Tabla 2.15

Tabla 2.15.

Parámetros de celda del cristal del diéster del *amC*₂-succínico, recrystalizado en metanol.

<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)
10.612(4)	22.603(9)	10.982(4)	90.000(5)	96.966(7)	90.000(5)

La Figura 2.56 muestra sendas vistas a lo largo de los ejes cristalográficos *a* y *b* del empaquetamiento y la Figura 2.57 muestra la disposición del dímero en el cristal.

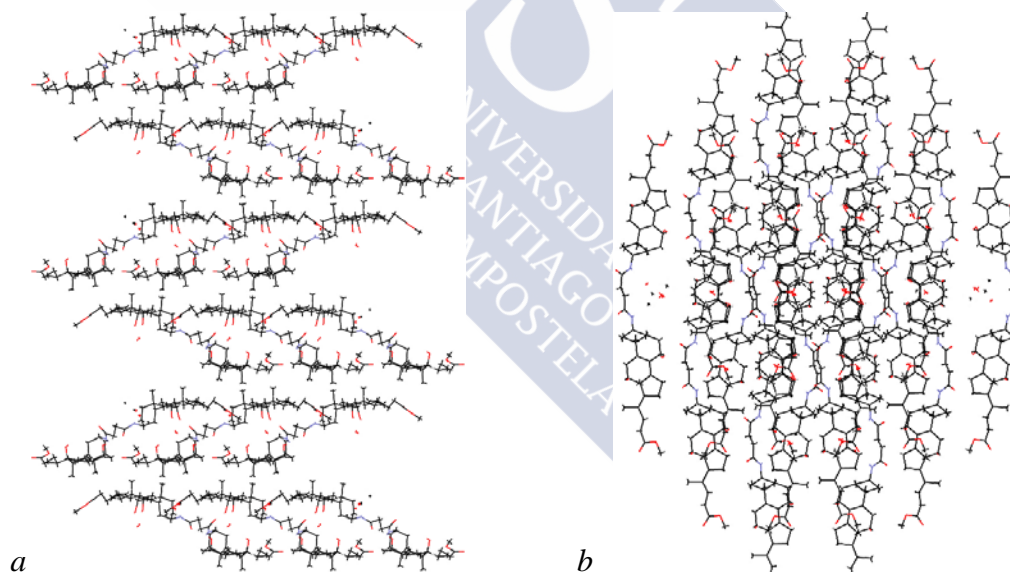


Figura 2.56. Empaquetamiento del cristal del diéster del *amC*₂-succínico visto a lo largo de los ejes *a* y *b*. El empaquetamiento a lo largo del eje *b* muestra la existencia de huecos donde se acomoda una molécula de agua.

A la hora de comparar las posiciones relativas de los restos de esteroide dentro de la estructura, se determinó el ángulo entre los planos definidos por los 13 átomos de carbono de los esqueletos de los dos residuos esteroideos del dímero (anillos B, C y D). El bajo valor obtenido, 3.27°, indica que son prácticamente paralelos. Los planos anteriores formaron ángulos de 69.5° para el residuo I y 72.7° para el II, respecto al plano que contiene el puente succínico, lo que indica que las moléculas de esteroide están lejos de la perpendicularidad a dicho plano, o lo que es lo mismo, el plano que contiene el puente está en una posición sesgada respecto a los planos de los esteroides (Figura 2.57).

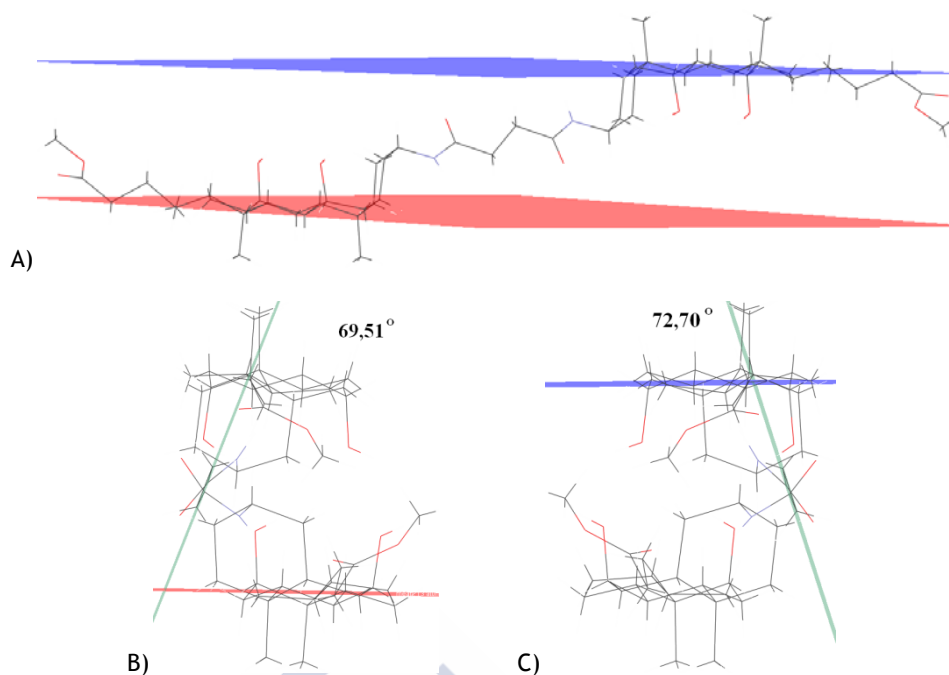


Figura 2.57. A) Planos casi paralelos de los dos residuos esteroideos del amC_2 -succínico. B) Ángulo formado por el residuo esteroideo I, con el plano del puente succínico. C) Ángulo del Plano de II con el plano del puente succínico. (Rojo esteroide I, azul esteroide II y en verde el plano del puente succínico).

Del análisis de los ángulos de torsión, muy similares en las dos moléculas de esteroide participantes del dímero (*Tabla 2.16*), se dedujo que la conformación del anillo D es más próxima a β -sobre que a media silla ($\Delta = -7.10^\circ$ y $\phi_m = 48.56^\circ$ para la I, y $\Delta = 2.64^\circ$ y $\phi_m = 48.15^\circ$ para la molécula II).

Tabla 2.16
Valores de los ángulos de torsión más importantes del diéster del amC_2 -succínico.

Ángulo de torsión	ϕ ($^\circ$)	Ángulo de torsión	ϕ ($^\circ$)
C17-C13-C14-C15 ^I $\equiv\phi_0$	48.47	C13-C17-C20-C22 ^I	-175.33
C17-C13-C14-C15 ^{II}	48.14	C13-C17-C20-C22 ^{II}	-178.70
C13-C14-C15-C16 ^I $\equiv\phi_4$	-40.57	C17-C20-C22-C23 ^I	-164.45
C13-C14-C15-C16 ^{II}	-38.07	C17-C20-C22-C23 ^{II}	-166.72
C14-C15-C16-C17 ^I $\equiv\phi_3$	17.21	C20-C22-C23-C24 ^I	-172.91
C14-C15-C16-C17 ^{II}	13.13	C20-C22-C23-C24 ^{II}	-176.77
C15-C16-C17-C13 ^I $\equiv\phi_2$	12.21	C22-C23-C24-O24a ^I	-46.65
C15-C16-C17-C13 ^{II}	16.17	C22-C23-C24-O24a ^{II}	-38.70
C16-C17-C13-C14 ^I $\equiv\phi_1$	-36.31	C3-N25-C26-C27 ^I	177.84
C16-C17-C13-C14 ^{II}	-38.45	C3-N25-C26-C27 ^{II}	178.61

Las cadenas laterales adquieren una conformación *tttg*, totalmente estirada excepto en lo que se refiere al enlace C23-C24. Por otra parte, la conformación *gauche* en torno al enlace C23-C24 es muy cerrada, y esto permite la participación del grupo carbonilo de la cadena lateral en enlaces de hidrógeno. La sustitución en el C3 se encuentra también en conformación *trans* o estirada.

Otra característica destacable de esta estructura cristalina es que cada resto de esteroide del dímero se sitúa en lados opuestos de la bicapa, con los puentes de unión cruzando la capa hidrófila (*Figura 2.58*). El espesor de la bicapa es de 11.302 Å. Los átomos de oxígeno de los dos grupos amida del puente actúan como pinzas estableciendo enlaces de hidrógeno con los dos O(7)-H de los grupos hidroxilo (O(7)-H \cdots O(26), 2.655–2.672 Å que participan en la formación de un tetraedro (*Figura 2.59*). El puente se une a

una tercera molécula. Esos enlaces de hidrógeno junto con los que forman O(7)-agua-O(7) forman un ciclo. El ángulo medio tetraédrico resultó de $110 \pm 12^\circ$. Los enlaces de hidrógeno que estabilizan la estructura están resumidos en la *Tabla 2.17*.

La estructura de pinza ayuda a fijar la distancia entre los dos núcleos de esteroide que encapsulan a la molécula de agua. Los dos centroides del esqueleto de esteroide (átomos de carbono C1/C5-C17) se alinean verticalmente cruzando el átomo de oxígeno de la molécula de agua (*Figura 2.59*), con una distancia de separación de 6.58 Å.

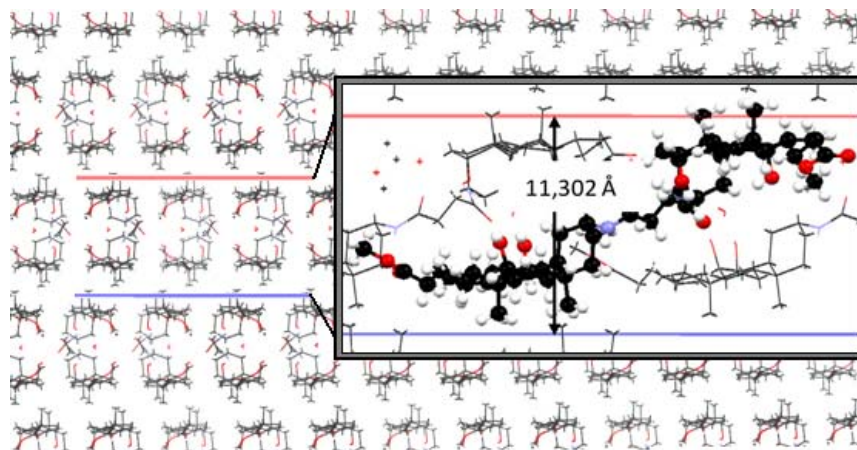


Figura 2.58. Estructura de bicapa en el cristal de *amC₂-succínico* (vista a lo largo del eje cristalográfico *c*). El recuadro muestra en detalle el espesor de la bicapa con el dímero localizado en lados opuestos de esta, con el puente de unión cruzando la capa hidrófila.

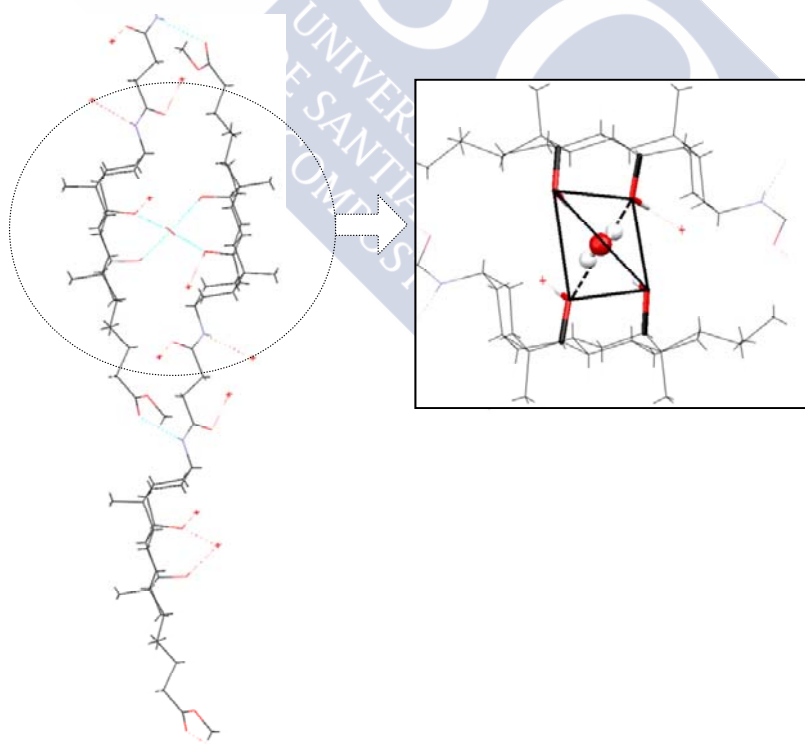


Figura. 2.59. Enlaces de hidrógeno de (i) la molécula de agua central con los dos restos de esteroide pertenecientes a dos dímeros (ii) puente de un tercer dímero de esteroide [localizado detrás de los dos dímeros anteriores] formando una pinza, y (iii) N25-H...O24b que une mutuamente cada C24 del grupo carboxílico terminal de uno de los restos de colato con el átomo de nitrógeno del grupo amida más distante del puente del otro resto de colato. Se muestra también la localización de los dos centroides de los restos de esteroide participando en la formación del tetraedro.

Tabla 2.17

Enlaces de hidrógeno observados en el cristal del diéster del *amC*₂-succínico.

D-H...A	d(D...A) (Å)	<DHA (°)
O(12)-H ^I ...O (agua)	2.936 (3)	174 (3)
O(7)-H ^I ...O(26a) ^{II}	2.672 (3)	173 (3)
N(25)-H ^I ...O(24b) ^I	2.958 (3)	163 (3)
N(25)-H ^{II} ...O(24b) ^{II}	2.982 (6)	170 (3)
(*)	2.941 (6)	173 (3)
O(12)-H ^{II} ...O(agua)	2.935 (3)	162 (3)
O(7)-H ^{II} ...O(26a) ^I	2.655 (3)	167 (4)
O(agua)-H ₁ ...O(7) ^{II}	2.710 (3)	169 (3)
O(agua)-H ₂ ...O(7) ^I	2.738 (3)	165 (3)

(*) La duplicidad de valores es consecuencia del desorden que afecta a la parte final de la cadena lateral de la molécula II (y que no se da en el resto de la estructura).

2.3.2 Dímero Colato-fenilo(1,3)-Colato o *amC*₂-Isoftálico.

Los resultados obtenidos para el dímero del ácido cólico en el que ambos residuos biliares están unidos a través de un anillo aromático con los sustituyentes en posiciones 1 y 3, y al que abreviadamente denominaremos *amC*₂-isofáltico (Figura 2.60), han sido presentados con anterioridad por el Dr. Víctor H. Soto en su tesis doctoral, realizada en este grupo de investigación.¹²⁵

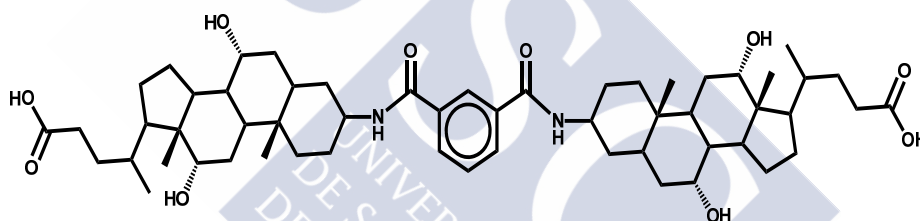


Figura 2.60. Estructura del dímero de ácido cólico *amC*₂-isofáltico.

Al igual que en el caso anterior, sólo se han podido conseguir cristales válidos, para el análisis de rayos X, para su diéster metílico y no para el diácido. El compuesto se recrystalizó de acetato de etilo-metanol. El estudio de difracción de rayos X puso de manifiesto que pertenece al sistema monoclinico, grupo espacial P2₁ con parámetros de celda recogidos en la Tabla 2.18. Incluye acetato de etilo con una estequiometría 1:1 (Figura 2.61).

El ángulo entre los planos de las dos moléculas de esteroide (definidos mediante los trece átomos de carbono de los anillos B, C y D) que conforman el compuesto es de 85.1°, indicando que, entre sí, están próximas a la perpendicularidad (Figura 2.62). Los planos anteriores forman ángulos de 69.2° y 87.6° respecto al plano del anillo bencénico, lo que muestra que una de las moléculas de esteroide es casi perpendicular a dicho plano pero la otra se encuentra relativamente lejos de esa disposición.

Las cadenas que unen cada molécula de sal biliar al puente no se encuentran en una disposición idéntica, tal y como ponen de manifiesto los ángulos de torsión C3-N25-C26-C27 de la Tabla 2.19. Esta tabla resume también los valores de los ángulos de torsión más importantes de la molécula, debiendo resaltar que los correspondientes a la secuencia C17-C20-C22-C23 ponen de manifiesto que la cadena lateral adopta una conformación *trans* en la molécula I y *gauche* en la II, a las que, más detalladamente, podemos referir como *tttt* para la molécula I y como *tggt* para la II.

Tabla 2.18

Parámetros de celda del cristal del diéster del *amC₂*-isofáltico, recristalizado de acetato de etilo/metanol que pertenece al grupo espacial P2₁.

a(Å)	b(Å)	c(Å)	α(°)	β(°)	γ(°)
7.5326(10)	22.6049(3)	16.9897(2)	90.000(5)	99.778(10)	90.000(5)

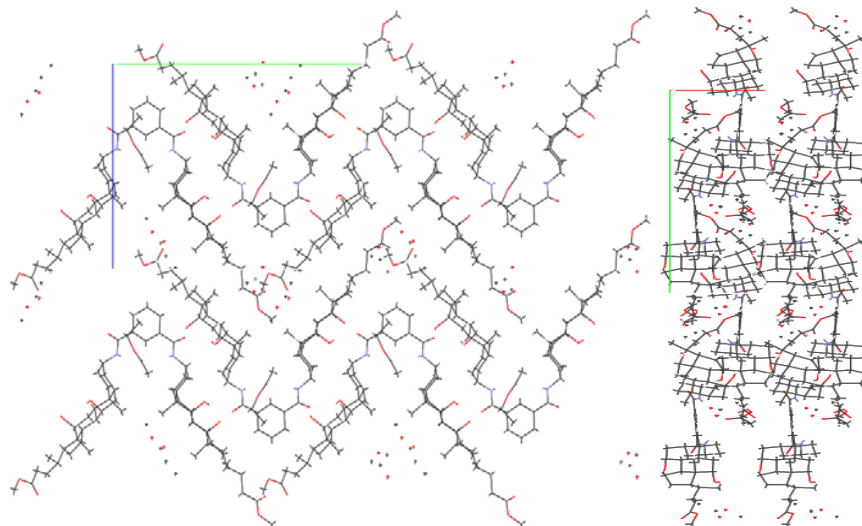


Figura 2.61. Estructura del cristal del diéster del *amC₂*-isofáltico, recristalizado de acetato de etilo/metanol, visto a lo largo de los ejes *a* (izquierda) evidenciando la estructura en zigzag y *c* (derecha) mostrando láminas paralelas.

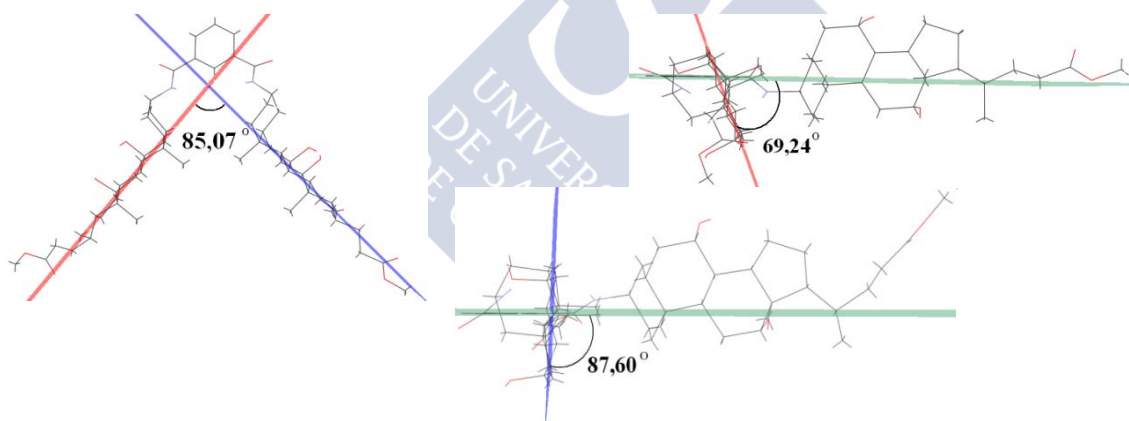


Figura 2.62. Ángulos formados por los dos residuos esteroideos del diéster del *amC₂*-isofáltico entre sí (próximos a la perpendicularidad) y por cada uno con el plano del anillo aromático (rojo esteroide I, azul esteroide II y verde el residuo bencénico).

Tabla 2.19

Valores de los ángulos de torsión del diéster del *amC₂*-isofáltico.

Ángulo de torsión	φ (°)	Ángulo de torsión	φ (°)
C17-C13-C14-C15 ^I ≡φ ₀	44.45	C13-C17-C20-C22 ^I	167.68
C17-C13-C14-C15 ^{II}	46.23	C13-C17-C20-C22 ^{II}	175.40
C13-C14-C15-C16 ^I ≡φ ₄	-28.61	C17-C20-C22-C23 ^I	47.49
C13-C14-C15-C16 ^{II}	-35.57	C17-C20-C22-C23 ^{II}	162.28
C14-C15-C16-C17 ^I ≡φ ₃	1.39	C20-C22-C23-C24 ^I	-158.83
C14-C15-C16-C17 ^{II}	10.80	C20-C22-C23-C24 ^{II}	-177.21
C15-C16-C17-C13 ^I ≡φ ₂	25.88	C22-C23-C24-O24a ^I	-171.93
C15-C16-C17-C13 ^{II}	17.60	C22-C23-C24-O24a ^{II}	165.94
C16-C17-C13-C14 ^I ≡φ ₁	-42.47	C3-N25-C26-C27 ^I	173.94
C16-C17-C13-C14 ^{II}	-38.41	C3-N25-C26-C27 ^{II}	174.89

Por otra parte, los ángulos de torsión en el anillo D arrojan valores de $\Delta = 31.32^\circ$ y $\phi_m = 46.16^\circ$ para la molécula I y de $\Delta = 7.75^\circ$ y $\phi_m = 46.34^\circ$ para la II. La molécula I posee, por lo tanto, el anillo D con una conformación cercana a media silla, siendo más próxima a β -sobre en la molécula II (Tabla 2.19). La distancia entre las láminas, medida como distancia entre planos definidos por anillos bencénicos superpuestos, es 7.484 Å (Figura 2.63).

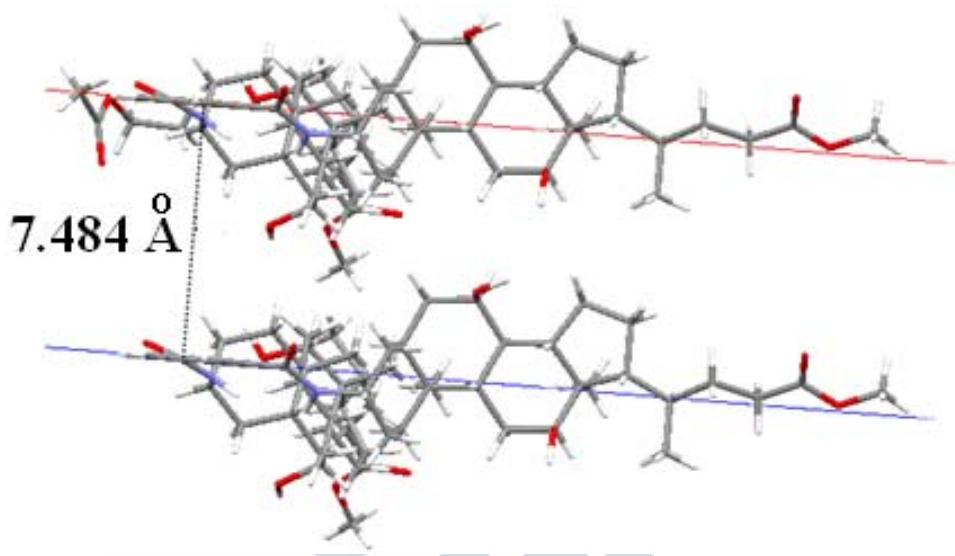


Figura 2.63. Distancia entre láminas adyacentes el cristal del diéster del *amC*₂-isofáltico.

Los enlaces de hidrógeno que dan lugar a la estructura del cristal se recogen en la Tabla 2.20, junto con los valores de sus parámetros geométricos. Cabe resaltar aquí que los átomos de oxígeno carbonílicos de los grupos amida actúan, simultáneamente, como aceptores de los grupos hidroxilo en las posiciones 7 y 12, de dos moléculas distintas situadas en dos láminas adyacentes, facilitando con ello la unión entre las mismas (ver detalle de la Figura 2.64). A su vez, el grupo carbonilo del acetato de etilo es aceptor de los hidrógenos de los dos grupos amida.

Tabla 2.20
Parámetros geométricos de los enlaces de hidrógeno observados en el cristal del diéster del *amC*₂-isofáltico.

D-H \cdots A	d(D \cdots A) (Å)	\angle DHA ($^\circ$)
N(25)-H ^{II} \cdots O=C(huésped)	3.265 (2)	175 (3)
N(25)-H ^I \cdots O=C(huésped)	3.169 (2)	165 (3)
O(12)-H ^{II} \cdots O(26a) ^I	2.881 (2)	156 (4)
O(12)-H ^I \cdots O(26a) ^{II}	2.989 (3)	161 (5)
O(7)-H ^I \cdots O(26a) ^{II}	2.966 (2)	146 (3)
O(7)-H ^{II} \cdots O(26a) ^I	2.802 (2)	167 (4)

A

Al comparar estos resultados se observa que en el caso del *amC*₂-isofáltico, donde el puente es rígido, los restos de esteroide son casi perpendiculares mientras que para *amC*₂-succínico, donde el puente flexible, son casi paralelos. Este hecho lleva a esquemas de enlaces de hidrógeno diferentes.

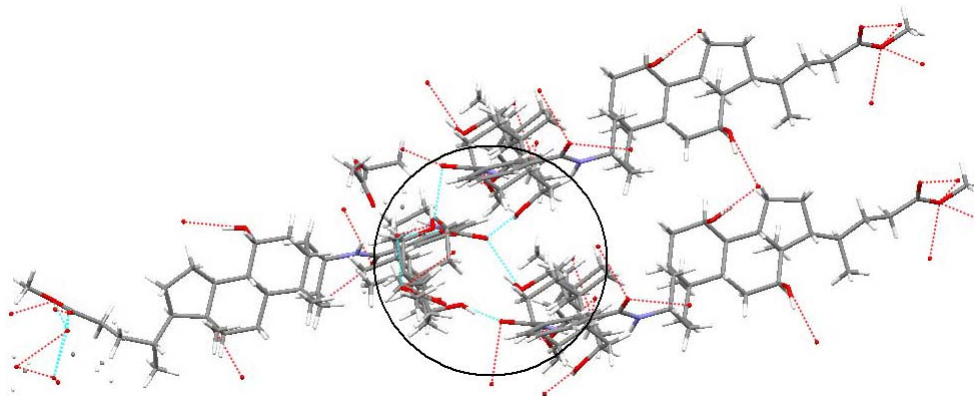


Figura 2.64. Enlaces de hidrógeno formados entre los átomos de oxígeno de los grupos amida (aceptores) con los hidroxilos en posiciones 7 y 12 (donantes) de dos moléculas de dos láminas adyacentes (detalle) del cristal del diéster del *amC₂₇*-isofáltico.

2.3.3 Dímero Desoxicolato-fenil(1,3)-Desoxicolato o DC₂-Isofáltico.

En este apartado se analizan los resultados obtenidos para el dímero del ácido cólico en el que ambos residuos biliares están unidos a través de un anillo aromático con los sustituyentes en posiciones 1 y 3. Su nombre abreviado DC₂-isofáltico (*Figura 2.65*). Cabe destacar que los enlaces de unión al puente son tipo éster (es decir, se ha mantenido el grupo hidroxilo de la posición C3 del esteroide) y no amida, como en la mayoría de las moléculas estudiadas en nuestro grupo. La *Tabla 2.21* recoge un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 2.21
Datos de los cristales del nuevo dímero DC₂-isofáltico.

Formula Empírica	C ₅₈ H ₈₆ O ₁₀
Compuesto	3
Peso Molecular	943.27
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de Onda (Å)	1.5418
Sistema cristalino , grupo espacial	Monoclínico P2 ₁
<i>a</i> (Å)	7.6225(13)
<i>b</i> (Å)	11.2669(9)
<i>c</i> (Å)	31.7872(26)
α (°)	90
β (°)	95.319(9)
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	2718.19(56)
Z, densidad calculada (g/cm ³)	2, 1.153
Coefficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.611
F (000)	1028
Tamaño Cristal (mm ³)	0.3x0.3x0.2
Intervalo θ (datos) (°)	1.29-26.43
Intervalo de índices	-9 ≤ h ≤ 9 0 ≤ k ≤ 14 0 ≤ l ≤ 39
Datos/restricciones/parámetros	5870/1/613
Grado de ajuste en F ²	1.034
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0491, wR2 = 0.133
índices R (todos los datos)	R1 = 0.0659, wR2 = 0.1443

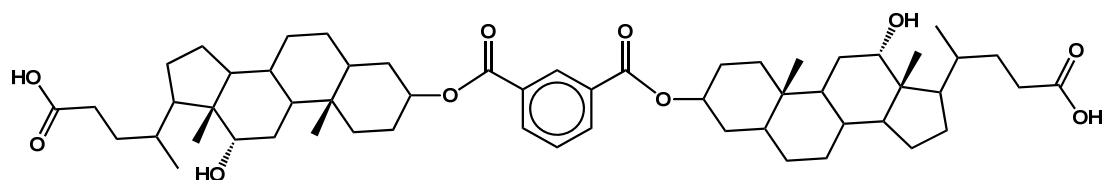


Figura 2.65. Estructura del dímero derivado del ácido desoxicólico DC₂-isofalatoico.

Como en casos anteriores, sólo se ha podido resolver la estructura cristalina para el diéster metílico y no para el diácido. El compuesto se cristalizó de acetato de etilometanol. Pertenece al sistema monoclinico, grupo espacial P2₁. En las Figuras 2.66 y 2.67 se muestran diferentes perspectivas de la estructura generada.

El empaquetamiento en el cristal de DC₂-isofalatoico se describe mejor con parejas de moléculas de dímeros (Figura 2.68). Como la pareja se relaciona mediante un eje de tornillo de 180°, los correspondientes restos de esteroide de cada dímero se disponen en direcciones opuestas siguiendo un zigzag. Se debe mencionar que en cristal no existe ningún apilamiento de los grupos fenilo, ni presenta capas hidrofílicas-hidrofóbicas y, como ya se ha comentado, no alberga huésped en su estructura.

Para describir la disposición molecular del dímero DC₂-isofalatoico dentro del cristal se comenzará midiendo el ángulo entre los planos que contienen los esqueletos de los dos grupos esteroide (definidos mediante los anillos B, C y D) que conforman el compuesto. Este ángulo, de 43.46°, da cuenta de la disposición en zigzag de la estructura cristalina. En la se puede observar que cada resto de ácido biliar se orienta de forma distinta.

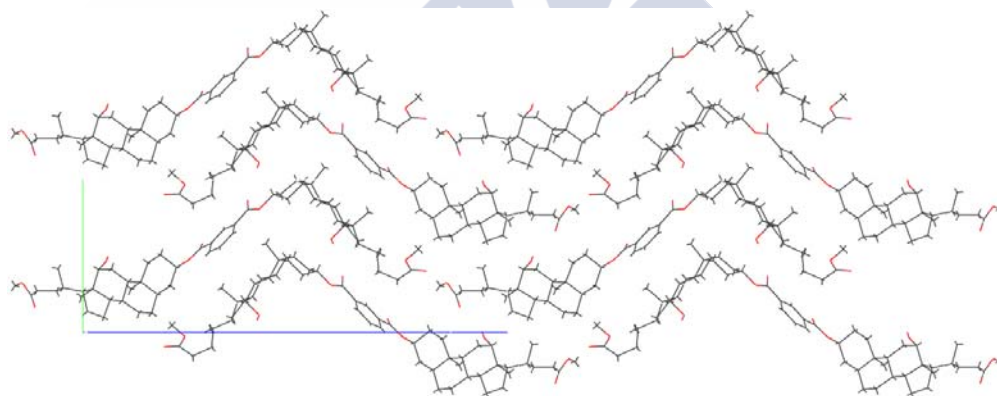


Figura 2.66. Vista de la estructura del cristal del diéster del DC₂-isofalatoico a lo largo del eje cristalográfico *a*.

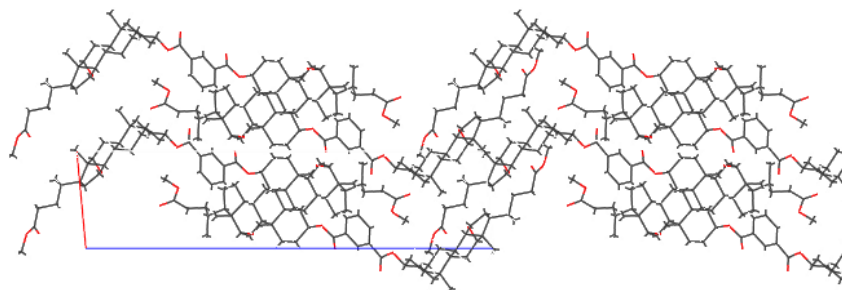


Fig.2.67. Vista de la estructura del cristal del diéster del DC₂-isofalatoico a lo largo del eje cristalográfico *b*.

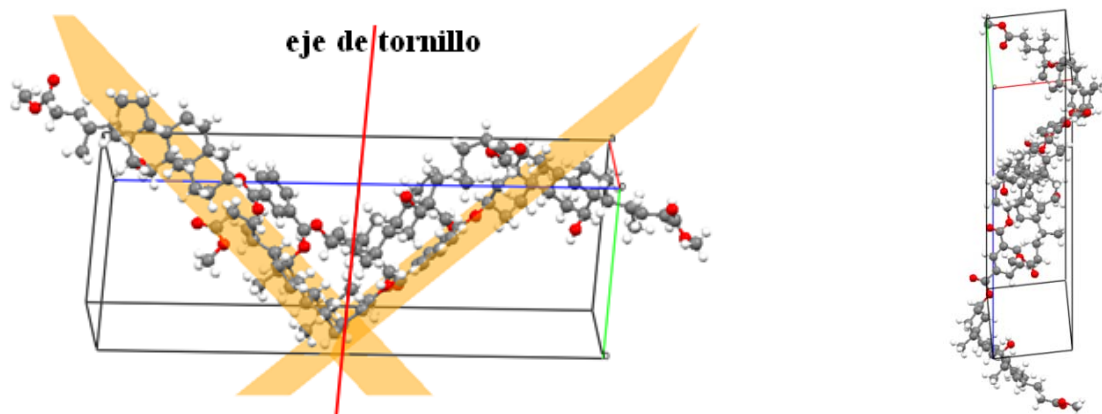


Fig.2.68. (Izquierda) Vista desde el eje cristalográfico *a* del empaquetamiento molecular en el DC₂-isoftálico. El eje de simetría de tornillo relacionando los dos dímeros aparece en rojo. (Derecha) Disposición molecular de los dímeros apuntando en direcciones opuestas.

Los planos anteriores forman ángulos de 82.3° y 89.4° respecto al plano del anillo bencénico, lo que muestra que las moléculas de esteroide son casi perpendiculares a dicho plano (II más cerca que I; *Figura 2.69*). La estructura en que se orienta el puente, teniendo en cuenta los enlaces de unión a los esteroides, es similar a ambos lados de la molécula tal y como ponen de manifiesto los ángulos de torsión C3-N25-C26-C27 de la *Tabla 2.22*. Los ángulos de torsión C20-C22-C23-C24 muestran como la cadena lateral adopta una conformación *trans* en la molécula I y *gauche* en la II, a las que, más detalladamente, podemos referir como *tti* (i: Intermedia entre *gauche* y *trans*) para la molécula I y como *ttgc* (c, cis) para la II. Esta disposición de la cadena lateral del esteroide II es inusual.

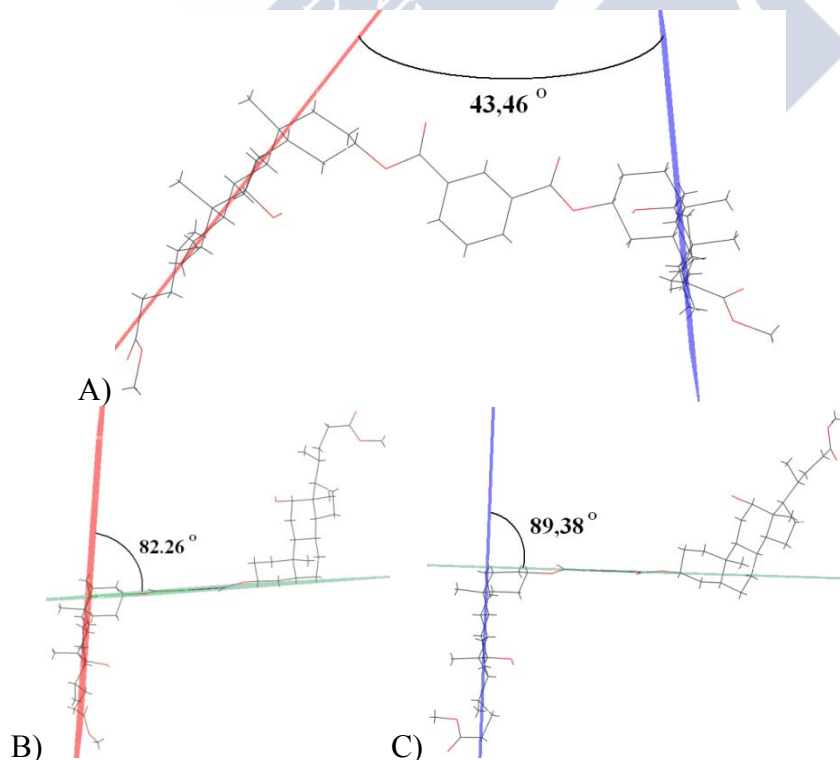


Fig.2.69. A) Ángulo formado por los dos residuos esteroideos del DC₂-isoftálico. B) Ángulo formado por el residuo esteroideo I, con el plano del residuo bencénico. C) Ángulo del Plano de II con el plano del residuo bencénico. (rojo esteroide I, azul esteroide II y en verde el plano del anillo bencénico).

Tabla 2.22
Valores de los ángulos de torsión del diéster del DC- γ -isofáltico.

Ángulo de torsión	φ (°)	Ángulo de torsión	φ (°)
C17-C13-C14-C15 ^I $\equiv\varphi_0$	45.91	C13-C17-C20-C22 ^I	-179.01
C17-C13-C14-C15 ^{II}	46.47	C13-C17-C20-C22 ^{II}	-176.01
C13-C14-C15-C16 ^I $\equiv\varphi_4$	-34.07	C17-C20-C22-C23 ^I	-168.77
C13-C14-C15-C16 ^{II}	-34.56	C17-C20-C22-C23 ^{II}	-163.59
C14-C15-C16-C17 ^I $\equiv\varphi_3$	8.74	C20-C22-C23-C24 ^I	177.11
C14-C15-C16-C17 ^{II}	9.20	C20-C22-C23-C24 ^{II}	61.47
C15-C16-C17-C13 ^I $\equiv\varphi_2$	19.15	C22-C23-C24-O24a ^I	120.22
C15-C16-C17-C13 ^{II}	19.24	C22-C23-C24-O24a ^{II}	27.47
C16-C17-C13-C14 ^I $\equiv\varphi_1$	-38.88	C3-O25-C26-C27 ^I	-178.65
C16-C17-C13-C14 ^{II}	-39.39	C3-O25-C26-C27 ^{II}	-178.51

Al analizar los ángulos de torsión en el anillo D (Tabla 2.22), siguiendo el criterio de Altona *et al* se obtienen valores de $\Delta = 12.24^\circ$ y $\phi_m = 46.17^\circ$ para la molécula I y de $\Delta = 11.87^\circ$ y $\phi_m = 46.72^\circ$ para la II, estando muy próximos entre sí.¹²⁰ Por lo tanto, ambos anillos D poseen una conformación parecida, más próxima a β -sobre que a media silla, aunque la disposición de las cadenas laterales I y II sea totalmente distinta una de otra.

Solo hay un grupo hidroxilo (C12) capaz de ser donante por lo que la red de enlaces de hidrógeno es muy sencilla (Tabla 2.23). En una de las ramificaciones, este grupo hidroxilo se enlaza con un grupo carbonilo (O24b) de la cadena lateral totalmente extendida mientras el otro se enlaza a un grupo carbonilo del enlace éster de unión al puente (O26a).

Tabla 2.23
Enlaces de hidrógeno en el cristal de DC- γ -isofáltico.

D-H \cdots A	d(D \cdots A) (Å)	\angle DHA (°)
O(12)-H ^I \cdots O(24b) ^I	2.850 (5)	149.6 (2)
O(12)-H ^{II} \cdots O(26a) ^{II}	3.002 (4)	140.4 (2)

2.3.4 Dímero colato-urea-colato, amC₂-urea.

El último dímero del ácido cólico del que se han obtenido cristales de calidad suficiente para el análisis mediante rayos X, es aquel en el que ambos residuos biliares están unidos a través de un puente de urea. Abreviadamente se le denominará amC₂-urea (Figura 2.70).

Parece ser una constante el hecho de que sólo se obtienen cristales de este tipo de compuestos en su forma de éster metílico. Como anteriormente, sólo se ha podido resolver la estructura cristalina del diéster metílico y no el diácido. El compuesto se cristalizó en dimetilsulfoxido-metanol. Pertenece al sistema monoclinico, grupo espacial I₂ (Tabla 2.24).

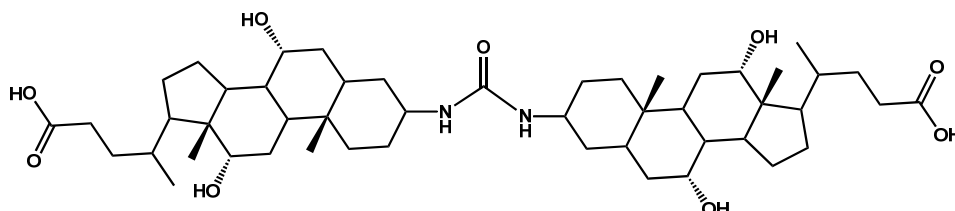


Figura 2.70. Estructura del dímero de ácido cólico amC₂-urea.

La Figura 2.71 muestra una perspectiva de la estructura generada por este dímero en el que se observa como las caras α se orientan en el mismo sentido, dentro de cada

molécula, y se enfrentan a otras para formar enlaces de hidrógeno que estabilizan la estructura.

La estructura está dispuesta en forma de bicapa, alternando regiones hidrófilas e hidrófobas (*Figura 2.72*, izquierda), con un espesor de 11.58 Å (*Figura 2.73*). Aunque los restos de esteroide no se orientan de forma paralela completamente (*Figura 2.72* centro) estas regiones polares y apolares forman planos a lo largo del cristal de tal forma que los sustituyentes metilo, en las posiciones C10 y C13, se sitúan interdigitados. Dependiendo de la posición desde la que se observa el cristal, aparecen canales como en una estructura de tipo malla (*Figura 2.72*, derecha).

Los puentes de urea de dos moléculas enfrentadas por su cara β se orientan de tal forma que el grupo carbonilo establece enlaces de hidrógeno con otra molécula en un plano superior y como los átomos de nitrógeno del puente de urea no intervienen en la red de enlaces de hidrógeno hace que se forme un hueco de 7.9×8.9 Å² (*Figura 2.73*). Las dimensiones de estos huecos parecen apropiadas para albergar a uno o varios huéspedes y en su momento la densidad electrónica que estos podían aportar tuvo que ser ignorada para poder resolver la estructura en el momento de obtener el cristal. Sin embargo, la aparición de nuevo software ha permitido recalcular la estructura de este compuesto con los mismos datos de dispersión para poder localizar e identificar a los huéspedes en el cristal (*Figura 2.73*, abajo).

Tabla 2.24
Datos de los cristales del nuevo dímero *amC₂-urea*.

Formula Empírica	C ₅₁ H ₈₄ N ₂ O ₉
Compuesto	4
Peso Molecular	869.2
Temperatura (K)	100
Longitud de Onda (Å)	1.5418
Sistema cristalino , grupo espacial	Monoclínico I2
<i>a</i> (Å)	14.1524(5)
<i>b</i> (Å)	7.8050(3)
<i>c</i> (Å)	50.058(2)
α (°)	90
β (°)	95.461(2)
γ (°)	90
Volumen (Å ³)	5504.1(4)
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.049
Coefficiente Absorción (mm ⁻¹)	0.56
F (000)	1904
Tamaño Cristal (mm ³)	0.3x0.15x0.0 2
Intervalo θ (datos) (°)	1.8-65.5
Intervalo de índices	-16≤h≤16 -9≤k≤8 0≤l≤58
Datos/restricciones/parámetros	9055/14/584
Grado de ajuste en F ²	1.26
Índices R finales[I>2σ(I)]	R1 = 0.113, wR2 = 0.511
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.133, wR2 = 0.344

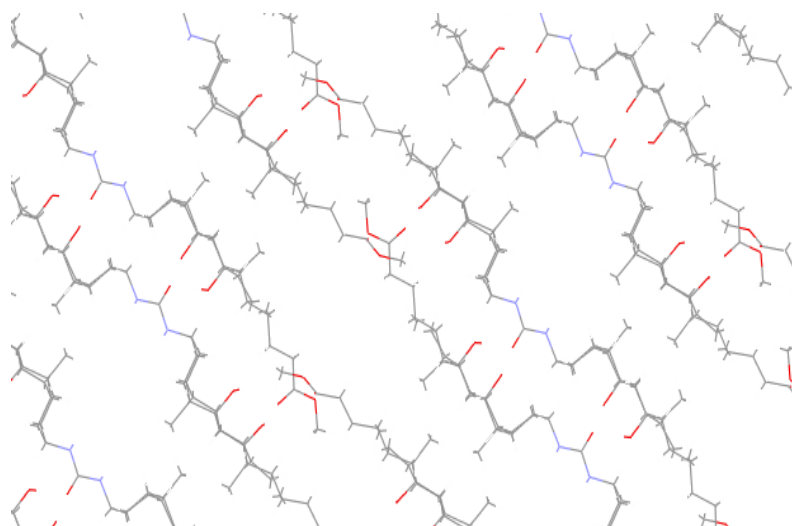


Figura 2.71. Vista del empaquetamiento molecular del amC_2 -urea a lo largo del eje b .

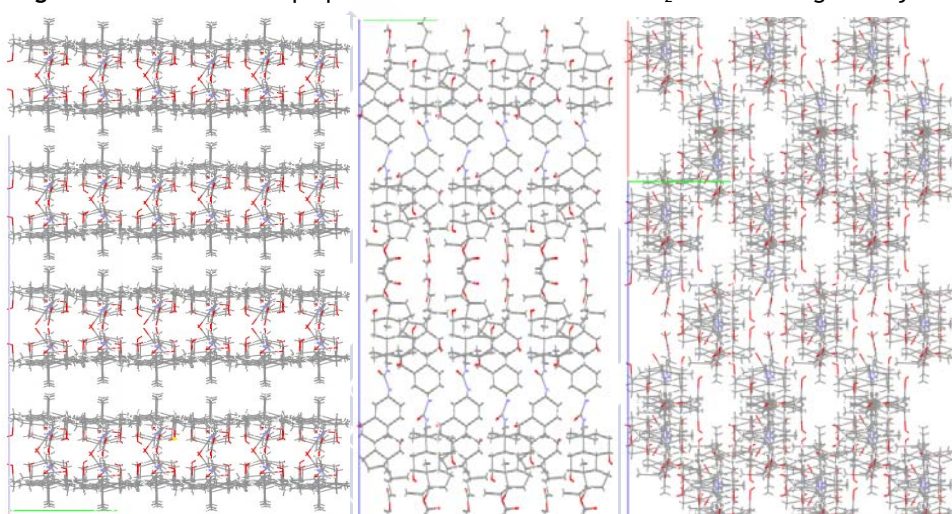


Figura 2.72. Vista desde tres puntos diferentes de la estructura cristalina del amC_2 -urea.

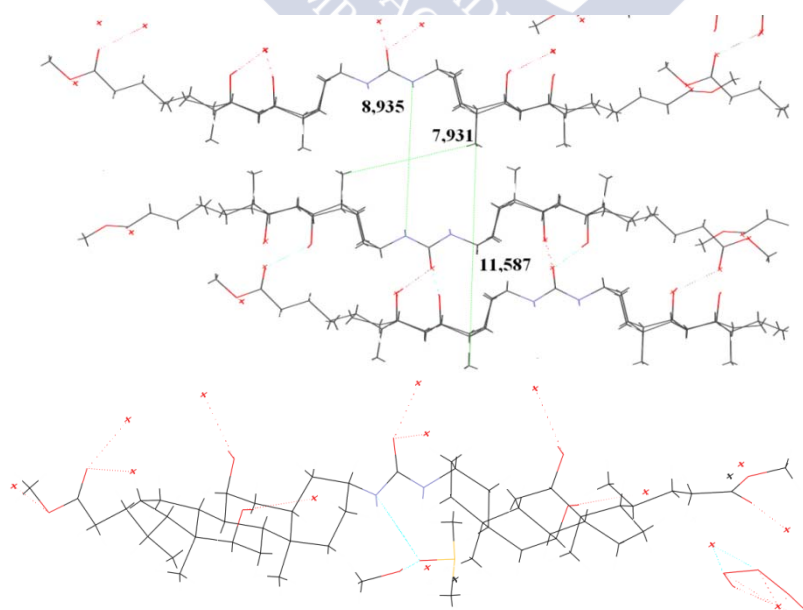


Figura 2.73. Arriba: Disposición molecular y dimensiones (Å) del hueco formado y espesor de la bicapa de la estructura cristalina del dímero amC_2 -urea sin considerar la contribución de los huéspedes. Abajo: Estructura recalculada que incorpora la contribución de los huéspedes (metanol, dimetilsulfoxido y agua deslocalizada) del cristal del amC_2 -urea.

Los huéspedes incluidos son metanol, dimetilsulfoxido y agua (muy deslocalizada ya que las posiciones que se muestran en la imagen, *Figura 2.73* abajo, presentan una ocupación de un tercio). El metanol forma un enlace de hidrógeno con el dimetilsulfoxido y este con uno de los nitrógenos del puente de urea (concretamente con el resto de esteroide I). Por lo tanto, con la inclusión de los huéspedes aparece un mayor número de enlaces de hidrógeno pero los demás datos estructurales de la red permanecen prácticamente idénticos.

Centrando la atención sobre la estructura molecular, el ángulo entre los planos que contienen los esqueletos de los dos grupos esteroide (definidos mediante los anillos B, C y D) es de 7.5° . La línea de corte de los planos anteriores se aleja claramente del centro de la molécula (*Figura 2.74*) lo que muestra que la molécula no guarda simetría entre un brazo y el otro. Los planos anteriores forman ángulos de 60.1° para I y 63.1° para II, respecto al plano que contiene el puente de urea, lo que muestra que las moléculas de esteroide están en una posición sesgada respecto al plano que contiene el puente (urea).

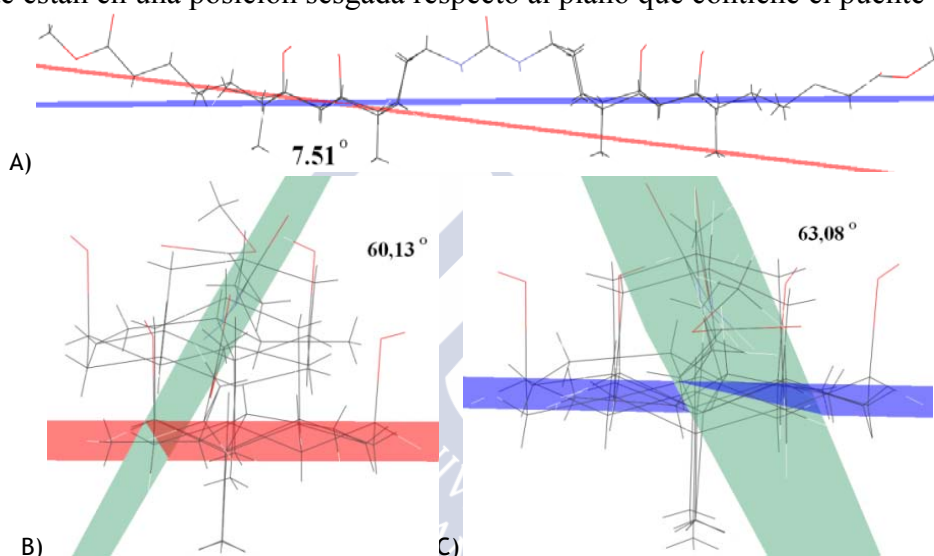


Figura 2.74. A) Ángulo formado por los dos residuos esteroideos del *amC₂*-urea. B) Ángulo formado por el residuo esteroideo I, con el plano del puente de urea. C) Ángulo del Plano de II con el plano del puente de urea. (Rojo esteroide I, azul esteroide II y en verde el plano del puente de urea).

Los ángulos de torsión C3-N25-C26-N25, que definen la orientación del puente, no guarda simetría a ambos lados de la molécula. Esta situación es muy parecida a la ya encontrada con el dímero *amC₂*-succínico. Los ángulos de torsión C20-C22-C23-C24 muestran cómo las cadenas laterales adoptan una conformación *trans* tanto en el residuo I como en el II (*Tabla 2.25*). Más detalladamente, podemos describir la disposición de la estructura como *titt* para I y como *ttti* para II.

Tabla 2.25
Valores de los ángulos de torsión del diéster del *amC₂*-urea.

Ángulo de torsión	φ (°)	Ángulo de torsión	φ (°)
C17-C13-C14-C15 ^I $\equiv\varphi_0$	47.33	C13-C17-C20-C22 ^I	-170.85
C17-C13-C14-C15 ^{II}	46.80	C13-C17-C20-C22 ^{II}	-176.39
C13-C14-C15-C16 ^I $\equiv\varphi_4$	-35.67	C17-C20-C22-C23 ^I	-158.14
C13-C14-C15-C16 ^{II}	-33.99	C17-C20-C22-C23 ^{II}	-172.59
C14-C15-C16-C17 ^I $\equiv\varphi_3$	8.26	C20-C22-C23-C24 ^I	-174.07
C14-C15-C16-C17 ^{II}	7.41	C20-C22-C23-C24 ^{II}	173.96
C15-C16-C17-C13 ^I $\equiv\varphi_2$	21.54	C22-C23-C24-O24a ^I	-173.48
C15-C16-C17-C13 ^{II}	22.10	C22-C23-C24-O24a ^{II}	166.83
C16-C17-C13-C14 ^I $\equiv\varphi_1$	-41.59	C3-N25-C26-N25 ^I	-173.87
C16-C17-C13-C14 ^{II}	-41.87	C3-N25-C26-N25 ^{II}	165.62

Al analizar los ángulos de torsión en el anillo D (*Tabla 2.24*) se obtienen, como en el caso del dímero anterior, valores de $\Delta = 15.01^\circ$ y $\phi_m = 47.73^\circ$ para la molécula I y de $\Delta = 17.81^\circ$ y $\phi_m = 47.37^\circ$ para la II, próximos entre sí. Por lo tanto, ambos anillos D poseen una conformación más cercana a β -sobre que a media silla.

Tabla 2.26
Enlaces de hidrógeno en el cristal de *amC*₂-urea.

D-H...A	d(D...A) (Å)	<DHA (°)
O(12) ^I -H...O(24b) ^{II}	2.906 (3)	129.76 (5)
O(7) ^I -H...O(24b) ^{II}	2.933 (2)	144.62 (3)
O(12) ^{II} -H...O(26a) ^I	2.760 (2)	157.67 (4)
O(7) ^{II} -H...O(26a) ^I	2.704 (2)	154.26 (4)
N(3) ^I -H...O(DMSO)	2.919	137.93
MeO-H...O(DMSO)	2.585	172.83

Los datos obtenidos para el cristal del *amC*₂-urea muestran que la red de enlaces de hidrógeno es sencilla (*Tabla 2.26*) y que los átomos de nitrógeno no participan. Cada unidad de dímero se une por la cara α mediante ocho enlaces de hidrógeno (*Figura 2.75*), a través de los grupos hidroxilo y del grupo carbonilo del puente de urea, a dos unidades en la cara opuesta de la bicapa. La naturaleza del átomo de oxígeno, que interviene en la formación del enlace de hidrógeno, permite que se alterne como donante y aceptor entre los cuatro enlaces que se establece con cada dímero vecino. Las moléculas miran en direcciones opuestas respecto a las que están en el plano inferior o superior de modo que el esteroide I forma enlaces de hidrógeno con dos esteroides II de dos dímeros en la otra capa (*Figura 2.76*).

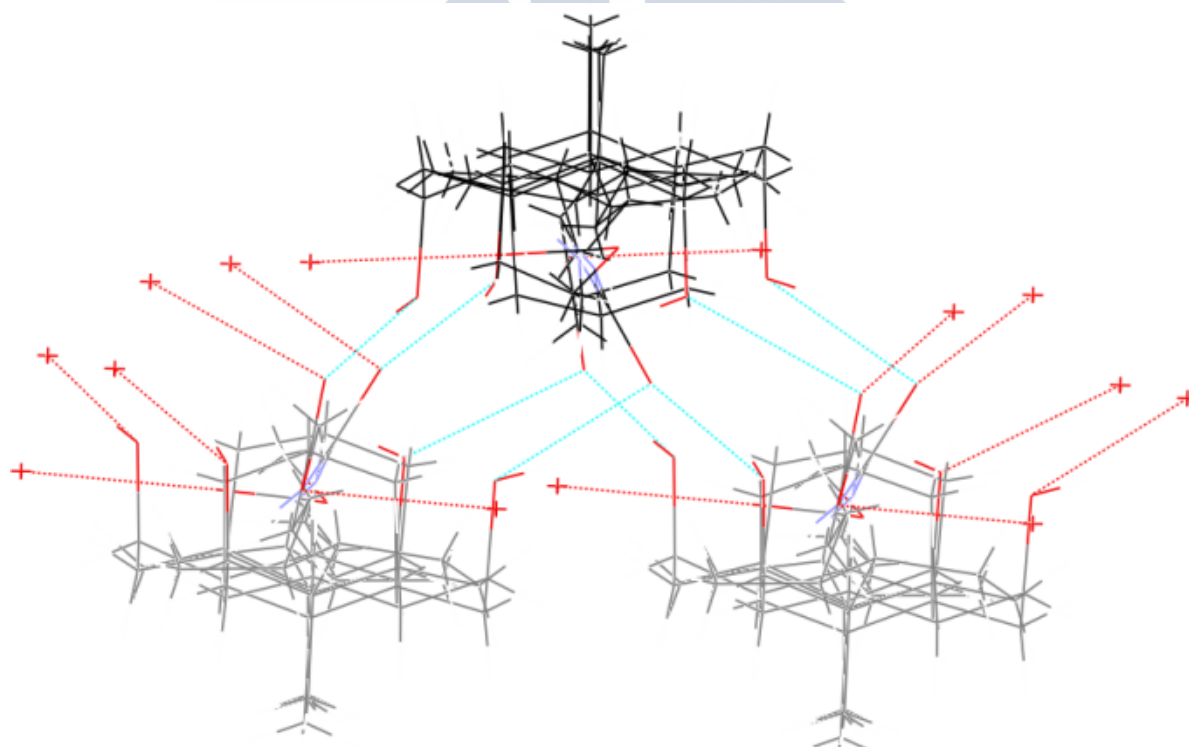


Figura 2.75. Red de enlaces de hidrógeno de la estructura cristalina del *amC*₂-urea: cada molécula (molécula central en negro) establece ocho enlaces de hidrógeno con dos moléculas de la cara opuesta de la bicapa.

Respecto a la molécula de referencia, únicamente se producen enlaces de hidrógeno con dos moléculas, y gracias a las interacciones dipolo-dipolo originadas por los dos carbonilos en las colas éster del compuesto, la estructura se propaga uniéndose a dos nuevas moléculas.

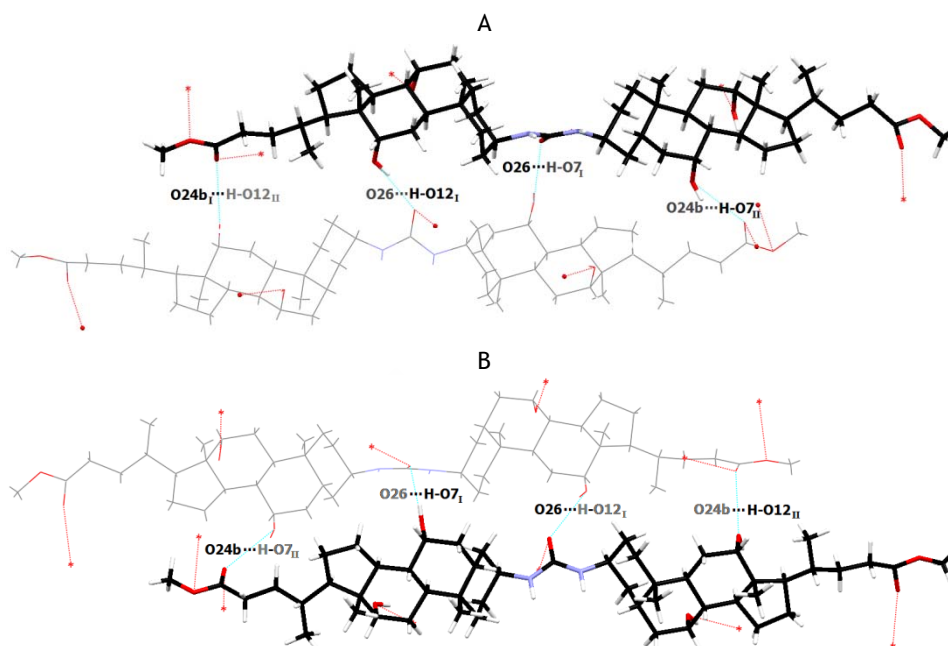


Figura 2.76. Vista de la red de enlaces de hidrógeno que cada molécula del dímero *amC*₂-urea establece por cada lado. (En color negro la molécula de referencia y I-II son los restos del esteroide al que pertenece el átomo de oxígeno).

2.4 NUEVO SISTEMA DE COORDENADAS INTERNAS PARA DÍMEROS DE ESTEROIDES.

Después de presentar y comentar, de una forma clásica, las características de los cristales de cuatro dímeros, dentro de esta nueva familia de moléculas, surge la necesidad de establecer un sistema de coordenadas internas que describan, de una forma sencilla y eficaz, la orientación relativa en el espacio de los dos restos de ácidos biliares dentro de la molécula. Dado que el núcleo del esteroide es rígido, para posicionar cada brazo de la estructura, únicamente se requieren tres átomos (no enlazados directamente). El átomo de carbono C3 (con un grupo hidroxilo en posición α en las sales biliares naturales), y C10 y C13 (con grupos metilo en posición β) son tres puntos de referencia útiles para este propósito. También son fácilmente visualizables dentro del esqueleto del esteroide. Por otro lado, estos átomos han sido utilizados para definir el plano vertical del núcleo de esteroide.¹²²

Para describir la orientación relativa de los dos restos de esteroide son necesarios cinco ángulos: tres de torsión o dihédricos, φ_i ($i=1-3$), y dos ángulos comunes, θ_i ($i=1-2$) (Figura 2.77).

Como se trabaja con seis átomos de carbono, los confórmeros del n-hexano serán una referencia, pero esta analogía tiene algunas restricciones. Por ejemplo, dependiendo del tamaño del puente de enlace, algunas orientaciones espaciales pueden ser imposibles. Los valores de θ_i no están restringidos como en el caso de ángulos de enlace en el n-hexano. Sin embargo el ángulo que forman C3-C10-C13 es fijo dado que pertenece al esqueleto rígido del esteroide. Tiene un valor medio de $124 \pm 3^\circ$ (estimado a partir de los datos de

varios cristales de ácidos biliares). La distancia entre cada átomo de carbono C3 de ambos restos biliares permitirá localizar los esteroides en el espacio.

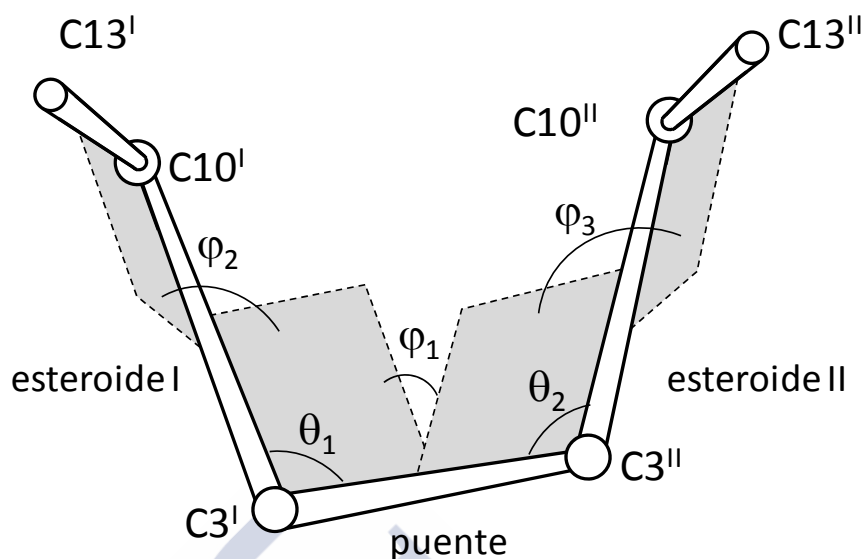


Figura 2.77. Ángulos de torsión y comunes necesarios para definir la posición relativa de los dos restos de esteroide en los dímeros.

Se puede adoptar la nomenclatura *e* (eclipsada), *g* (gauche) y *t* (anti) para 0, 90 y 180° los valores que pueden adoptar los ángulos de torsión. Por ello se pueden dibujar 3×3×3 conformémeros, pero si los dos restos de esteroide tienen los mismos parámetros geométricos (lo que es factible al menos en lo que se refiere a sus valores promedio) y si el puente es simétrico, el número de conformémeros se ve reducido sustancialmente. Como ejemplos, la Figura 2.78 muestra la disposición espacial de los conformémeros *ttt*, *ggg* y *eee*. Las estructuras intermedias se indicarán con *i* y dos subíndices relativos a los dos conformémeros más cercanos. Con estas premisas en mente, se puede clasificar cualquier dímero cabeza-cabeza.

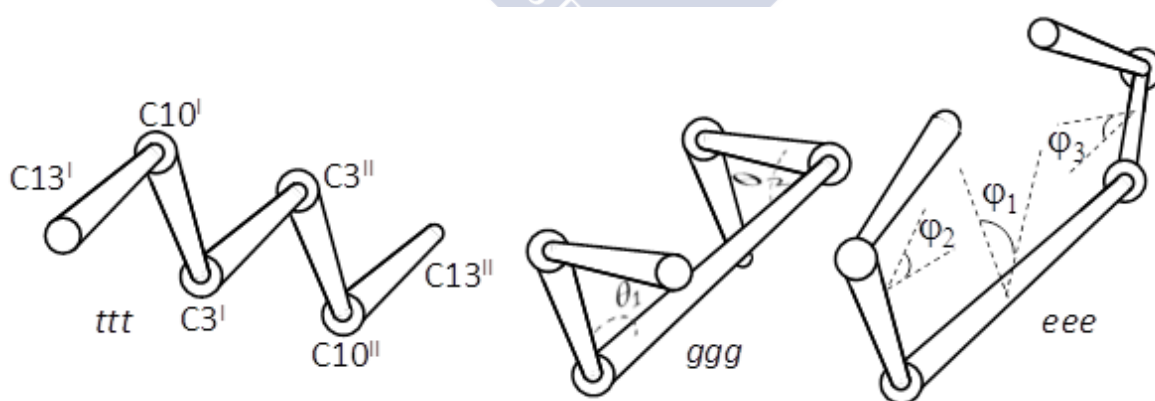


Figura 2.78. Conformémeros *ttt*, *ggg* y *eee* para los dímeros cabeza-cabeza de ácidos biliares.

Las Figuras 2.79-2.82 muestran perspectivas de la orientación relativa de los dos restos de esteroide en el cristal para cada compuesto estudiado. Algunos de los valores distintivos de distancias aparecen en las imágenes y los valores de los ángulos comunes y de torsión aparecen en la Tabla 2.27.

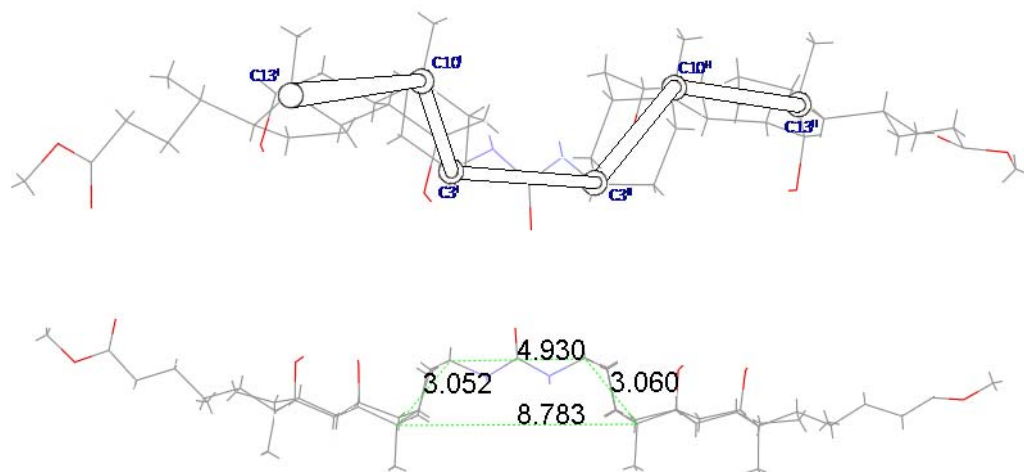


Figura 2.79. Arriba: Perspectiva del conformero del amC_2 -urea. Abajo: Distancias (Å).

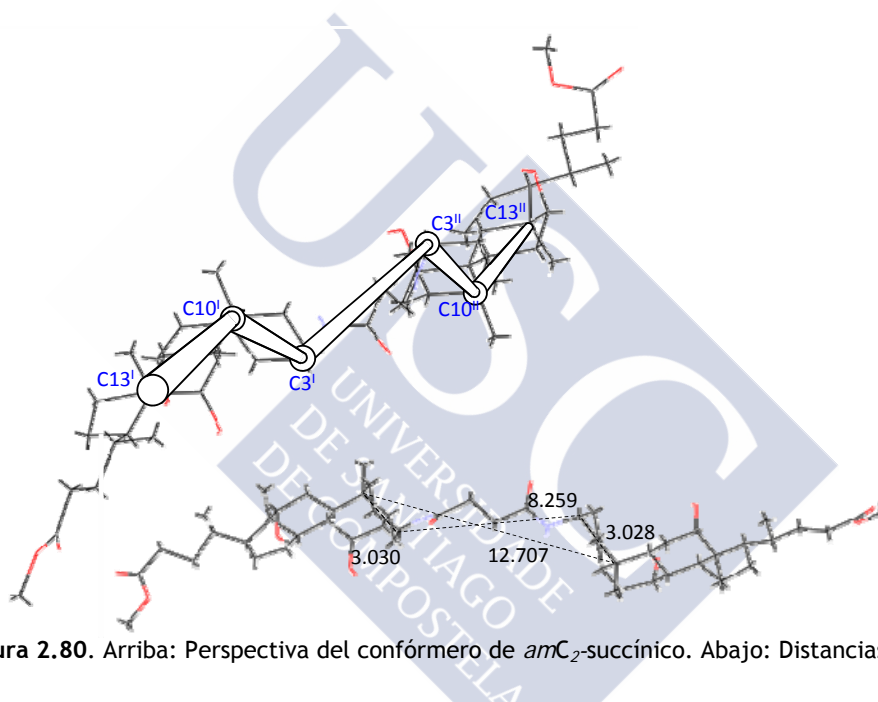


Figura 2.80. Arriba: Perspectiva del conformero de amC_2 -succínico. Abajo: Distancias (Å).

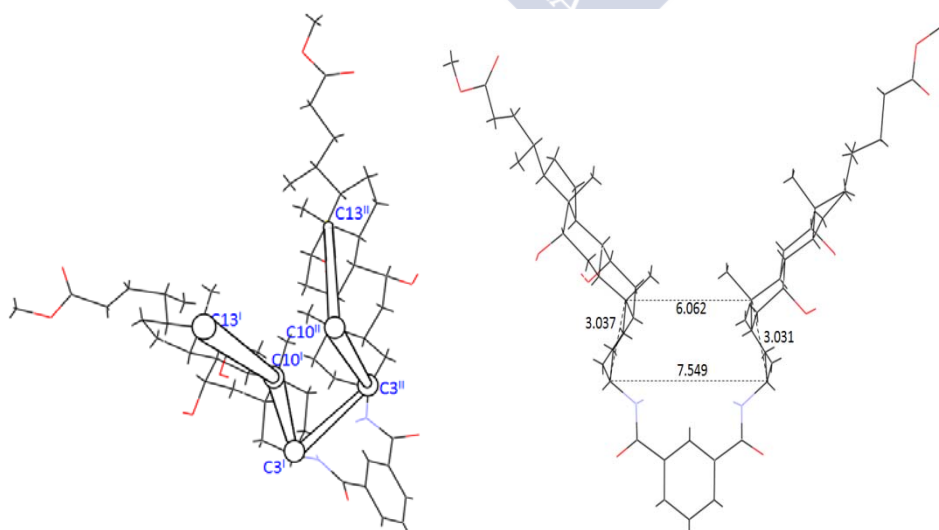


Figura 2.81. (Izquierda) Perspectiva del conformero del amC_2 -isoftálico. (Derecha) Distancias (Å).

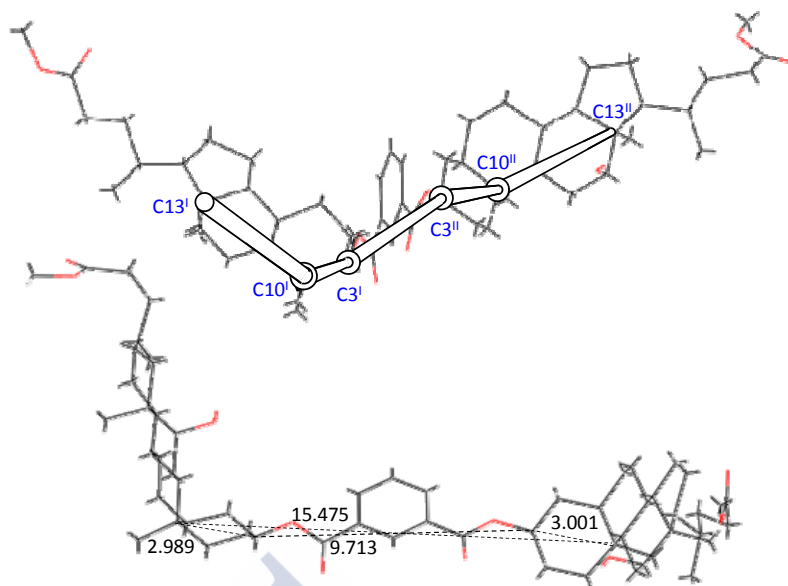


Figura 2.82. (Arriba) Perspectiva del conformero del DC₂-isoftálico. (Abajo) Distancias (Å).

Tabla 2.27.

Valores experimentales de las distancia entre los átomo de carbono C3 de los restos de esteroide, ángulos de torsión (φ_i ; $i=1-3$), y ángulos comunes (θ_i ; $i=1-2$) para los cuatro dímeros estudiados.

Distancias y ángulos	<i>amC</i> ₂ -urea	<i>amC</i> ₂ -succínico	<i>amC</i> ₂ -isoftálico	DC ₂ -isoftálico
$d(C3^I-C3^{II})/\text{Å}$	4.930	8.259	7.549	9.713
$\theta_1(C3^{II}-C3^I-C10^I)/^\circ$	130.26	124.9	76.9	165.6
$\theta_2(C10^{II}-C3^{II}-C3^I)/^\circ$	127.71	124.9	74.6	156.1
$\varphi_1(C10^I-C3^I-C3^{II}-C10^{II})/^\circ$	8.94	-161.6	-6.1	-169.0
$\varphi_2(C13^I-C10^I-C3^I-C3^{II})/^\circ$	175.75	172.2	172.8	-53.8
$\varphi_3(C3^I-C3^{II}-C10^{II}-C13^{II})/^\circ$	175.52	166.5	-179.3	-43.5

De los datos obtenidos y las perspectivas moleculares mostradas en las imágenes anteriores, se puede deducir que los conformeros que se han obtenido corresponden con *ttt* (*amC*₂-succínico), *tet* (*amC*₂-isoftálico), *ett* (DC₂-isoftálico) y *ett* (*amC*₂-urea). Los cuatro cristales presentan valores próximos de θ_1 y θ_2 . La conformación *ttt* en *amC*₂-succínico significa que barriga y espalda están situadas en dirección contraria como ya ha sido comentado anteriormente. El conformero *tet* del *amC*₂-isoftálico tiene las espaldas orientadas hacia la misma dirección, sin estar paralelas, dados los valores de los ángulos θ_1 y θ_2 . De estar los dos restos de esteroide en disposición paralela, estos ángulos deberían ser inferiores al menos a 34°. Las diferencias entre θ_i junto con el ángulo de torsión φ_2 , que implica la torsión a través de C3^I-C3^{II} para estos cuatro cristales, da evidencias de la secuencia de distancias entre los átomos de carbonos C10^I-C3^I-C3^{II}-C10^{II}. En *amC*₂-urea y *amC*₂-isoftálico, estos átomos de carbono forman un trapecio casi plano y regular. En el caso del *amC*₂-urea (Figura 2.79), el valor de $d(C10^I-C10^{II})$ es mayor que $d(C3^I-C3^{II})$ y, por el contrario, para en el *amC*₂-isoftálico, $d(C10^I-C10^{II})$ es menor que $d(C3^I-C3^{II})$ (Figura 2.81). Sin embargo, en el *amC*₂-succínico y en el DC₂-isoftálico tal trapecio no existe, dada la planaridad de las coordenadas de los átomos elegidos, y se forman dos triángulos virtuales (Figura 2.80 y Figura 2.82).

En el caso del *amC*₂-isoftálico, la disposición *tet* del conformero implica que los dos restos de esteroide se disponen en forma de "V" con las caras β de esteroide apuntando hacia la superficie cóncava hidrófoba. El anillo A y los dos grupos metilo (C19) junto con el puente forman una imagen especular. El huésped (acetato de etilo) se localiza entre las

capas “V” a lo largo del eje *a*, con los grupos metilo de la estructura huésped insertados entre dos restos aromáticos (vértice de la “V”; *Figura 2.81*). Estos anillos se sitúan a una distancia de 7.484 Å, y las distancias de los hidrógenos (CH₃)/anillo rondan los 2.9-3.3 Å, permitiendo una interacción σ-π que estabiliza el empaquetamiento. El átomo de carbono de estos grupos metilo forma casi una línea recta con los centroides de los dos grupos fenilo. El ángulo centroide-átomo de carbono-centroide es 159°. El grupo carbonilo del huésped se orienta hacia los dos átomos de nitrógeno de los enlaces amida formando enlaces de hidrógeno y fijando la posición de la molécula.

Tabla 2.28
Secuencia de distancias entre los átomos de carbono C10^I-C3^I-C3^{II}-C10^{II}.

Dímero	d(C10 ^I -C3 ^I)/Å	d(C3 ^I -C3 ^{II})/Å	d(C3 ^{II} -C10 ^{II})/Å	d(C10 ^I C10 ^{II})/Å
<i>amC</i> ₂ -urea	3.052	4.930	3.060	8.783
<i>amC</i> ₂ -succínico	3.030	8.259	3.028	12.707
<i>amC</i> ₂ -isofáltico	3.037	7.549	3.031	6.062
DC ₂ -isofáltico	2.989	9.713	3.001	15.475

Los conformeros *ett* del DC₂-isofáltico y *amC*₂-urea son muy diferentes entre sí. El primero tiene ángulos θ₁ y θ₂ altos lo que, junto con los ángulos de torsión φ₁ y φ₃, implica que los dos restos de esteroide se sitúan casi perpendiculares uno respecto al otro. El ángulo entre los dos planos verticales de 87.7° también lo confirma. Ahora los cuatro átomos de carbono (C10^I, C3^I, C3^{II}, C10^{II}) están casi en línea dado que d(C10^I-C10^{II}) = 15.475 Å está cerca de la suma d(C10^I-C3^I) + d(C3^I-C3^{II}) + d(C3^{II}-C10^{II}) = 15.703 Å (véase la *Tabla 2.28*), y los valores de θ₁ and θ₂ están cerca de 180°. La orientación α del sustituyente en la posición C3 de DC₂-isofáltico hace que sea una gran diferencia estructural respecto a la β de los amida derivados. Esto claramente afecta a los valores de θ_i y probablemente facilita la orientación lineal de los cuatro átomos de carbono C10^I, C3^I, C3^{II}, C10^{II}. El puente diéster es casi plano, incluso más que el puente diamida en *amC*₂-isofáltico. Estos dos hecho sugieren que el efecto de la orientación (α o β) del enlace es más importante que el efecto del grupo orgánico sin llegar al extremo del *amC*₂-urea como se verá a continuación.

En el caso del conformero *ett* del *amC*₂-urea, los ángulos θ₁ y θ₂ están próximos a los del conformero *ttt* del *amC*₂-succínico. Sin embargo los ángulos φ_i implican una posición casi paralela de los esteroides entre sí. Estructuralmente hablando, este dímero tiene unas características especiales pues el puente de unión entre los residuos biliares es la unidad molecular más reducida para tenerlos unidos mediante enlaces amida, por lo que los dos restos de esteroide están más limitados espacialmente. Así, al ser tan reducida la distancia entre las dos ramificaciones de la molécula (el valor de la distancia C3-C3' es menos del la mitad de los valores para los otros dímeros, *Tabla 2.28*) y que la estructura de la urea es plana, la disposición espacial mutua se ve muy restringida en comparación con la de los otros dímeros. En este caso cada brazo de esteroide puede girar en torno al enlace en posición β del C3-N, pero sus posibilidades de torsión se ven disminuidas. Esto favorece que ambas partes de la molécula se alineen de forma casi paralela, aunque la disposición no es simétrica (*Figura 2.83*).

En definitiva, se puede concluir que los cinco ángulos θ_i y φ_i definen cualquier conformero y que es posible valor muy diferentes para dímeros de esta naturaleza. Como no han sido publicados más cristales de dímeros cabeza-cabeza de ácidos biliares, no es posible presentar una discusión más general.

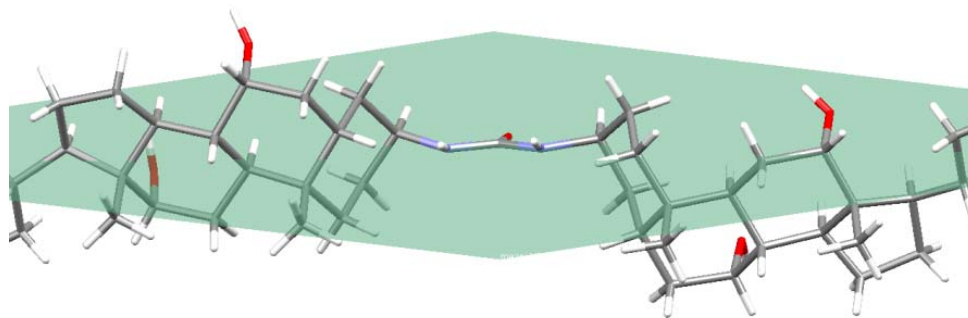


Figura 2.83. Perspectiva del conformero del amC₂-urea y el plano que contiene al sistema N-CO-N en verde.

2.5 CÁLCULO DEL ÁREA DE LA SECCIÓN MOLECULAR DEL RESTO DE ÁCIDO BILIAR.

El área de la sección molecular de un compuesto se estima a partir de su estructura. Tanto la modelización como la resolución de estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X han sido empleados con anterioridad, para el cálculo de dicha área, lo que ha sentado las bases para el estudio de las sales biliares desde diferentes campos. La actividad biológica, la surfactancia y los fenómenos de agregación de estos compuestos están relacionados con la conformación que adquiere la estructura anfipática del ácido biliar. Se ha establecido que la cara hidrófila α es convexa y la hidrófoba cóncava (Figura 2.84). Con el paso del tiempo el número de estructuras cristalinas resueltas mediante rayos X de ácidos biliares y derivados ha aumentado considerablemente. Esto genera una base de datos de la que pueden extraerse los valores medios para esta familia de compuestos que permitan predecir parámetros estructurales para compuestos de los que no se tienen cristales resueltos. La utilización de este tipo de datos implica que la molécula se encuentra en estado sólido y, en algún caso, la temperatura de trabajo fue reducida hasta los 100 K. Es de esperar que la estructura de la molécula en disolución y a temperatura de 298 K varíe ya que, por ejemplo, la cadena lateral es flexible, pero considerando la rigidez del esqueleto policíclico de los esteroides estos cambios, como se verá posteriormente, pueden ser despreciados.

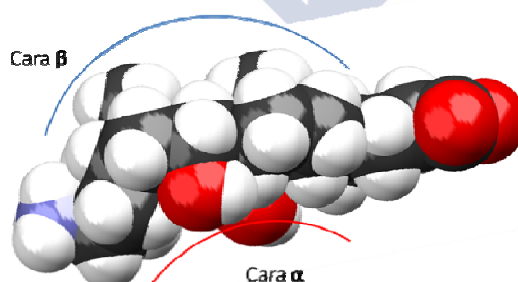


Figura 2.84. Perspectiva del 3-β-aminocolato mostrando las caras α y β .

A la hora de comparar el área de la sección molecular de distintos esteroides ha de tomarse una posición de referencia común para todos ellos. La parte hidrófila varía de unos ácidos biliares a otros, tanto en número de grupos hidroxílicos como en su posición, y no resulta pues idónea para una comparación. La parte hidrófoba de la molécula es una característica general para todos los ácidos biliares y condiciona su comportamiento cuando se encuentra en una interfase, dada su tendencia en disoluciones acuosas a

orientarse hacia la fase aérea. Como referencia se orienta la molécula con los tres anillos B, C y D en dirección al lector, de modo que la cara β del ácido biliar queda expuesta (*Figura 2.85*). Al mismo tiempo se busca que el plano del papel se corresponda con el plano horizontal del núcleo esteroide.¹²²

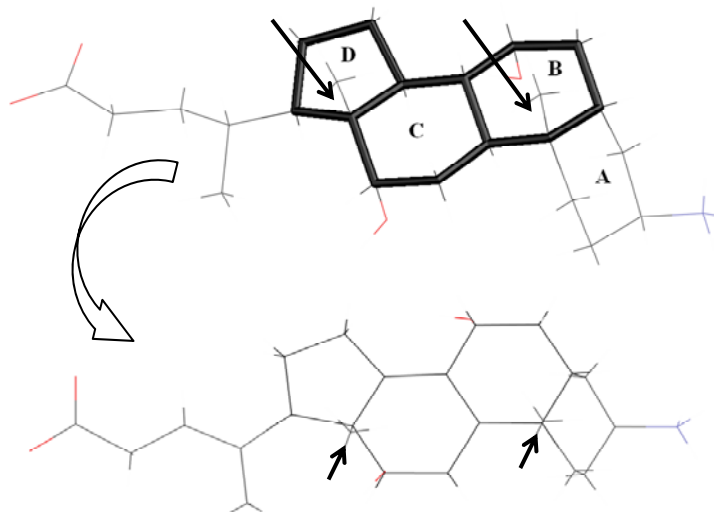


Figura 2.85. Plano horizontal del esteroide (correspondiente al plano del papel) y los puntos de referencia del esqueleto biliar utilizados para el cálculo de distancias.

Así que el primer paso para calcular el área consiste en determinar el mencionado plano para cada compuesto, al mismo tiempo que se deben localizar dos átomos contenidos en el mismo, medir la distancia entre ellos (en Å) para definir una escala de referencia al procesar la imagen digitalmente. Solo se considerara la estructura del esteroide y se ignorara aquellas partes de la molécula que no interesen. La imagen obtenida de la molécula en la posición definida se pasa a 2D y se calcula el área del contorno de la silueta generada.

De este modo se han estimado las áreas de tres secciones de la molécula. El área A se refiere a la estructura completa del esteroide sin el grupo carboxílico. El área B se refiere al esqueleto del esteroide sin cadena lateral y con la posición C3 libre (es decir, sin sustituyentes añadidos). El área C es la vista frontal de la molécula, obtenida por un giro de 90° hacia el lector. En este caso, como distancia de referencia, se toma la distancia entre los átomos C13 y C19 (correspondiente al grupo metilo; *Figura 2.86*).

Se han comparado las áreas obtenidas de 29 cristales de diferentes sales biliares y derivados. Los datos para compuestos dihidroxílicos se recogen en la *Tabla 2.29*.

Los ácidos chenodesoxicólico, ursodesoxicólico y desoxicólico así como sus isómeros muestran unos valores de área_A comprendidos entre 100 y 110 Å², según la localización y la orientación de los grupos hidroxilo. Sólo cuando la cadena lateral se encuentra plegada el área puede bajar hasta 95 Å² como en el caso del ácido desoxicólico.

El área_B muestra unos resultados menos dispersos, al eliminarse el factor “cola”, pero el efecto de los sustituyentes en β puede elevar el área hasta 87 Å² (isodesoxicólico). El valor del área_C está más afectado por la posición de la cadena lateral y esto hace que su variabilidad entre los diferentes ácidos biliares sea mayor.

Análogamente, la *Tabla 2.30* recoge los derivados del ácido cólico, los cuales muestran el mismo comportamiento de la tabla anterior. Por eso, es lógico incluir todos estos resultados para calcular el valor del área promedio forma general de un resto de un ácido biliar.

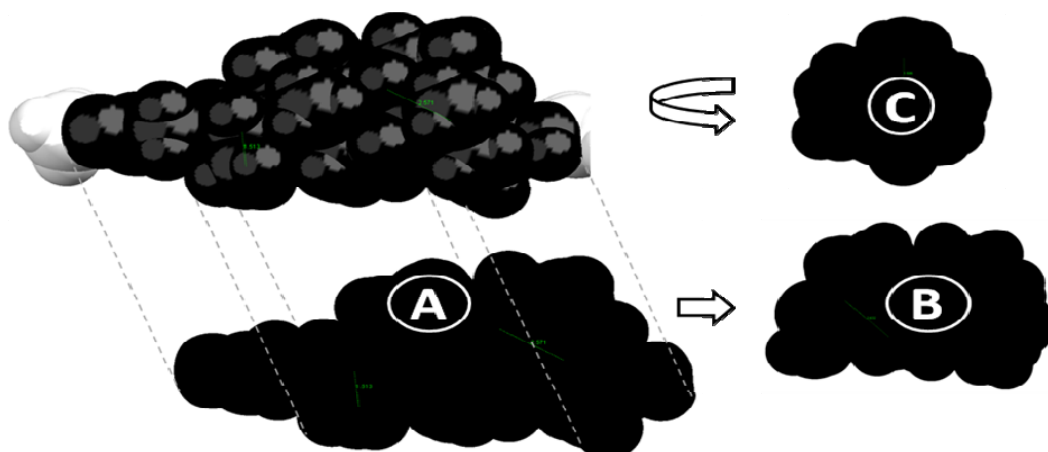


Figura 2.86. Perspectivas (spacefill) del resto de ácido cólico en el cristal de amC_2 -urea Ilustración del paso de 3D a 2D.

Tabla 2.29
Áreas estimadas de compuestos derivados de ácidos biliares de distinta naturaleza.

Compuesto	Posición sustituida			Posición Cola	Área _A (Å ²)	Área _B (Å ²)	Área _C (Å ²)
	C3	C7	C12				
Ac. Quenodesoxicólico	α	α	-	<i>estirada*</i>	99	81	52
Ac. Isoquenodesoxicólico	β	α	-	<i>estirada</i>	110	82	51
Ac. Ursodesoxicólico	α	β	-	<i>estirada</i>	101	85	59
Ac. isoursodesoxicólico	β	β	-	<i>estirada*</i>	104	82	52
Ac. Desoxicólico	α	-	α	<i>plegada</i>	95	81	55
Ac. Isodesoxicólico	α	-	β	<i>plegada</i>	100	87	56
3 B -12 α	β	-	α	<i>estirada</i>	109	83	50
3 B -12β	β	-	β	<i>estirada*</i>	100	82	56
3α-12-α	α	-	α	<i>Estirada</i>	105	83	52
amino24 carbamato	α	-	α	<i>estirada*</i>	108	82	61
DC ₂ -isofáltico (DCI)	β	-	α	<i>plegada</i>	97	82	47
(DCII)	β	-	α	<i>estirada</i>	101	82	45

El valor medio obtenido (Figura 2.87) para un ácido biliar muestra un área de sección molecular (área_A) de $103.1 \pm 4.0 \text{ \AA}^2$, valor que está un poco por encima de lo establecido en la literatura (entre $85\text{-}95 \text{ \AA}^2$). El área del resto de ácido biliar sin cadena lateral y con la posición C3 libre (área_B) muestra un resultado más homogéneo de $82.1 \pm 1.6 \text{ \AA}^2$. La sección frontal (área_C) tiene un valor medio de $51.1 \pm 3.2 \text{ \AA}^2$.

Estos resultados pueden aplicarse a otros compuestos de la misma naturaleza para poder estimar el área de la sección molecular cuando no se dispone de datos de difracción de rayos X. Para aquellas secciones de la molécula que no son parte del esteroide, como los puentes de unión, se harán extrapolaciones con fragmentos de la misma estructura de compuestos cristalizados de diferente procedencia (Tabla 2.31). En unos casos se ha utilizado cristales resueltos en el presente grupo de investigación pero también se ha recurrido a la bibliografía cuando ha sido necesario.

El error que se pueda cometer a la hora de utilizar estos resultados promedio para compararlos con los valores de las áreas superficiales obtenidas a través de la isoterma de Gibbs de los datos de tensión superficial, puede ignorarse por cuanto que sólo se pretende diferenciar entre las distintas posiciones que la molécula puede adquirir en la interfase y la diferencia entre tales valores es claramente superior al error que pudiera cometerse mediante el proceso de cálculo comentado. Los oligómeros de sales biliares que se

expondrán en esta tesis muestran unas aéreas estimadas de la molécula estirada considerablemente grande (*Tabla 2.32*), como cabría esperar.

Tabla 2.30
Áreas calculadas de compuestos derivados del ácido cólico.

Compuesto	Posición sustituida			Posición Cola	Área _A (Å ²)	Área _B (Å ²)	Área _C (Å ²)
	C3	C7	C12				
Ac. 3B-aminocólico	B	α	α	<i>estirada</i>	108	81	48
Ac. 24-aminocólico	α	α	α	<i>estirada</i>	104	83	50
carbamato	α	α	α	<i>estirada</i>	112	83	51
<i>amC</i> -dietilfosfato	B	α	α				
1				<i>plegada</i>	101	82	52
2				<i>plegada</i>	102	83	51
3				<i>plegada</i>	102	83	50
Ac. 3B Adam-cólico	B	α	α	<i>estirada*</i>	101	81	49
Ac. 3B suc-cólico	B	α	α	<i>estirada</i>	107	82	48
Ac. 3B Ph- cólico	B	α	α	<i>plegada</i>	100	80	52
<i>amC</i> -aminoisoftálico	B	α	α	<i>plegada</i>	101	83	54
Ac. 3B (1-4Ph)-cólico	B	α	α	<i>plegada</i>	98	83	50
Ac. 3 B-norvonano-cólico	B	α	α				
(acetona)				<i>estirada*</i>	108	81	50
(DMSO)				<i>estirada</i>	107	80	49
(propanol)				<i>estirada*</i>	98	80	53
Ac. 3B-terbutil-cólico	B	α	α	<i>estirada</i>	104	84	50
Ac. 3B-terbutifenil-cólico	B	α	α				
(acetona)				<i>estirada</i>	101	80	50
(Clorobenceno)				<i>estirada*</i>	104	82	50
<i>amC</i> ₂ -CO (CI)	B	α	α	<i>estirada</i>	103	82	50
(CII)	B	α	α	<i>estirada</i>	107	83	48
<i>amC</i> ₂ -succínico (CI)	B	α	α	<i>estirada</i>	103	79	49
(CII)	B	α	α	<i>estirada</i>	103	80	50
<i>amC</i> ₂ -isoftálico (CI)	B	α	α	<i>estirada*</i>	100	82	49
(CII)	B	α	α	<i>estirada</i>	107	83	49

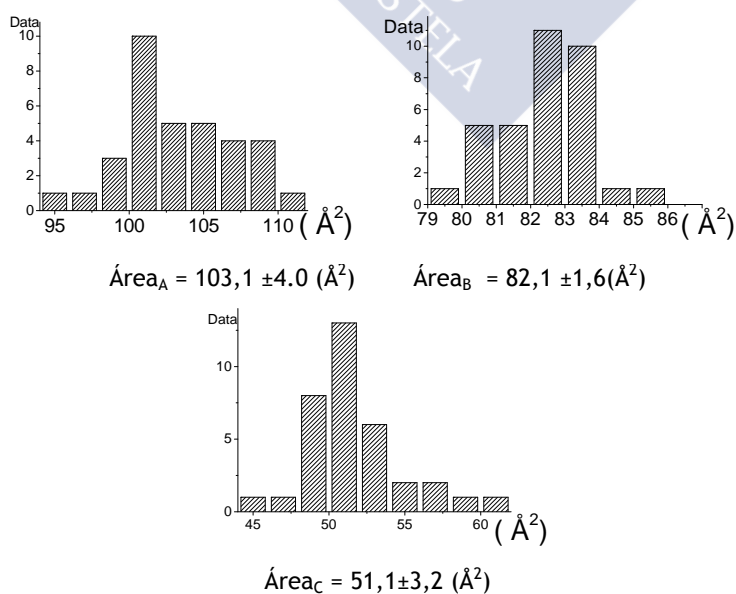


Figura 2.87. Histogramas de dispersión de datos de las tres aéreas consideradas.

Tabla 2.31

Áreas estimadas de los distintos puentes a partir de fragmentos de las estructuras de otros cristales.

diácido Puente	Ref.	Área _T (Å ²)	Área* (Å ²)
Ac. Iminodiacético	<i>suc-aminocolato</i>	33	
Ac. Succínico		28	
Ac. 5-aminoisoftálico	<i>monoarbac</i> <i>NUK431</i>	52 51	
Ac. Tereftálico	<i>Monoaromatico 1-4</i> <i>NUK431</i>	47 46 47	
Ac. isoftálico	<i>DC-Ph_(1,3)-DC</i>	47	
Protoporfirina (IX)	<i>CCDC-813456</i> ¹²⁶ <i>jo201568_si_002</i> ¹²⁷	173 176	62
tetrafenilporfirina TPP (197.0 ± 4.3 Å ²)	<i>CCDC-727779</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727780</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727781</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727782</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727783</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727784</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727785</i> ¹²⁸ <i>CCDC-727786</i> ¹²⁸ <i>CCDC-612946</i> ¹²⁹ <i>CCDC-612489</i> ¹³⁰ <i>CCDC-151412</i> ¹³¹	203 195 199 198 195 191 195 199 192 203 203	83 88 88 92

Tabla 2.32

Áreas estimadas de oligómeros derivados del ácido cólico a partir de valores estándar.

Compuesto	Nº de restos biliarios (x103 Å ²)	Área puente (Å ²)	Área _{Total} (Å ²)
<i>amC</i> ₂ -iminodiacético	2	33	239
<i>amC</i> ₂ -aminoisoftálico	2	52	258
<i>amC</i> ₂ -protoporfirina	2	175	381
<i>amC</i> ₂ , ²⁴ C -aminoisoftálico	3	51	360
<i>amC</i> ₂ , ²⁴ <i>amC</i> -aminoisoftálico	3	51	360
(<i>amC</i> ₂ -aminoisoftálico) ₂ -tereftálico	4	(52x2)+47	563
<i>amC</i> ₄ -TPPorfirina	4	197	609

Bibliografía

- (1) Mylius, F. *Ber.* **1887**, *20*, 1968.
- (2) Latschinoff, P. *Chem. Ber.* **1885**, *18*, 3039.
- (3) Wieland, H.; Sorge, H. *Z. Physiol. Chem.* **1916**, *97*, 1.
- (4) Kratky, O.; Giacomello, G. *Monatsh* **1936**, *69*, 427.
- (5) Rheinboldt, H.; O. König, O.; Otten, P. *Ann* **1929**, *473*, 249.
- (6) Sobotka, H. *Naturwiss* **1931**, *19*, 595.
- (7) Popovitz-Biro, R.; Chang, H. C.; Tang, C. P.; Shochet, N. R.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *Pure Appl. Chem.* **1980**, *52*, 2693.
- (8) Chang, H. C.; Popovitz-Biro, R.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 614.
- (9) Aoyama, H.; Miyazaki, K.; Sakamoto, M.; Omote, Y. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 333.

- (10) Chang, H. C.; Popovitz-Biro, R.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3883.
- (11) Miyata, M.; Takemoto, K. *J. Polymer Sci., Polymer Lett. Ed.* **1975**, *13*, 221.
- (12) Miyata, M.; Takemoto, K. *Angew. Makromol. Chem.* **1976**, *55*, 191.
- (13) Miyata, M.; Morioka, K.; Takemoto, K. *J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed.* **1977**, *15*, 2987.
- (14) Takemoto, K.; Miyata, M. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem.* **1980**, *C18*, 83.
- (15) Miyata, M.; Kitahara, Y.; Osaki, Y.; Takemoto, K. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1984**, *2*, 391.
- (16) Miyata, M.; Noma, F.; Okanishi, K.; Tsutsumi, H.; Takemoto, K. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **1987**, *5*, 249.
- (17) Miyata, M.; Tsuzuki, T.; Noma, F.; Takemoto, K.; Kamachi, M. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1988**, *9*, 45.
- (18) Takemoto, K.; Miyata, M. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1990**, *186*, 189.
- (19) Goonewardena, W.; Miyata, M.; Takemoto, K. *Polym. J.* **1991**, *23*, 1405.
- (20) Goonewardena, W.; Miyata, M.; Takemoto, K. *Polymer J.* **1993**, *25*, 731.
- (21) Audisio, G.; Silvani, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, *12*, 481.
- (22) Miyata, M.; Takemoto, K. *Polymer J.* **1977**, *9*, 111.
- (23) Miyata, M.; Shibakami, M.; Takemoto, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 655.
- (24) Miki, K.; Kasai, N.; Shibakami, M.; Takemoto, K.; Miyata, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1757.
- (25) Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 612.
- (26) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P. *Chem. Commun.* **2000**, 365.
- (27) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P. *Chem. Lett.* **2000**, 1246.
- (28) Froemming, K. H.; Sandmann, R. *Arch. Pharmaz.* **1970**, *303*, 371.
- (29) Giglio, E. In *Inclusion compounds of deoxycholic acid*; Atwood, J. L., Davies, J. E. D., MacNicol, D. D., Eds.; Academic Press: London, 1984, p 207.
- (30) Miyata, M.; Sada, K. In *Comprehensive supramolecular chemistry*; D. D. MacNicol, T., F., Bishop, R., Eds.; Elsevier: Oxford, 1996; Vol. 6, p 147.
- (31) Johnson, P. L.; Schaefer, J. P. *Acta Crystal.* **1972**, *28*, 3083.
- (32) Kato, K.; Aoki, Y.; Sugahara, M.; Tohnai, N.; Sada, K.; Miyata, M. *Chirality* **2003**, *15*, 53.
- (33) Jones, E. L.; Nassimbeni, L. R. *Acta Crystal.* **1990**, *B46*, 399.
- (34) Shibakami, M.; Sekiya, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *18*, 397.
- (35) Yoswathananont, N.; Sadaand, K.; Miyata, M. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2002**, *389*, 47.
- (36) Gdaniec, A.; Bytner, T.; Szyrzyng, M.; Polonski, T. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *40*, 243.
- (37) Nakano, K.; Sada, K.; Kurozumi, Y.; Miyata, M. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 209.
- (38) Yoswathananont, N.; Sada, K.; Miyata, M.; Akita, S.; Nakano, K. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 210.
- (39) Nakano, K.; Mochizuki, E.; Yasui, N.; Morioka, K.; Yamauchi, Y.; Kanehisa, N.; Kai, Y.; Yoswathananont, N.; Tohnai, N.; Sada, K.; Miyata, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2428.
- (40) Nakano, K.; Sada, K.; Nakagawa, K.; Aburaya, K.; Yoswathananont, N.; Tohnai, N.; Miyata, M. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1725.
- (41) Gdaniec, M.; Milewska, M. J.; Polonski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 392.
- (42) Szyrzyng, M.; Nowak, E.; Gdaniec, M.; Milewska, M. J.; Herman, A.; Polonski, T. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7380.

- (43) Sada, K.; Nakano, K.; Hirayama, K.; Miyata, M.; Sasaki, S.; Takemoto, K.; Kasai, N.; Kato, K.; Shigesato, M.; Miki, K. *Supramol. Chem.* **2001**, *13*, 35.
- (44) Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Polymer J.* **2001**, *33*, 172.
- (45) Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L. *J. Chem. Cryst.* **1994**, *24*, 783.
- (46) Gdaniec, M.; Polonski, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7353.
- (47) Shibakami, M.; Tamura, M.; Sekiya, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, *22*, 299.
- (48) Shibakami, M.; Tamura, M.; Sekiya, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4499.
- (49) Shibakami, M.; Tamura, M.; Sekiya, A. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, *22*, 155.
- (50) Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 623.
- (51) Kato, K.; Sugahara, M.; Tohnai, N.; Sada, K.; Miyata, M. *Crystal Growth Des.* **2004**, *4*, 263.
- (52) Bonamico, M.; Giacomello, G. *Gazzetta Chim. Ital.* **1962**, *1962*, 647.
- (53) Candeloro De Sanctis, S.; Coiro, V. M.; Giglio, E.; Pagliuca, S.; Pavel, N. V.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1978**, *B34*, 1928.
- (54) Lahav, M.; Leiserowitz, L.; Popovitz-Biro, R.; Tang, C.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2542.
- (55) Coiro, V. M.; D'Andrea, A.; Giglio, E. *Acta Crystal.* **1979**, *B35*, 2941.
- (56) Gallese, F.; Guarino, A.; Possagno, E. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, *14*, 55.
- (57) Cerrini, S.; Pochetti, G.; Gallese, F.; Possagno, E. *Acta Crystal.* **1993**, *C49*, 1087.
- (58) Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Pavel, V.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1972**, *B28*, 3656.
- (59) Damiani, A.; Giglio, E.; Morosoff, N.; Puliti, R.; Rosen, I. *Ricerca Scientifica* **1967**, *37*, 42.
- (60) Schaefer, J. P.; Reed, L. L. *Acta Crystal.* **1972**, *B28*, 1743.
- (61) Craven, B. M.; DeTitta, G. T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 530.
- (62) Hall, S. R.; Maslen, E. N.; Cooper, A. *Acta Crystal.* **1974**, *B30*, 1441.
- (63) Giglio, E.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1975**, *B31*, 743.
- (64) Friedman, N.; Lahav, M.; Leiserowitz, L.; Popovitz-Biro, R.; Tang, C.-P.; Zaretskii, Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1975**, 864.
- (65) Popovitz-Biro, R.; Tang, C. P.; Chang, H. C.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4043.
- (66) Tang, C. P.; Chang, H. C.; Popovitz-Biro, R.; Frolow, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L.; McMullan, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4058.
- (67) Weisinger-Lewin, Y.; Vaida, M.; Popovitz-Biro, R.; Chang, H. C.; Mannig, F.; Frolow, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1449.
- (68) Candeloro-De Sanctis, S.; Giglio, E.; Petri, F.; Quagliata, C. *Acta Crystal.* **1979**, *B35*, 226.
- (69) Candeloro d Sanctis, S.; Giglio, E. *Acta Crystal.* **1979**, *B35*, 2650.
- (70) D'Andrea, A.; Fedeli, W.; Giglio, E.; Mazza, F.; Pavel, N. V. *Acta Crystal.* **1981**, *B37*, 368.
- (71) Giglio, E. *J. Mol. Struct.* **1981**, *75*, 39.
- (72) Jones, J. G.; Schwarzbaum, S.; Lessinger, L.; Low, B. W. *Acta Cryst. Sect. B* **1982**, *B38*, 1207.
- (73) Padmanabhan, K.; Venkatesan, K.; Ramamurthy, V. *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2025.
- (74) Candeloro de Sanctis, S. *Acta Crystal.* **1983**, *B39*, 366.
- (75) Limmatvapirat, S.; Yamaguchi, K.; Yonemochi, E.; Oguchi, T.; Yamamoto, K. *Acta Crystal.* **1997**, *C53*, 803.

- (76) Inoue, K.; Kato, K.; Tohnai, N.; Miyata, M. *J. Polymer Sci. A* **2004**, *42*, 4648.
- (77) Miyata, M.; Shibakami, M.; Chirachanchai, S.; Takemoto, K.; Kasai, N.; Miki, K. *Nature* **1990**, *343*, 446.
- (78) Miki, K.; Kasai, N.; Shibakami, M.; Chirachanchai, S.; Takemoto, K.; Miyata, M. *Acta Crystallogr.* **1990**, *C46*, 2442.
- (79) Miki, K.; Masui, A.; Kasai, N.; Miyata, M.; Shibakami, M.; Takemoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6594.
- (80) Miyata, M.; Shibakami, M.; Goonewardena, W.; Takemoto, K. *Chem. Lett.* **1987**, 605.
- (81) Norton, D. A.; Haner, B. *Acta Crystal.* **1965**, *19*, 477.
- (82) Lessinger, L.; Low, B. W. *J. Crystallogr. Spectr. Res.* **1993**, *23*, 85.
- (83) Miyata, M.; Sada, K.; Hirayama, K.; Yasuda, Y.; Miki, K. *Supramol. Chem.* **1993**, *2*, 283.
- (84) Imashiro, F.; Kuwahara, D.; Terao, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 1759.
- (85) Lessinger, L. *Cryst. Struct. Commun.* **1982**, *11*, 1787.
- (86) Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Chem. Lett.* **1994**, 137.
- (87) Shibakami, M.; Sekiya, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 429.
- (88) Scott, J. L. *Supramol. Chem.* **1997**, *8*, 241.
- (89) Szyrskyng, M.; Nowak, E.; Gdaniec, M.; Milewska, M. J.; Polonski, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 103.
- (90) Scott, J. L. *Supramol. Chem.* **1997**, *8*, 231.
- (91) Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 953.
- (92) Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1996**, *276*, 129.
- (93) Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A* **1996**, *276*, 113.
- (94) Scott, J. L. *Supramol. Chem.* **1996**, *7*, 201.
- (95) Szyrskyng, M.; Nowak, E.; Gdaniec, M.; Milewska, M. J.; Polonski, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3257.
- (96) Harada, J.; Ogawa, K.; Tomoda, S. *Acta Crystal.* **1997**, *B53*, 662.
- (97) Coiro, V. M.; Giglio, E.; Mazza, F.; Pavel, N. V.; Pochetti, G. *Acta Crystal.* **1982**, *B38*, 2615.
- (98) Scott, J. L. *J. Chem. Crystal.* **1996**, *26*, 185.
- (99) Dastidar, P. *CrystEngComm* **2000**.
- (100) Sada, K.; Maeda, T.; Miyata, M. *Chem. Lett.* **1996**, 837.
- (101) Yoswathananont, N.; Chirachanchai, S.; Tashiro, K.; Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *CrystEngComm* **2001**, 1.
- (102) Nakano, K.; Katsuta, M.; Sada, K.; Miyata, M. *CrystEngComm* **2001**, *11*, 1.
- (103) Nowak, E.; Gdaniec, M.; Polonski, T. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 155.
- (104) Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Chem. Commun.* **1996**, 989.
- (105) Nakano, K.; Tani, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Progress Colloid Polymer Sci.* **1997**, *106*, 249.
- (106) Kato, K.; Inoue, K.; Tohnai, N.; Miyata, M. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2004**, *48*, 61.
- (107) Polonski, T.; Szyrskyng, M.; Gdaniec, M.; Nowak, E.; Herman, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 797.
- (108) Bertolasi, V.; Bortolini, O.; Fogagnolo, M.; Fantin, G.; Pedrini, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1479.

- (109) Caira, M. R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1403.
- (110) Nakamura, S.; Imashiro, F.; Takegoshi, K.; Terao, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8769.
- (111) Miyata, M.; Goonewardena, W.; Shibakami, M.; Takemoto, K.; Masui, A.; Miki, K.; Kasai, N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1140.
- (112) Miki, K.; Masui, A.; Kasai, N.; Goonewardena, W.; Shibakami, M.; Takemoto, K.; Miyata, M. *Acta Crystal.* **1992**, *C48*, 503.
- (113) Miki, K.; Masui, A.; Kasai, N.; Miyata, M.; Goonewardena, W.; Shibakami, M.; Takemoto, K. *Acta Crystal.* **1989**, *C45*, 79.
- (114) Scott, J. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 495.
- (115) Sugahara, M.; Sada, K.; Hirose, J.; Miyata, M. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* **2001**, *356*, 155.
- (116) Sada, K.; Sugahara, M.; Nakahata, Y.; Yasuda, Y.; Nishio, A.; Miyata, M. *Chem. Lett.* **1998**, 31.
- (117) Miyata, M.; Sada, K.; Miyake, Y. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* **1998**, *313*, 173.
- (118) Sada, K.; Sugahara, M.; Kato, K.; Miyata, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4386.
- (119) Mejjide, F.; Antelo, A.; Alvarez, M.; Soto, V. H.; Trillo, J. V.; Jover, A.; Vázquez Tato, J. *Crystal Growth Des.* **2011**, *11*, 356.
- (120) Altona, C.; Geise, H. J.; Romers, C. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 13.
- (121) Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* **2006**.
- (122) Alvarez Alcalde, M.; Jover, A.; Carrazana, J.; Mejjide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. *Steroids* **2007**, *72*, 535.
- (123) Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525.
- (124) Haibo, L.; Jianmin, G.; R, L. S.; David, S. Y.; Lystranne, M.; T, K. E. *Science* **2003**, *302*, 868.
- (125) Soto, V. H.; Alvarez, M.; Mejjide, F.; Trillo, J. V.; Antelo, A.; Jover, A.; Galantini, L.; Vázquez Tato, J. *Steroids* **2012**, *77*, 1228.
- (126) Bohle, D. S. D., Erin L. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 4411.
- (127) Uchoa, A. F.; de Oliveira, K. T.; Baptista, M. S.; Bortoluzzi, A. J.; Yamamoto, Y.; Serra, O. A. *J. Org. Chem* **2011**, *76*, 8824.
- (128) Chen, W.; Fukuzumi, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 5494.
- (129) George, S.; Lipstman, S.; Goldberg, I. *Crystal Growth Des.* **2006**, *6*, 2651.
- (130) Goldberg, I.; Muniappan, S.; George, S.; Lipstman, S. *CrystEngComm* **2006**, *8*, 784.
- (131) Kempe, R. Z. *Anorg. Allg. Chem.* **2005**, *631*, 1038.

3 DÍMEROS DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la agregación de compuestos derivados de sales biliares naturales en tres condiciones experimentales diferentes: en disolución reguladora de carbonato/bicarbonato (sobre todo en cantidades equimolares de ambos componentes, pH 10.25), en disolución de hidróxido sódico (normalmente con el electrolito inerte NaCl para fijar una determinada fuerza iónica) y en agua al pH natural del compuesto. Esta última situación se ha usado en muy pocas ocasiones por dos motivos principales:

- 1º) No garantizar una estricta constancia del pH al variar la concentración del compuesto. Tal hecho puede suponer cambios en su estado de disociación y afectar a la propia agregación.¹⁻²
- 2º) Introducir además una incertidumbre en el valor del prefactor n de la ecuación de Gibbs que permite la determinación de la concentración superficial de exceso, hecho que no sucede en las otras dos condiciones experimentales ya que se verifica que la concentración de iones inertes es mucho mayor que la del propio surfactante (*vide infra*). Esto tiene particular incidencia en la determinación del área molecular en la interfase aire-agua.

Por lo tanto, no debe extrañar que a lo largo de estos capítulos se describan experiencias diseñadas en cualquiera de estas tres condiciones experimentales incluso para el mismo compuesto objeto de estudio.

En este capítulo se comentan los fenómenos de agregación en medio acuoso de nuevos dímeros derivados del ácido cólico sintetizados. Los residuos biliares están ligados a un puente de unión mediante enlaces amida, habiendo utilizado para tal fin el ácido iminodiacético, el ácido 5-aminoisoftálico y la protoporfirina IX (*Figura 3.1*). En el capítulo siguiente se comentarán los derivados trímeros y tetrámeros.

Dado que el ácido cólico pertenece a la familia de las sales biliares, que son importantes surfactantes biológicos, es de esperar que los nuevos derivados se comporten también como tales. En primer lugar, se expondrán los resultados del estudio de la tensión superficial y, posteriormente, los correspondientes a la dispersión de luz láser en medio acuoso y microscopia. Mediante estas últimas técnicas, se espera poder obtener información sobre la forma y el tamaño de las partículas/agregados que se formen.

3.1 ÁCIDO AMC_2 -IMINODIACÉTICO.

Tensión superficial

Las disoluciones utilizadas para el estudio de la tensión superficial fueron preparadas utilizando el método de adición-extracción, siendo 10 y 3 ml los volúmenes inicial y de dilución, respectivamente.³ Las medidas se llevaron a cabo a 25°C mediante un tensiómetro digital equipado con un plato de Whilhelmy (*Apéndice B, sección B.1*). Este procedimiento fue aplicado a todos los compuestos por lo que se omitirá en el futuro.

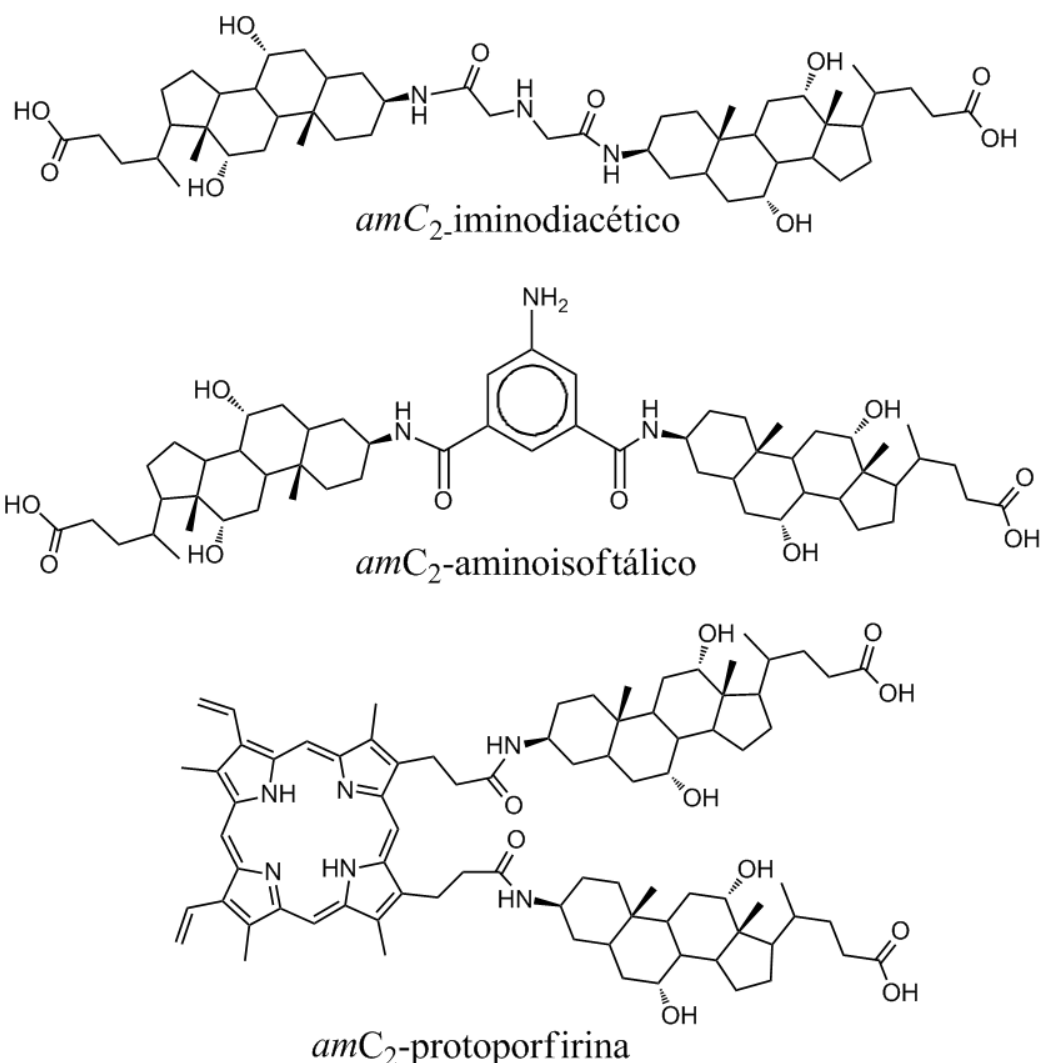


Figura 3.1. Estructuras de los dímeros derivados del ácido cólico utilizando como puente de unión el ácido iminodiacético, ácido aminoisofáltico y la protoporfirina (IX).

La Figura 3.2, que resume tres experiencias realizadas en disolución acuosa (NaCl 0.09 M y NaOH 0.01 M) partiendo de una concentración inicial 5×10^{-3} M, muestra la tensión superficial, γ , frente al logaritmo neperiano de la concentración del surfactante. El pH de trabajo se mantuvo elevado para evitar la presencia de dímero sin disociar. El punto de corte de las dos líneas rectas, trazadas a partir de los datos experimentales, permite estimar la concentración de agregación crítica (*cac*) del compuesto. El valor obtenido es 1×10^{-4} M. El valor de γ por encima de la *cac* es comparable a los obtenidos para otras sales biliares.⁴ Si se atiende al valor de la *cac*, el dímero es mejor surfactante que la mayoría de las sales biliares naturales.

El comportamiento superficial de la molécula fue analizado mediante la ecuación de Gibbs (Ecuación B.08, véase el Apéndice B):

$$\bar{\Gamma} = -\frac{1}{nRT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C} \right)_{C_s} \quad n = \left(\nu_- + \frac{\nu_+^2}{\nu_+ + \nu_+^s \frac{C_s}{c}} \right) \quad [\text{B.08}]$$

En esta ecuación el factor n depende de la estequiometría del surfactante (ν_+ , ν_-) y también de la estequiometría (ν_+^S) y la concentración de los electrolitos inertes añadidos (c_s).⁵⁻⁷ El conocimiento de la concentración superficial de exceso, $\bar{\Gamma}$, permite calcular el área molecular en la interfase líquido/aire, a_o (ecuación B.09). La elevada concentración salina utilizada permite asegurar un gran exceso de iones en disolución respecto a la concentración del surfactante, con lo que $n = 1$.⁵ Los resultados del cálculo de las concentraciones superficiales de exceso y las áreas moleculares en la interfase se muestran en la *Tabla 3.1*.

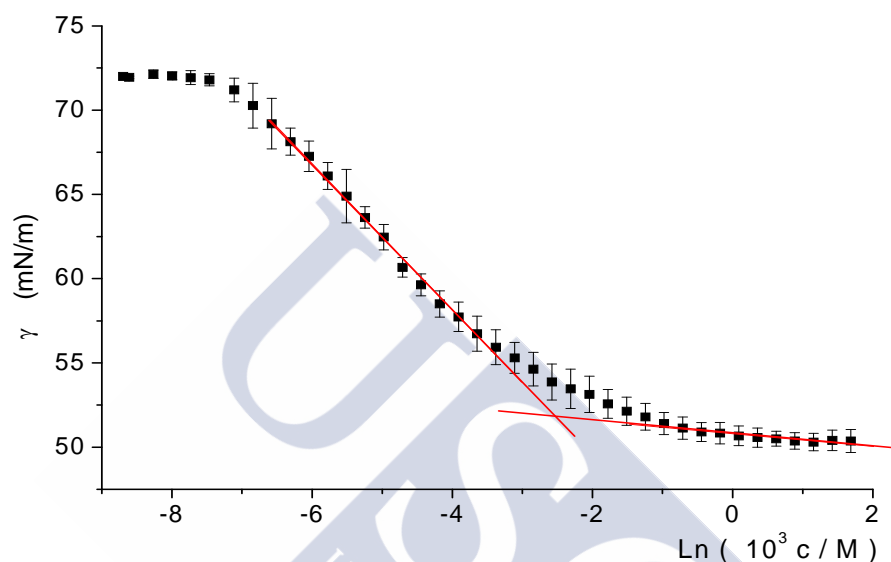


Figura 3.2. Variación de la tensión superficial con la concentración de sal de amC_2 -iminodiacético. Datos obtenidos a 25 °C en disolución acuosa de NaCl 0.09 M de NaCl y NaOH 0.01 M.

Tabla 3.1

Propiedades superficiales determinadas a partir de las medidas de tensión superficial a 25°C.

Disolución amC_2 -iminodiacético	pH	$10^3 c_{ac}$ (M)	$10^7 \bar{\Gamma}$ (mol m ⁻²)	a_o (Å ²)
[NaOH + NaCl] = 0.1 M	11.65	0.10	16.06	103

El área de la sección molecular que se puede estimar para el dímero amC_2 -iminodiacético a partir de las consideraciones realizadas en la sección 2.5 es de 239 Å². Este valor, que corresponde a una disposición de la molécula estirada en la interfase (*Figura 3.3, arriba*), es considerablemente mayor que el valor del área superficial por molécula determinado experimentalmente (*Tabla 3.1*), el cual es igual a la sección molecular calculada para un único resto de esteroide en disposición plana (103 Å²). Los resultados obtenidos sugieren que en la interfase se forma una multicapa, probablemente una bi- o tri-capa, tal y como ha sido propuesto para los ácidos litocólico y desoxicólico.⁸ Alternativamente, si los restos de ácido cólico se plegasen enfrentando sus caras β (*Figura 3.3, abajo*), el área molecular disminuiría hasta aproximadamente el doble del área mínima del esteroide en posición apical ($A_c = 51$ Å²; *Tabla 2.29*). Los datos termodinámicos no permiten discernir entre ambas posibilidades.

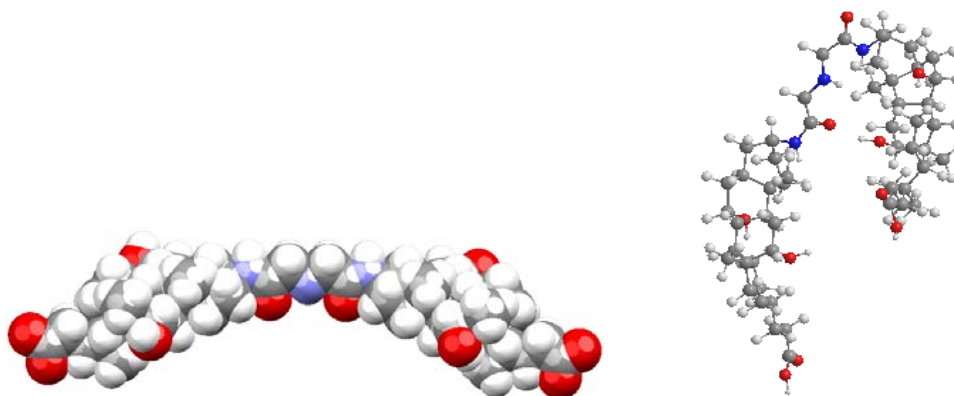


Figura 3.3. Representaciones en 3D del *amC₇*-iminoacético realizadas mediante un sencillo software de dibujo de moléculas. Arriba: posición estirada. Abajo: plegada.

Dispersión de luz láser.

Se hicieron medidas de dispersión de luz de las que se obtuvieron los diámetros efectivos de los agregados a distintas concentraciones y su evolución con el tiempo. Una vez preparadas las muestras se filtraban inmediatamente a través de un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro. Las medidas se realizaron a un ángulo de 90°, utilizando en la mayoría de los casos el pin 100 en el detector. Los resultados se recogen en la *Figura 3.4* para una disolución de *amC₂*-iminodiacético 0.0112 M en presencia de NaOH 0.01 M, transcurridos 60 min desde su preparación dado que transcurridas 24-48 horas, el producto acaba precipitando, debido al enorme crecimiento del agregado.

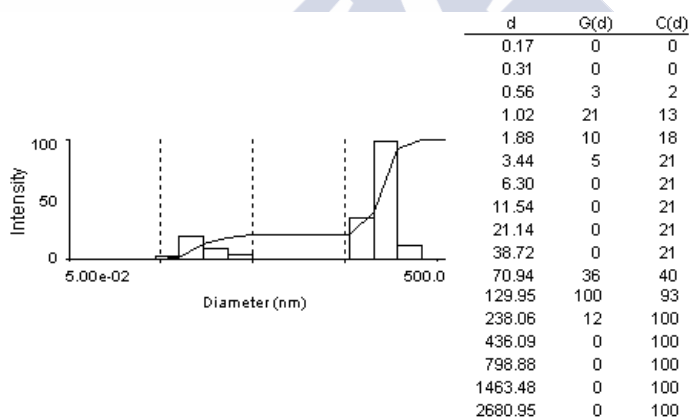


Figura 3.4. Intensidad de luz dispersada vs diámetro de partícula (CONTIN) del dímero *amC₂*-iminodiacético 0.0112 M y NaOH 0.01 M transcurrida una hora desde su preparación.

El análisis CONTIN de las medidas realizadas indica una población, mayoritaria en número de partículas, entre 0.5 y 3.5 nm de diámetro, valores compatibles con la formación de micelas de pequeño tamaño, y una pequeña población de partículas con un tamaño comprendido en el intervalo 70-240 nm.

Se repitió un nuevo experimento aumentando la fuerza iónica (que permite reducir las interacciones electrostáticas entre los agregados) y reduciendo a la mitad la concentración de surfactante ($[\text{amC}_2\text{-iminodiacético}] = 6.4 \times 10^{-3}$ M en presencia de NaCl 0.04 M y NaOH 0.01 M). En estas condiciones, se comprobó que el tamaño de las partículas aumentaba de forma más lenta con el tiempo. La *Figura 3.5* muestra el análisis CONTIN de la intensidad de luz dispersada al cabo de 4 horas, habiéndose observado una mayor estabilidad de la disolución. La población mayoritaria, en número de partículas, corresponde de nuevo a un tamaño micelar, mientras que el tamaño de la población mayor alcanzó los 390 nm.

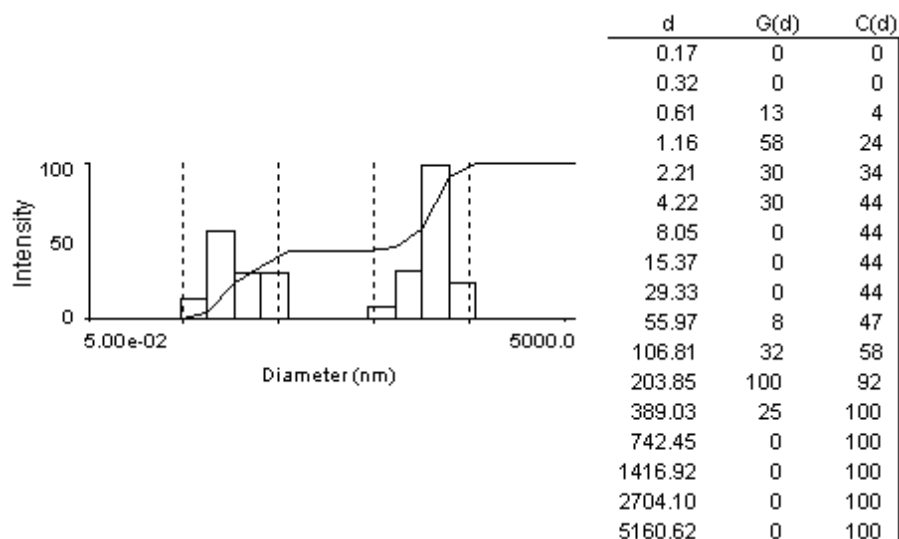


Figura 3.5. Análisis CONTIN intensidad/diámetro de $[amC_2\text{-iminodiacético}] = 6.4 \times 10^{-3}$ M en presencia de $[\text{NaCl}] = 0.04$ M y $[\text{NaOH}] = 0.01$ M a las cuatro horas de su preparación.

Análisis de la forma y el tamaño mediante microscopía.

Para observar la geometría de los agregados, se hicieron medidas con distintas técnicas de microscopía. La *Figura 3.6* muestra los resultados obtenidos mediante AFM (microscopía de fuerza atómica), en modo de contacto, habiendo partido de una disolución del dímero $amC_2\text{-iminodiacético}$ de concentración 1×10^{-3} M en agua y transcurridas 24 h desde su preparación. Del análisis de las imágenes obtenidas se deduce que los agregados obtenidos son polidispersos, su forma es esférica-globular y parecen tener tendencia a agregarse para originar agregados de mayor tamaño. El histograma correspondiente al tamaño de las partículas se muestra en la *Figura 3.7, derecha*. De un total de 38 partículas analizadas al azar, se ha calculado un diámetro medio igual a 151 nm, valor compatible con el deducido de las medidas de dispersión de luz.

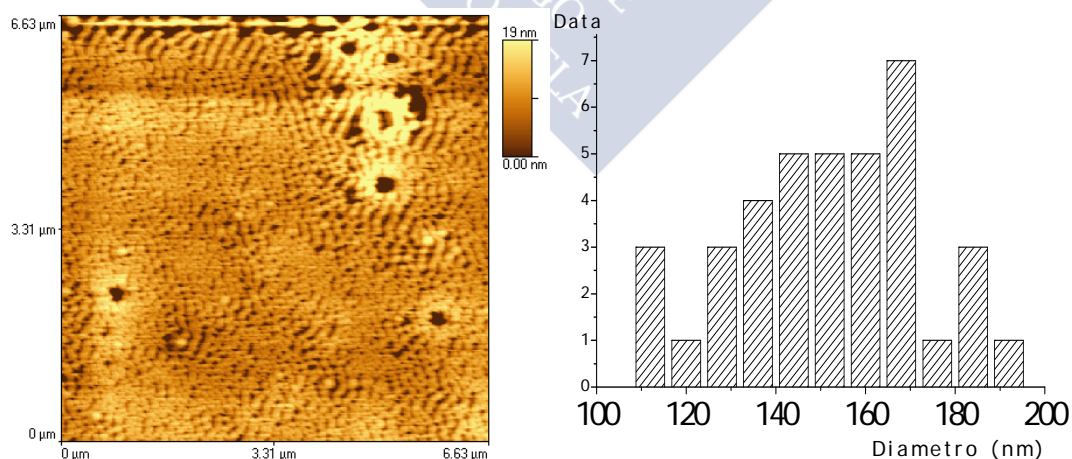


Figura 3.6. *Izquierda*: Imagen AFM de los agregados del dímero $amC_2\text{-iminodiacético}$ Concentración 1×10^{-3} M después de 24 horas. *Derecha*: histograma del tamaño.

Con el fin de contrastar los resultados anteriores, se tomaron imágenes TEM partiendo de una concentración de 0.02 M en presencia de NaCl 0.015 M. La *Figura 3.7* muestra algunas imágenes obtenidas para una disolución recién preparada. El histograma

de tamaños se representa en la *Figura 3.8*, donde se observa un máximo a 25-35 nm, y se detectan algunas partículas de más de 150 nm.

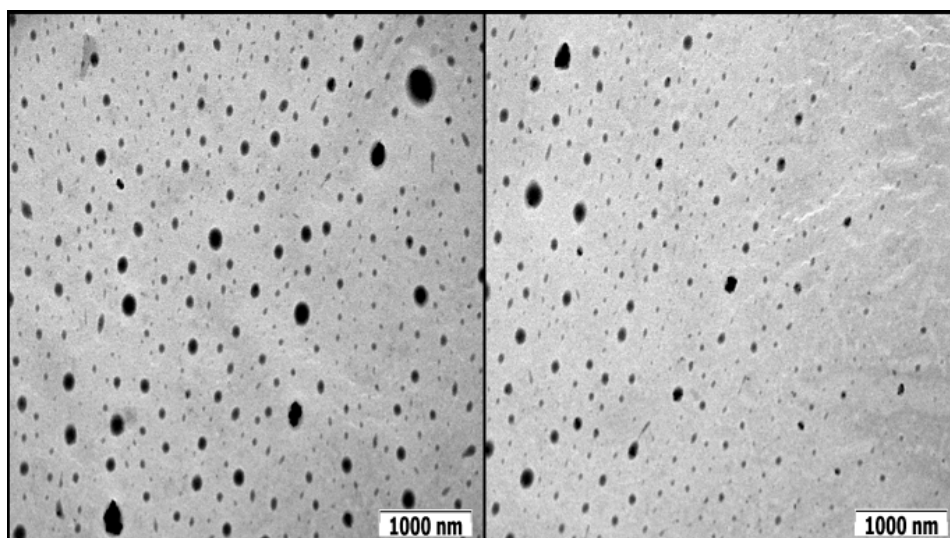


Figura 3.7. Imágenes TEM del amC_2 -iminodiacético de concentración 0.02 M con $[NaCl]=0.015$ M recién preparada.

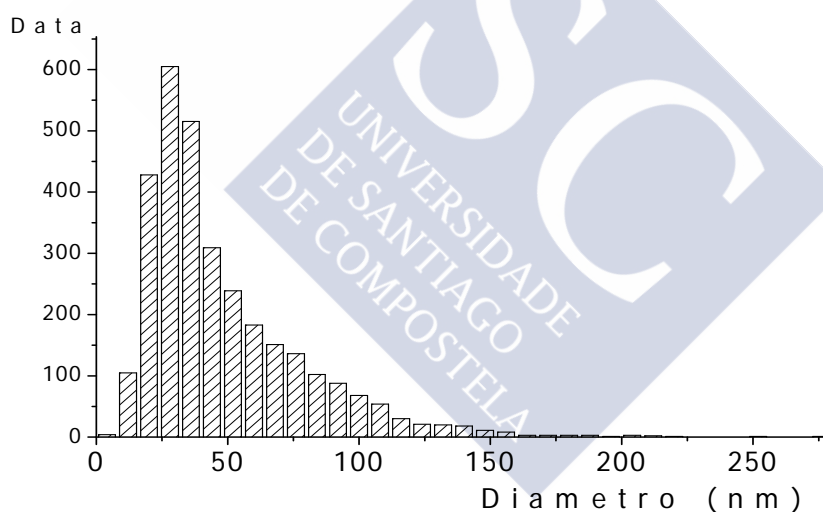


Figura 3.8. Histograma de dispersión de diámetros medidos a partir de las imágenes TEM de la disolución de la *Figura 3.7*.

Se tomaron nuevas imágenes transcurridas 24 horas desde la preparación de la muestra. La *Figura 3.9* recoge algunas imágenes obtenidas, las dos superiores corresponden a una disolución de amC_2 -iminodiacético 4.85×10^{-3} M con 0.5% de azida sódica (que previene el crecimiento de hongos) y las dos inferiores a una disolución 5.06×10^{-3} M. Al no observar diferencias significativas, a la hora de analizar los tamaños de las partículas, las dos experiencias se trataron como una sola. El histograma se representa en la misma figura. La población más abundante se encuentra en el intervalo 50-350 nm con un máximo en torno a 200 nm. Por encima de 400 nm se observa un número muy inferior de partículas.

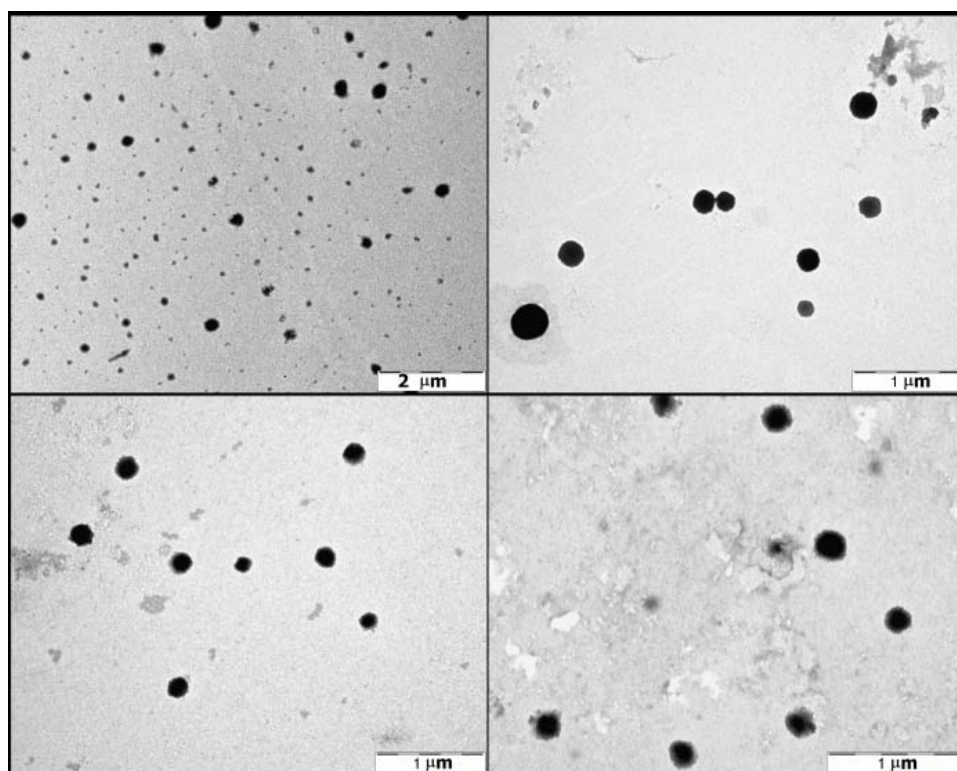


Figura 3.9. Imágenes TEM e histograma de dispersión de diámetros medidos a partir de imágenes TEM del dímero amC_2 -iminodiacético transcurridas 24 horas desde la preparación de la muestra.

Dado que los tamaños determinados mediante las distintas técnicas son compatibles con la formación de vesículas (los valores que pueden verse en la bibliografía para vesículas abarcan desde 20 hasta cientos de nm), a modo de referencia y efectos comparativos, en la *Figura 3.10* se recogen algunas imágenes de vesículas tomadas de la bibliografía. Las vesículas son objeto de atención de numerosos estudios debido a las propiedades estructurales que presentan⁹⁻¹⁵ y la naturaleza de los compuestos que las originan es muy variada. Tienen un potencial muy alto para el transporte a escala nanométrica por lo que su aplicabilidad varía desde los campos de la Biología, la Medicina y la Farmacología hasta la industria. Las imágenes de vesículas que se muestran en la *Figura 3.10* muestran una acusada diferencia de los contrastes correspondientes al interior y a la membrana de la vesícula. Las razones por la que aparece más oscuro el borde de la vesícula están asociadas a su curvatura, tal y como han discutido Coldren *et al.*¹⁶ El interior de la vesícula puede variar en intensidad según el contenido de ésta. Esta marcada diferencia no se observan en las partículas del dímero objeto de estudio, sino que el agregado muestra una intensidad prácticamente constante en toda su estructura. Además, su superficie exterior es irregular por lo que la naturaleza de los agregados no parece ser vesicular sino globular. La *Figura 3.11* muestra dos ejemplos inequívocos del carácter globular de los agregados.

Como se ha indicado, ocasionalmente aparecen partículas de tamaño superior a 400 nm que parecen estar formadas por la aglomeración de partículas de menor tamaño (aproximadamente 100 nm). Esta asociación puede originar formaciones tipo rosario (*Figura 3.12A*, izquierda), globulares (*Figura 3.12A*, derecha) o incluso tipo donuts (*Figura 3.12B*, derecha). Obviamente, la aglomeración exige la aproximación de las partículas pequeñas que pueden aparecer como fusionadas o no (*Figura 3.12B*, izquierda). La velocidad de este proceso es relativamente rápida cuando se la compara con el originado por otras moléculas (*vide infra*).

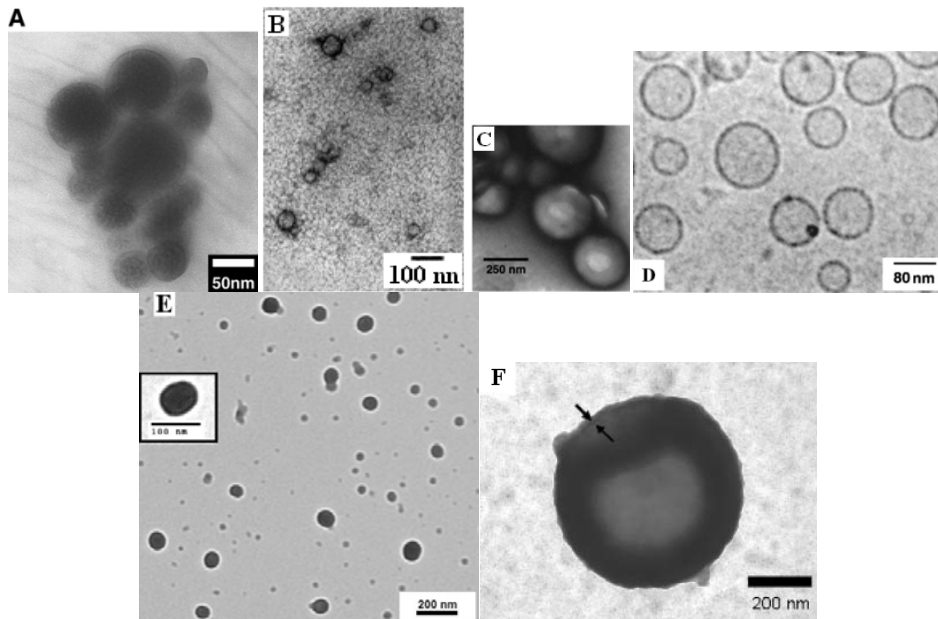


Figura 3.10. Imágenes TEM mostrando estructuras de vesículas: A)¹⁷. B)¹⁸. C)¹⁹. D)²⁰. E)²¹. F)²².

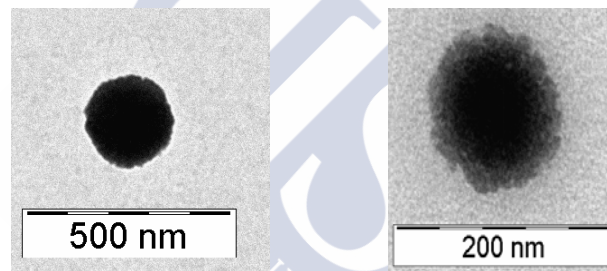


Figura 3.11. Imágenes TEM de los agregados originados por el dímero amC_{γ} -iminoacético.

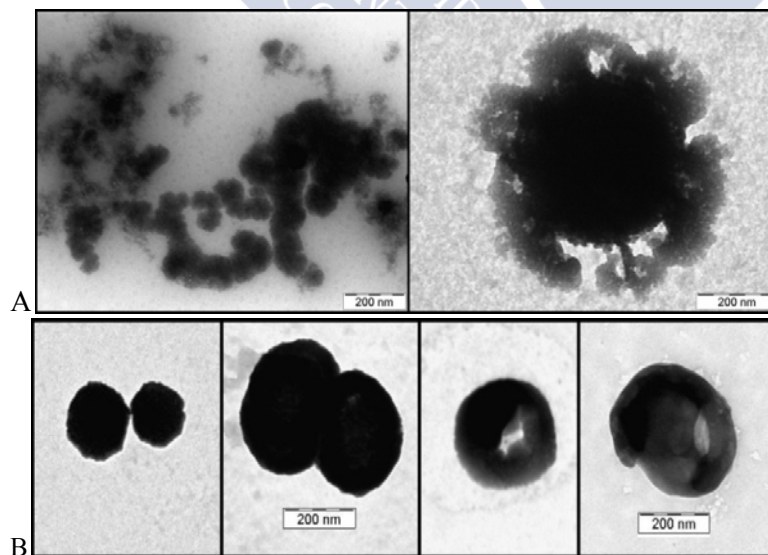


Figura 3.12. Imágenes TEM de los agregados formados por el amC_{γ} -iminodiacético. A) Agregados de gran tamaño tipo rosario (izquierda) y globulares (derecha). B) Agregados tipo donuts (derecha) y partículas aparentemente fusionadas o muy próximas entre sí (izquierda).

Si las condiciones en la disolución son adecuadas, pueden originarse núcleos de cristalización que con el tiempo aumentan de tamaño (Figura 3.13). Desafortunadamente, incluso después de haber utilizado disolventes orgánicos, no se han conseguido cristales

de tamaño suficiente que permitieran afrontar su resolución estructural mediante difracción de rayos X.

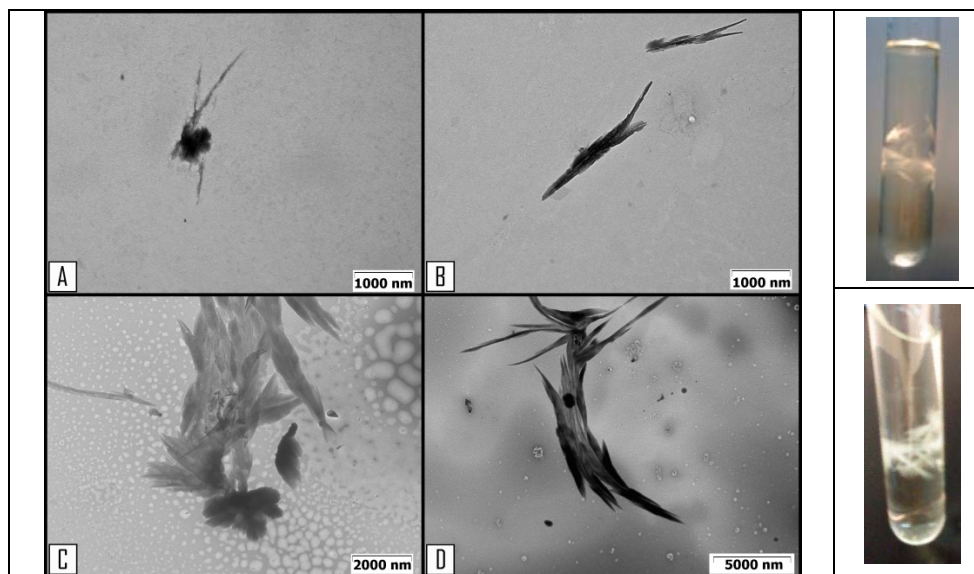


Figura 3.13. Imágenes TEM de cristales del *amC₂*-iminodiacético. Tiempo/días: A)1, B) 7, C y D) 17. Derecha: Fotografías de cristales en suspensión en una mezcla metanol/acetato de etilo.

Los resultados anteriores sugieren que el *amC₂*-iminodiacético sufre procesos de agregación que dependen de las condiciones experimentales y el tiempo.

3.2 ÁCIDO *amC₂*-AMINOISOFTÁLICO.

Tensión superficial

Los datos obtenidos en presencia de disolución reguladora carbonato/bicarbonato 0.1 M (pH 9.60) para el dímero *amC₂*-aminoisofáltico, se representan en la Figura 3.14. El valor determinado para la *cac* es 1.4×10^{-4} M.

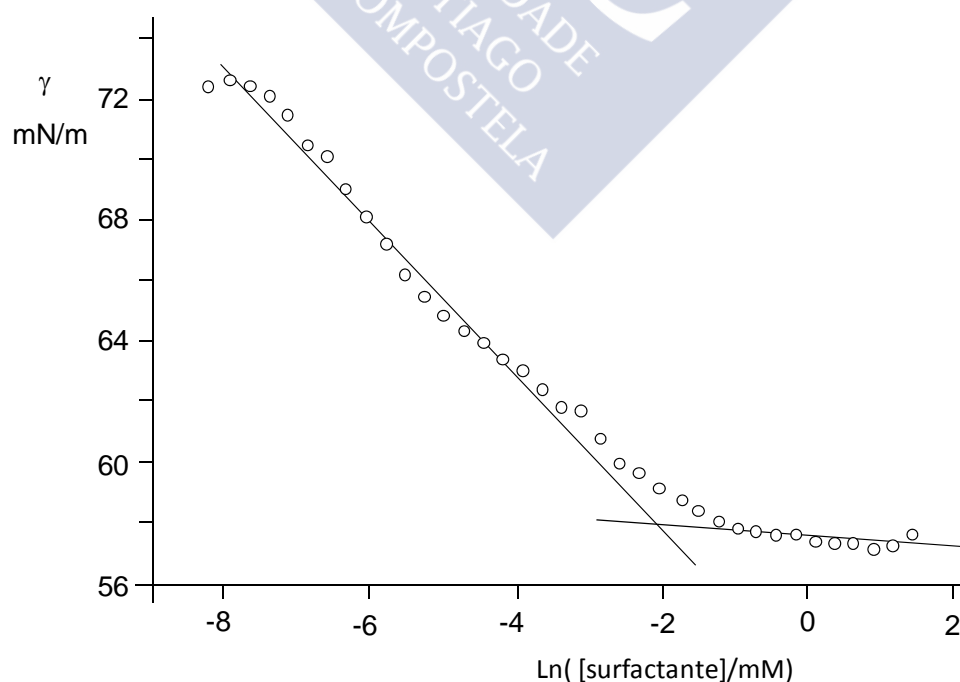


Figura 3.14. Tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración de la sal del dímero *amC₂*-aminoisofáltico en disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0.1 M (pH 9.60). Temperatura 25 °C.

Como se expuso anteriormente, a partir de la pendiente de la recta correspondiente a la región donde sólo existen monómeros, se pueden estimar los parámetros habituales que se recogen en la *Tabla 3.2*. Así, el área molecular obtenida es $a_o = 168 \text{ \AA}^2$, inferior a la sección molecular que se puede calcular para una configuración plana de la molécula igual a 258 \AA^2 (*Figura 3.15*).

Tabla 3.2
Propiedades superficiales del amC_2 -aminoisofáltico determinadas a 25°C por medida de la de tensión superficial.

<i>Disolución</i>	pH	c_{ac} ($\times 10^4$ M)	$\Gamma \times 10^7$ (mol \times m $^{-2}$)	a_o (\AA^2)
[NaHCO $_3$ /Na $_2$ CO $_3$]= 0.1 M	9.60	1.4	9.9	168

Dadas la rigidez del núcleo esteroide, la planaridad de los enlaces amida entre aquel y el puente de unión, y la rigidez de este último (derivado del ácido 5-aminoisofáltico), se puede proponer la formación de una bicapa en la interfase aire/agua.

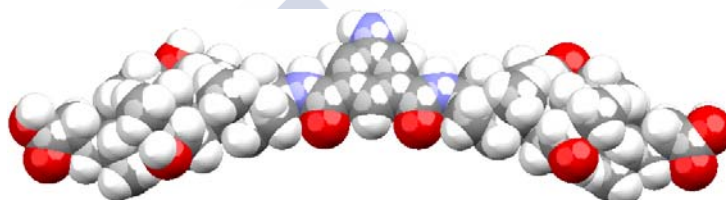


Figura 3.15. Representación en 3D del amC_2 -aminoisofáltico. Con esta orientación el área de la sección molecular es 258 \AA^2 .

Dispersión de luz

Se realizaron medidas de dispersión de luz de una disolución del surfactante, en su forma de sal sódica, 0.010 M, en presencia de NaCl (0.090 M) y de NaOH (0.01 M). Las medidas se realizaron a los 0, 1, 2, 3, 4 y 14 días. La *Tabla 3.3* muestra un aumento progresivo del diámetro efectivo con el tiempo. Este resultado muestra una diferencia en la velocidad de los procesos de agregación para los dímeros amC_2 -iminodiacético y amC_2 -aminoisofáltico. De hecho, los agregados del primero de los dímeros, cuya velocidad de asociación es mayor, precipitan a partir de las 24-48 horas de su preparación, mientras que el dímero amC_2 -aminoisofáltico permanece suspendido durante, al menos, un periodo de 14 días.

Tabla 3.3

Parámetros obtenidos por dispersión de luz para amC_2 -aminoisofáltico 0.01 M y fuerza iónica 0.1 M, transcurridos 0, 1, 2, 3, 4 y 14 días desde su preparación.

Tiempo (día)	0	1	2	3	4	14
First Delay:	200.0 nsec	100.0 nsec	1.0 μ sec	1.0 μ sec	2.4 μ sec	2.4 μ sec
Last Delay:	10.0 msec	10.0 msec	100.0 msec	100.0 msec	20.0 msec	20.0 msec
Elapsed Time:	00:04:00	00:04:00	00:04:03	00:06:02	00:04:01	00:04:01
Angle:	90.0	90.0	90.0	90.0	90.0	90.0
Samples:	4.6236e+07	4.6465e+07	4.4794e+07	6.6847e+07	4.4138e+07	4.4171e+07
Atot:	3.2191e+07	1.2135e+07	2.6566e+07	3.2707e+07	1.5559e+07	2.0627e+07
A CR (avg.):	139.2 kcps	52.2 kcps	118.6 kcps	97.9 kcps	70.5 kcps	93.4 kcps
M. Base:	2.2414e+07	3.1699e+06	1.5755e+07	1.5992e+07	5.4829e+06	9.6471e+06
C. Base:	2.2412e+07	3.1691e+06	1.5756e+07	1.6003e+07	5.4848e+06	9.6328e+06
Base diff:	0.008%	0.026%	-0.005%	-0.064%	-0.035%	0.149%
Eff Dia:	22.7 nm	121.0 nm	183.3 nm	226.6 nm	276.3 nm	476.6 nm
Poly:	0.180	0.351	0.264	0.245	0.226	0.270

En las representaciones de intensidad vs diámetro (análisis NLLS; *Figura 3.16, izquierda*) se observan dos poblaciones, siendo la de mayor tamaño (excepto a tiempo 0) la que aparentemente es predominante. Sin embargo, las representaciones número vs diámetro (*Figura 3.16, derecha*) indican que hasta el cuarto día, no se observa la aparición de las partículas de mayor tamaño.

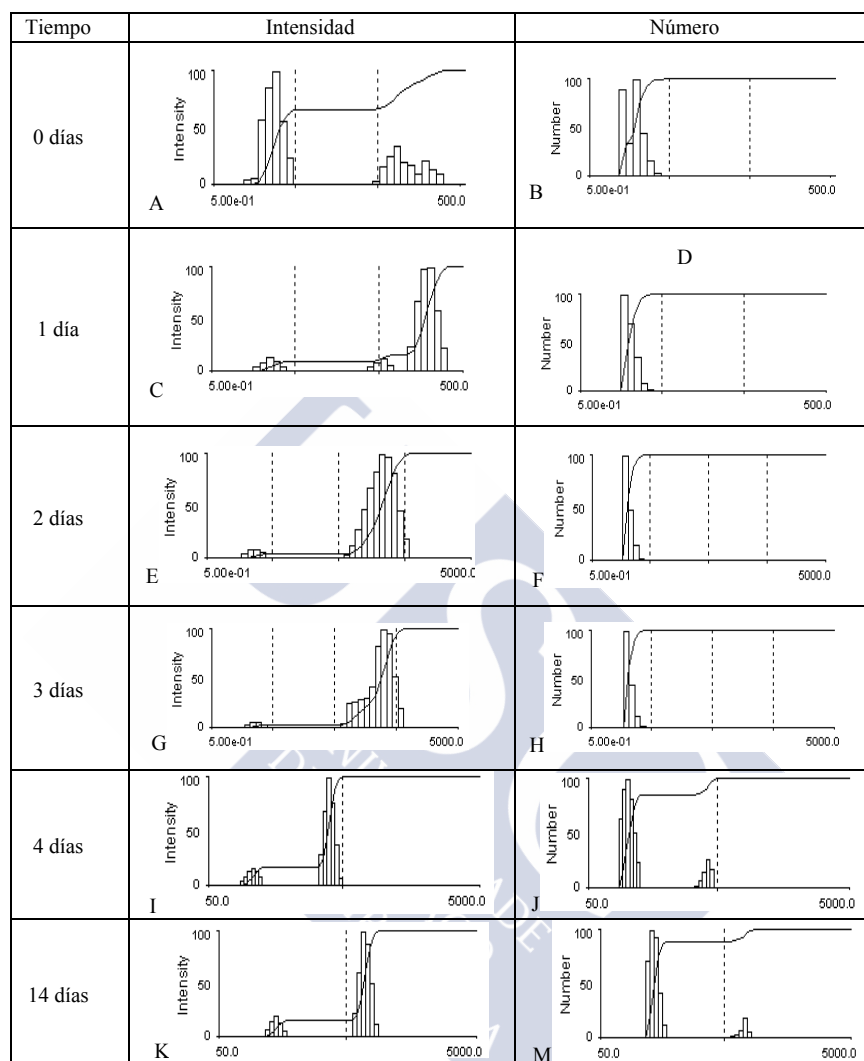


Figura 3.16. Representaciones de intensidad y número de partículas frente a diámetro por NLLS del dímero *amC₂-aminoisoftálico* 0.01 M y fuerza iónica 0.1 M a distintos tiempos desde la preparación de la muestra.

Análisis de forma y tamaño mediante Microscopias

La Figura 3.17 muestra algunas imágenes representativas obtenidas mediante TEM de las partículas observadas a partir de una disolución 5×10^{-3} M del dímero en presencia de NaCl 0.09 M y NaOH 0.01 M, transcurridas 2 y 24 horas desde su preparación. Del análisis del tamaño de las partículas se construyeron los histogramas que las acompañan. A las 2 horas se observan dos poblaciones de partículas centradas en torno a 50 y 150 nm, que evolucionan hacia una distribución de tamaños más amplia.

Adicionalmente, se observa que coexiste una población de partículas de tamaño inferior a 25 nm (diámetro medio 11.5 nm) tal y como se recoge en la *Figura 3.18*. A pesar de la evolución del sistema, esta población de partículas pequeñas no desaparece al

menos durante 24 h (Figura 3.19), tiempo al cual se obtiene un diámetro medio de 2.30 nm, que puede corresponder a agregados de carácter micelar (Figura 3.19, derecha).

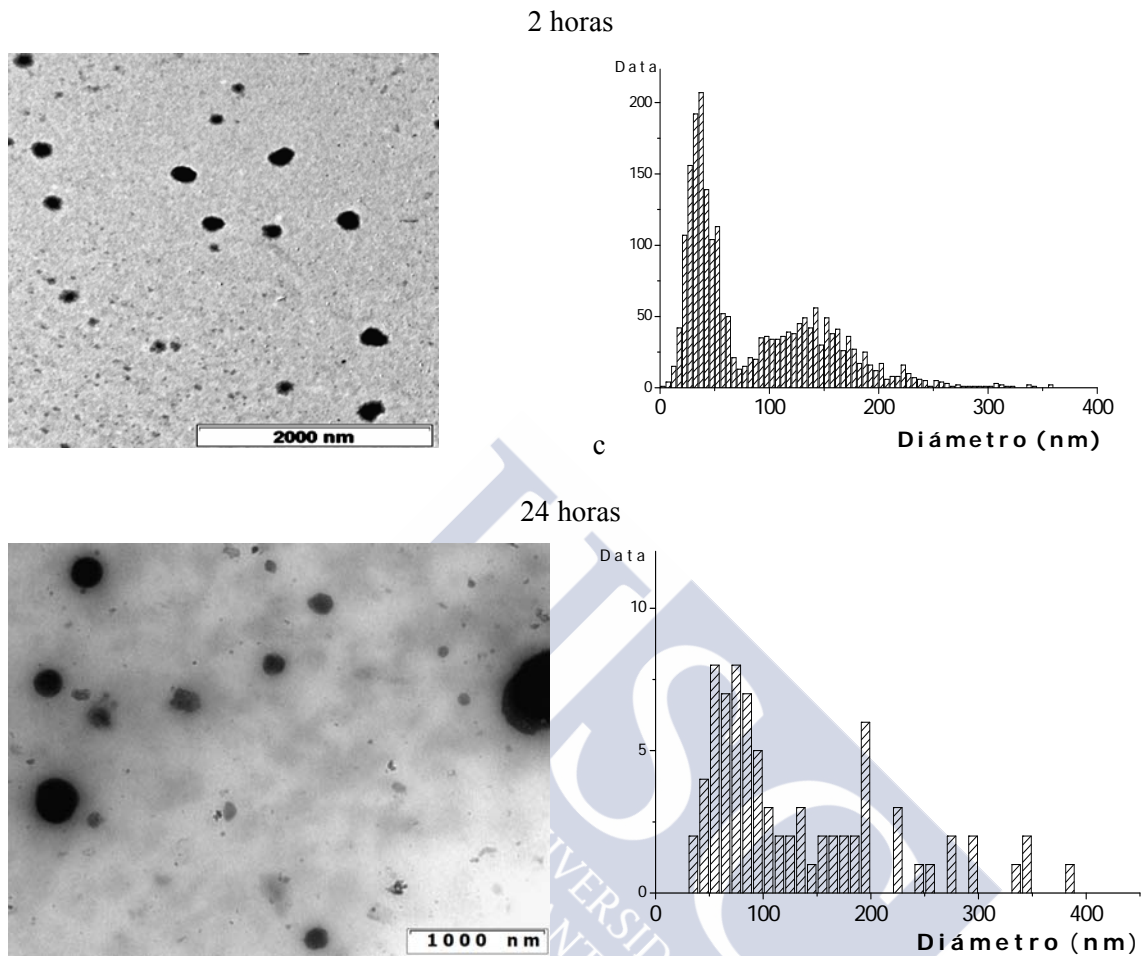


Figura 3.17. Imágenes TEM y distribución de tamaños de una disolución del dímero amC_2 -aminoisoftálico 5×10^{-3} M (en NaCl 0.09 M y NaOH 0.01 M) a las 2 y 24 horas de su preparación.

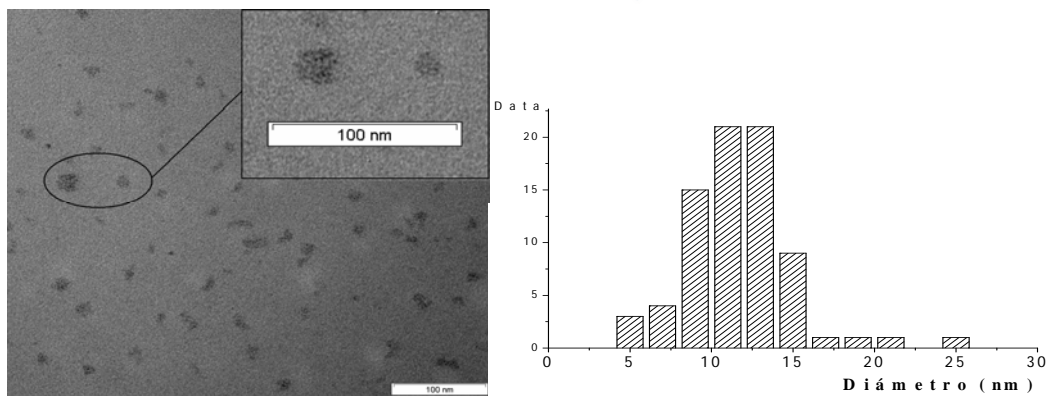


Figura 3.18. Imagen TEM e histograma de la distribución de partícula de tamaño inferior 25 nm, a las 2 horas de la preparación de la disolución, en las condiciones experimentales de la Figura 3.17.

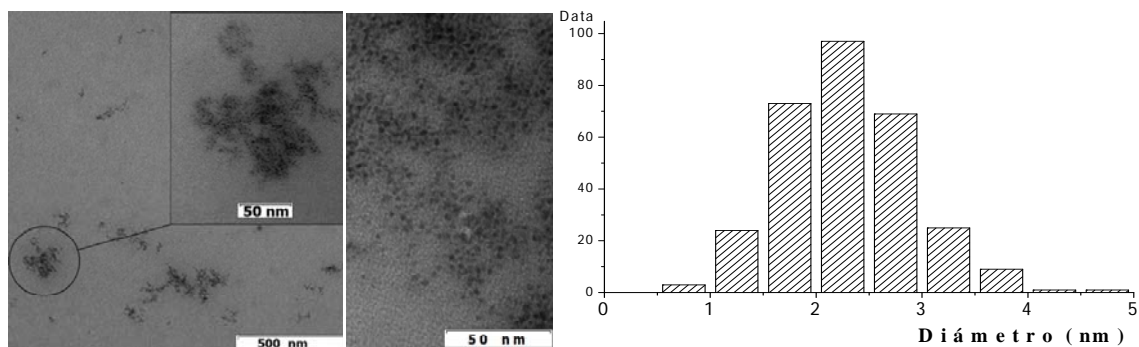


Figura 3.19. Microfotografía TEM y representación de la dispersión de tamaños de los agregados del dímero amC_2 -aminoisofáltico (5.13×10^{-3} M) en disolución acuosa (NaCl 0.090 M y NaOH 0.010 M) a las 24 horas de la preparación de la muestra.

En esta última figura puede observarse que las partículas pequeñas tienen tendencia a acumularse en la misma región del espacio formando como una nube, que parece tener tendencia a colapsar en forma de asociaciones globulares. Este hecho está resaltado en la *Figura 3.20*, tomada a las 48 horas. A su vez estos agregados parecen tener tendencia a formar otros de mayor tamaño, de estructura vermiforme como indica la *Figura 3.21*. Debemos remarcar que, de formar esporádica se observa este tipo de agregados desde el comienzo del experimento. También se observa la formación de algunos cristales (*vide infra*), posiblemente derivados de aquellos agregados.

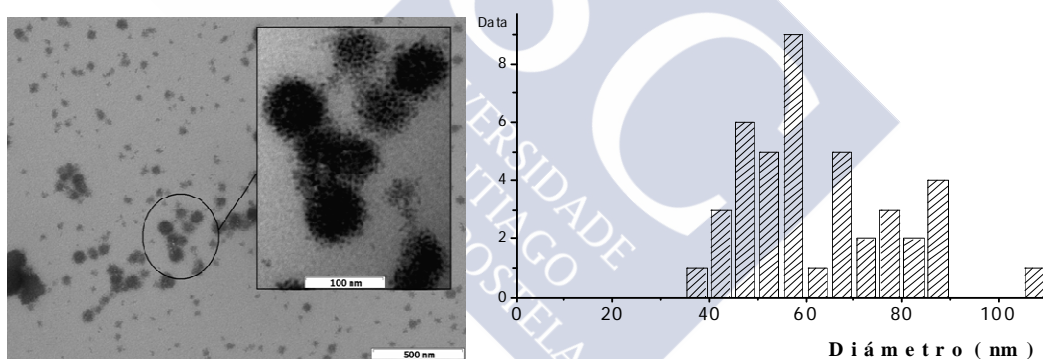


Figura 3.20. Imágenes TEM e histograma de la distribución de tamaño de partícula del dímero amC_2 -aminoisofáltico en las condiciones experimentales de la *Figura 3.17* a las 48 horas.

Dado que las medidas de tensión superficial se realizaron en disolución reguladora de carbonato/bicarbonato, se recogieron imágenes TEM en unas condiciones experimentales similares a aquellas (concentración del surfactante 8×10^{-3} M, [carbonato/bicarbonato] = 0.1 M, pH = 9.82). Las *Figuras 3.22-3.23* muestran imágenes representativas tomadas mediante TEM a las 24 horas de la preparación de la muestra. Los resultados obtenidos son similares a los hasta aquí comentados, si bien parece que los agregados son algo más compactos. El tamaño medio determinado a partir del histograma que recoge la figura es de 65 nm cercano al valor medio observado en las condiciones de la *Figura 3.17*.

En ambas condiciones experimentales (disolución reguladora o NaCl/NaOH) se observa la formación de cristales (*Figura 3.24*) a los que se aludió más arriba. Desafortunadamente, los cristales nunca llegaron a tener la calidad suficiente como para poder ser resueltos mediante la técnica de RX-monocristal.

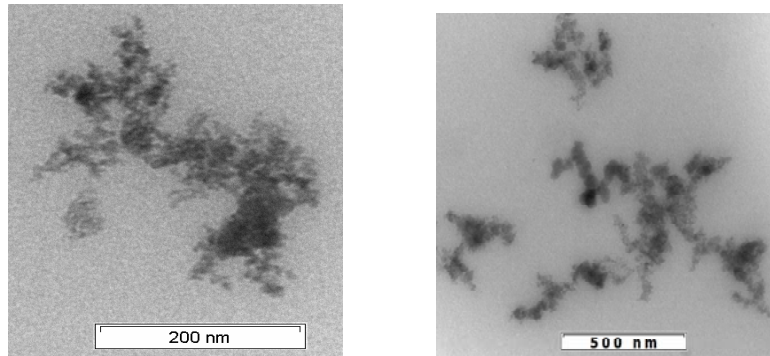


Figura 3.21. Imágenes TEM del dímero amC_2 -aminoisoftálico en las condiciones experimentales de la Figura 3.17, tomadas a las a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha).

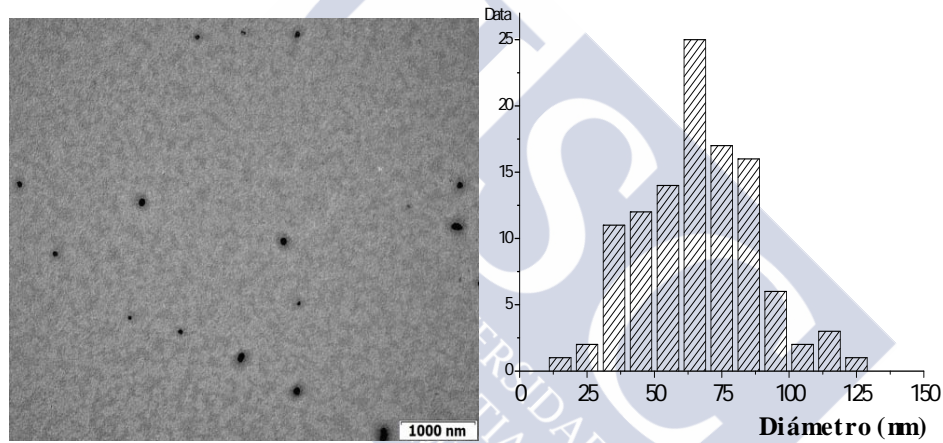


Figura 3.22. Imagen TEM e histograma de la distribución de tamaño de partícula del dímero amC_2 -aminoisoftálico tomadas a partir de una disolución de concentración $8 \times 10^{-3} M$, en disolución acuosa de carbonato/bicarbonato 0.1 M, pH = 9.82, transcurridas 24 horas de su preparación.

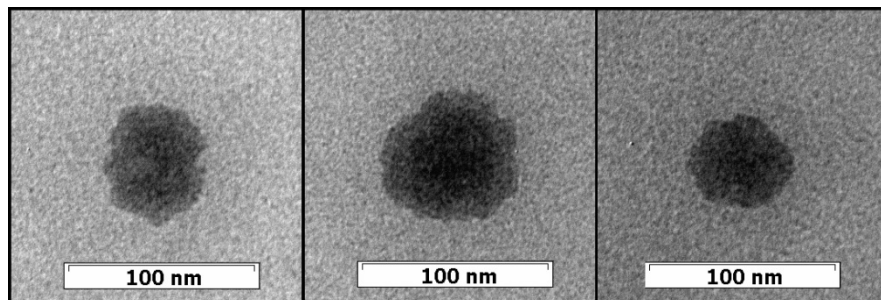


Figura 3.23. Ampliación de imágenes TEM en las condiciones de la Figura 3.22.

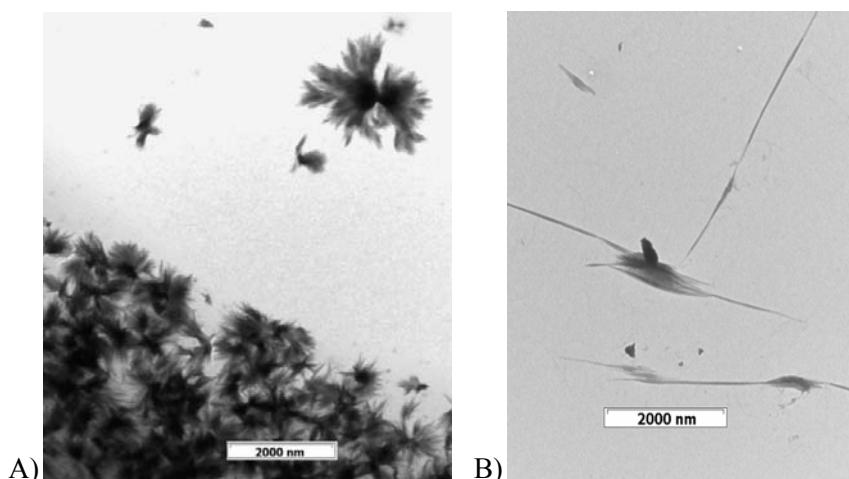


Figura 3.24. Imágenes TEM de cristales del dímero *amC₂*-aminoisofáltico A) 5×10^{-3} M, NaCl 0.090 M y NaOH 0.010 M. B) 4.08×10^{-3} M y regulador carbonato/bicarbonato 0.1 M, pH = 9.82.

Finalmente, se hizo uso de la técnica de AFM en modo de contacto para observar los agregados formados a partir de una disolución del dímero *amC₂*-aminoisofáltico de concentración 1×10^{-3} M en agua. Las imágenes de la *Figura 3.25* fueron obtenidas después de 24 horas desde la preparación de la disolución. En la imagen destacan regiones con estructuras vermiformes que posiblemente corresponden a las indicadas en las imágenes TEM. La distribución de tamaños es amplia y el histograma muestra un máximo en torno a 50 nm que también es compatible con lo comentado en los experimentos TEM y dispersión de luz.

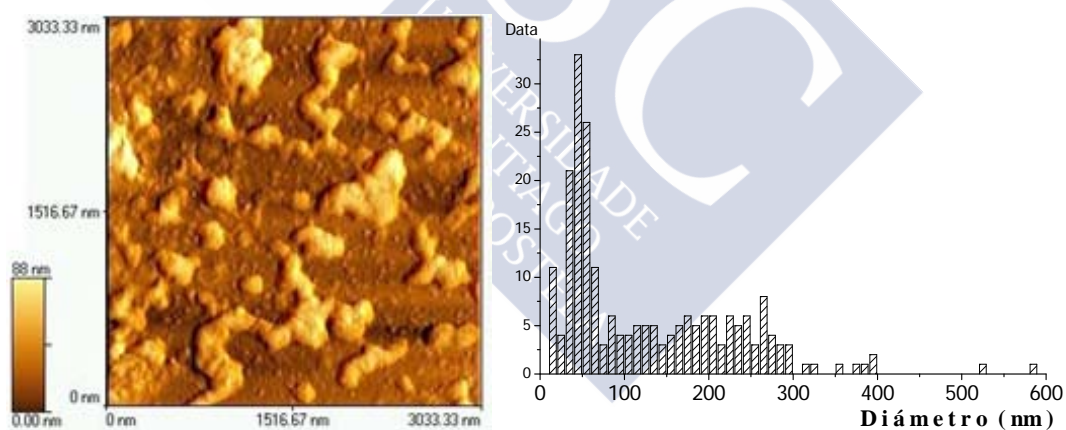


Figura 3.25. Imagen AFM e histograma de la distribución de tamaños del dímero *amC₂*-aminoisofáltico en agua (1×10^{-3} M) a las 24 horas de su preparación.

3.3 ÁCIDO *amC₂*-PROTOPORFIRINA.

A la hora de plantear el estudio del comportamiento de agregación de este compuesto en disolución, se debe tener en cuenta que no se puede superar una concentración de surfactante superior a 0.01 M debido a la tendencia a gelificar que tienen muchos de los derivados de ácidos biliares.²³⁻²⁶ Adicionalmente, surge una circunstancia que dificulta el trabajo con los compuestos derivados de porfirina. Respecto a las porfirinas naturales, los derivados de ácidos biliares con el puente de unión porfirínico presentan una solubilidad considerablemente mayor, y dada la naturaleza cromófora del mismo, las disoluciones con concentraciones superiores a 5×10^{-3} M son muy opacas lo que dificulta la

visualización de la solubilidad del compuesto. Por este mismo hecho, no es posible la determinación del diámetro hidrodinámico de los agregados mediante dispersión de luz. Como se muestra a continuación, el *amC*₂-protoporfirina absorbe en la región del visible, coincidiendo con la longitud de onda del láser (632.8 nm) del que se dispone, interfiriendo con los fenómenos de dispersión de luz de las partículas en suspensión.

Tensión superficial

Se partió de una disolución [*amC*₂-protoporfirina] = 4.89×10^{-3} M, en presencia de 0.090 M de NaCl y 0.01M de NaOH. Los resultados se muestran en la *Figura 3.26* y del punto de corte de las dos líneas rectas indicadas se determinó un valor de la *cac* igual a 1.6×10^{-5} M, que es un orden de magnitud inferior a los valores determinados para los dímeros anteriores hasta aquí comentados.

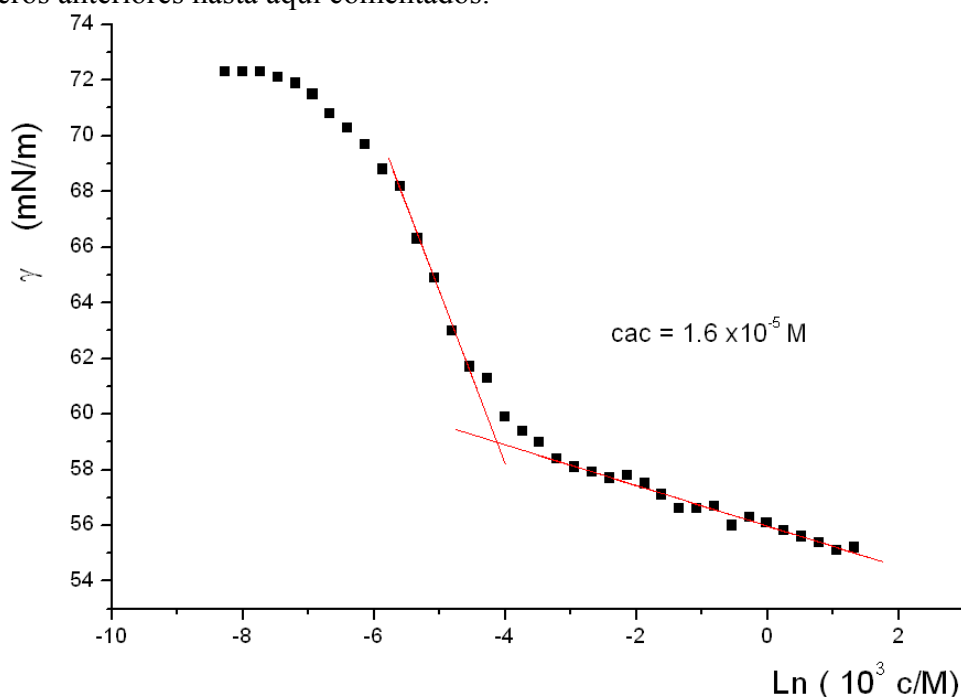


Figura 3.26. Representación de la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración del dímero *amC*₂-protoporfirina (NaOH 0.01 M, NaCl 0.09 M, pH=12 y T^a 25°C).

Al seguir los pasos indicados en párrafos precedentes, se obtiene un valor $a_0 = 67 \text{ \AA}^2$ para el área superficial por molécula (*Tabla 3.4*). La sección molecular que se puede calcular para una configuración plana de la molécula (orientación similar a la de la *Figura 3.15*) sería mayor de 370 \AA^2 (*Sección 2.5*). La enorme diferencia este valor y a_0 permite descartar la formación de una monocapa con las moléculas del dímero con una orientación plana en la superficie. Se debe recordar que, en una proyección apical la protoporfirina origina una sección de 62 \AA^2 y que, similarmente, los dos restos de ácido biliar con la misma orientación contribuirían con 102 \AA^2 ($51 \text{ \AA}^2/\text{esteroide}$). Cualquiera de las dos orientaciones en la interfase recogidas en la *Figura 3.27* implica una superposición de la proyección de las áreas de los esteroides y de la protoporfirina, siendo el valor mínimo ligeramente mayor de 100 \AA^2 , valor también superior al de a_0 . Por lo tanto, aun aceptando un cierto error en los valores indicados, la separación entre los mismos es lo suficientemente grande como para aceptar la formación de una monocapa. Por ello, se sugiere que en realidad se ha formado una multicapa. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores quienes han publicado la formación de multicapas.²⁷⁻²⁸

Tabla 3.4

Propiedades superficiales obtenidas a 25°C a partir de los datos de la *Figura 3.26*.

Disolución	pH	c_{ac} ($\times 10^5$ M)	$\Gamma \times 10^7$ (mol m ⁻²)	a_0 (Å ²)
[NaOH] = 0.01 M [NaCl] = 0.09 M	12	1.6	24.7	67

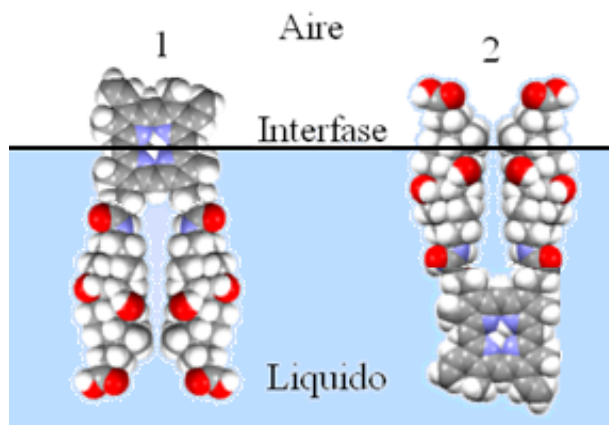


Figura 3.27. Orientación del dímero *amC*₂-protoporfirina en la interfase líquido-aire que originaría un área superficial mínima de 102 Å².

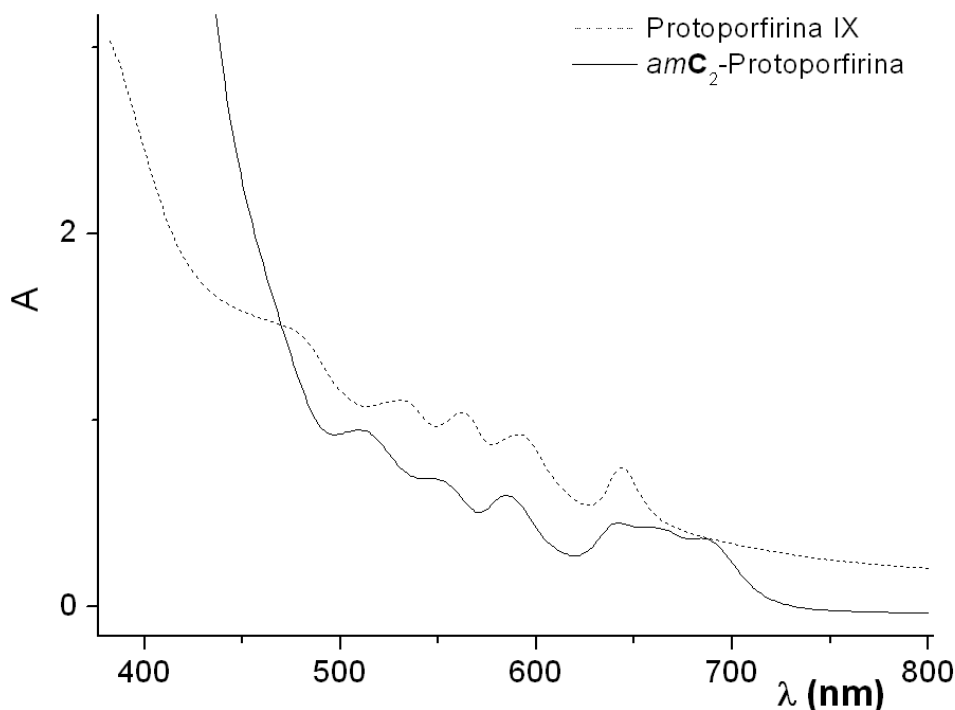
Absorción UV-Vis

Los derivados con núcleo porfirínico suelen mostrar una intensa banda de absorción en la región azul del espectro visible, denominada *B* o *banda Soret* que se asocia a la transición electrónica desde el estado fundamental hasta el segundo estado excitado ($S_0 \rightarrow S_2$). Este es también el caso de la protoporfirina IX y el dímero que nos ocupa (*Figura 3.28*).

En el caso de la protoporfirina IX, la banda aparece a 376 nm pero para el dímero *amC*₂-protoporfirina se desplaza hasta 400 nm. Le siguen otras bandas de absorción más débiles, denominadas bandas-Q, producidas por la transición al primer estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$). Para la protoporfirina estas bandas aparecen a 531, 562, 591 y 644 nm pero al contrario de la banda-B, las bandas-Q del dímero se desplazan a 510, 545, 584 y 640 nm, es decir, hacia longitudes de onda menores. Esto sugiere que, en el dímero, la diferencia de energía entre los dos estados excitados se ha reducido. Además, esta modificación de la estructura electrónica respecto al compuesto de partida, posibilita nuevas transiciones que originan nuevas bandas de absorción en el espectro ultravioleta-visible. Cabe destacar que en el caso del *amC*₂-protoporfirina aparecen dos nuevas bandas de absorción muy próximas a 661 y 685 nm y que la protoporfirina IX, en las condiciones experimentales empleadas, presenta la banda de absorción denominada banda-J a 480 nm que implica la formación en disolución de dímeros interactuando axialmente mediante el empaquetamiento π - π y lateralmente entre los contactos hidrófobos. En el caso del dímero *amC*₂-protoporfirina, no aparece una clara banda-J aunque se observa un gran ensanchamiento de la banda-B. Estos dímeros podrían orientarse con los anillos dispuestos cara-cara y los grupos carboxílicos ionizados en disposición cabeza-cola en disoluciones acuosas.

Se estudió la variación que se produce, en el espectro de absorción ultravioleta-visible, cuando se varían las condiciones de pH con el fin de comparar el comportamiento de este compuesto con el de su predecesor.²⁷⁻²⁸ En disolución acuosa, a diferencia de sus sales, los ácidos biliares no son solubles, lo que impide trabajar a un bajo valor del pH.

Esta característica aparece también en el dímero de porfirina. Por este motivo, se utilizó metanol como disolvente y se ajustó el pH a 8, 4 y 1 mediante NaOH y HCl diluidos. Los espectros (Figura 3.29) muestran cómo la banda B se desplaza y las bandas Q se reorganizan fruto de los cambios que se producen en la estructura electrónica cuando se protona el anillo tetrapirrólico.



Banda / (nm)	B	J	Q →				
<i>amC</i> ₂ -protoporfirina	400	510	545	584	640	(661)	685
Protoporfirina IX	376	480	531	562	591	644	

Figura 3.28. Espectros de absorción UV-VIS de la protoporfirina IX (5.8×10^{-5} M) y el dímero *amC*₂-protoporfirina (2.2×10^{-5} M) en una disolución con NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M. T^a 25°C.

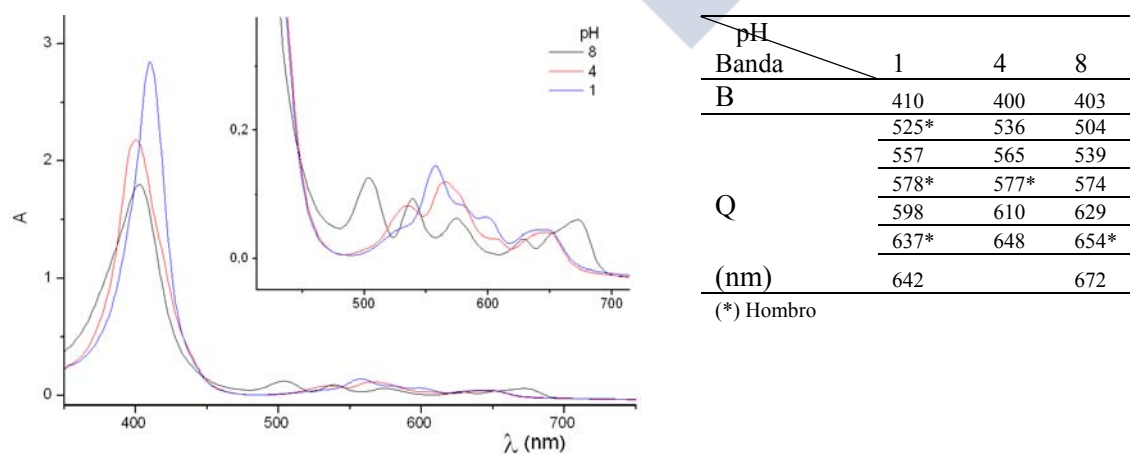


Figura 3.29. Espectros de absorción UV-VIS del dímero *amC*₂-protoporfirina (3.0×10^{-5} M) en metanol a distintos valores del pH. Temperatura: 25°C.

Para una estructura molecular como la que se viene estudiando, capaz de ionizarse en distintas posiciones de la misma, se debe de tener en cuenta las diferentes posibilidades de ionización como resultado de un cambio del pH en el medio. Mediante el software Marvin Sketch, se hizo una estimación del pK_a de cada uno de los diferentes grupos ionizables de la molécula. Así, se obtienen unos valores de pK_a de 3.59 y 4.57 para dos de los nitrógenos (protonables) del anillo tetrapirrólico, y de 15.69 y 16.61 para los otros dos. Los pK_a de los nitrógenos que intervienen en el enlace amida son 15.12 y 15.59. El pK_a de los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de los restos de esteroide son 4.17 y 4.78. Con estos datos se puede predecir la estructura molecular del ion mayoritario para un determinado pH. En medio muy ácido, la especie mayoritaria es dicatiónica y, en medio básico, una dianiónica (*Figura 3.30*). La existencia de distintas especies en disolución justifica cualitativamente las diferencias observadas en los espectros a distintos valores del pH.

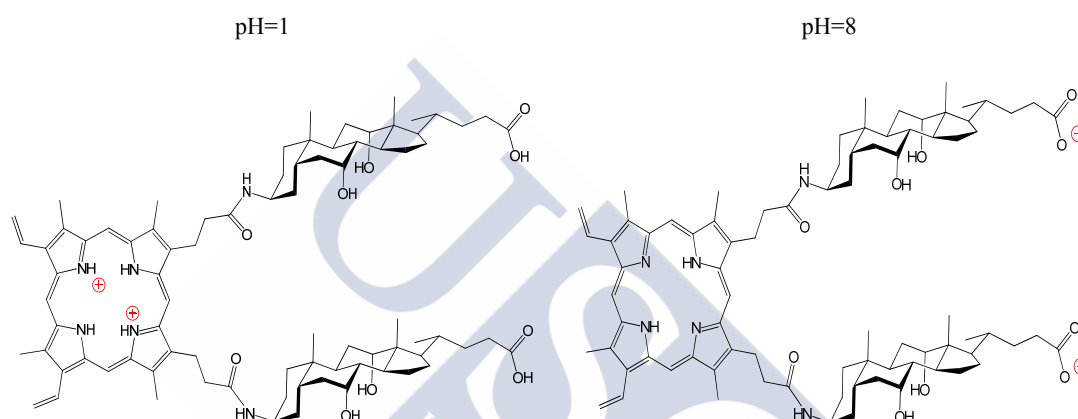


Figura 3.30. Estructuras moleculares propuestas de las especies mayoritarias del dímero amC_2 -protoporfirina a distinto pH.

Con el fin de estudiar si los fenómenos de agregación del amC_2 -protoporfirina en disolución acuosa están relacionados con el solapamiento intermolecular de orbitales π , se obtuvieron los espectros de absorción para una serie de disoluciones de distinta concentración preparadas mediante el método de adición-extracción, sobre la propia cubeta. El volumen de disolución introducido en la cubeta fue de 2.980 ± 0.006 ml y el volumen de adición-extracción empleado fue 0.8900 ± 0.0009 ml. La *Figura 3.31* muestra los resultados obtenidos y el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, en particular, en la región en la que aparecería la banda-J según la bibliografía. Esto implica que no hay ningún proceso dependiente de la concentración que afecte a la absorción a longitudes de onda en la región relacionada con la banda-J. La *Tabla 3.6* recoge los valores de los coeficientes de absorptividad molar. Estos valores son tan altos que, aun a concentraciones relativamente bajas, es fácil saturar el fotodetector del aparato. Por este motivo, no es posible realizar espectros de absorción fiables por encima de concentraciones cercanas a la *cac* tal y como se ilustra en la *Figura 3.32*.

Estudios mediante TEM

Se obtuvieron imágenes TEM para observar la naturaleza de los agregados formados por el dímero. Los primeros resultados obtenidos por esta técnica, de una disolución del amC_2 -protoporfirina de concentración 5×10^{-4} M con NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, muestran claramente partículas de tamaño nanométrico en forma de gránulos con aparente tendencia a la asociación (*Figura 3.33*). Al analizar el tamaño de estas partículas se obtiene un diámetro de partícula de 2.2 ± 0.7 nm. La *Figura 3.34* muestra el histograma

de distribución de tamaños. Esto sugiere que se trata de micelas, dado que este tamaño corresponde a micelas formadas por las sales biliares naturales.²⁹

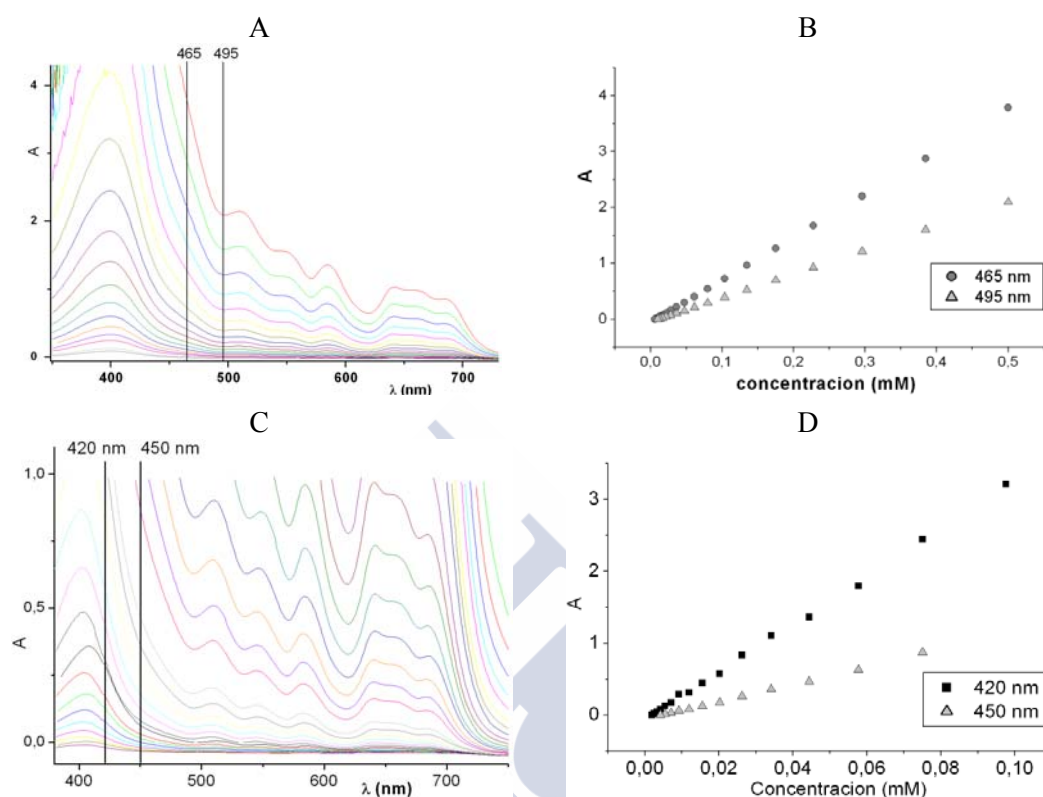


Figura 3.31. A y C: Espectros de absorción UV-VIS variando la concentración del dímero amC_2 -protoporfirina en una disolución con NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M. Tª 25°C. B y D: Leyes de Lambert-Beer.

Tabla 3.6

Coefficientes de absortividad molar obtenidos a diferente longitud de onda, con un paso de luz de 1 cm, del dímero amC_2 -protoporfirina.

Longitud de onda (nm)	420	465	495	510	550	585
$10^{-3}\epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	23.80	7.63	4.27	4.36	3.18	2.80

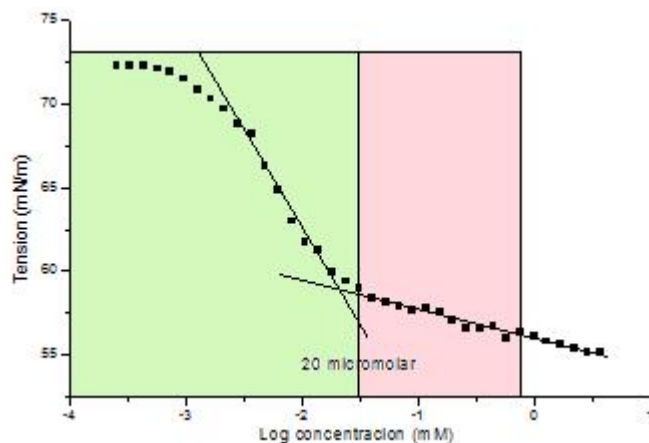


Figura 3.32. Región de concentración (en verde) en la que el dímero amC_2 -protoporfirina cumple la ley de Lambert-Beer (cubeta de 1cm de paso óptico) sobre los resultados de tensión superficial de la Figura 3.26.

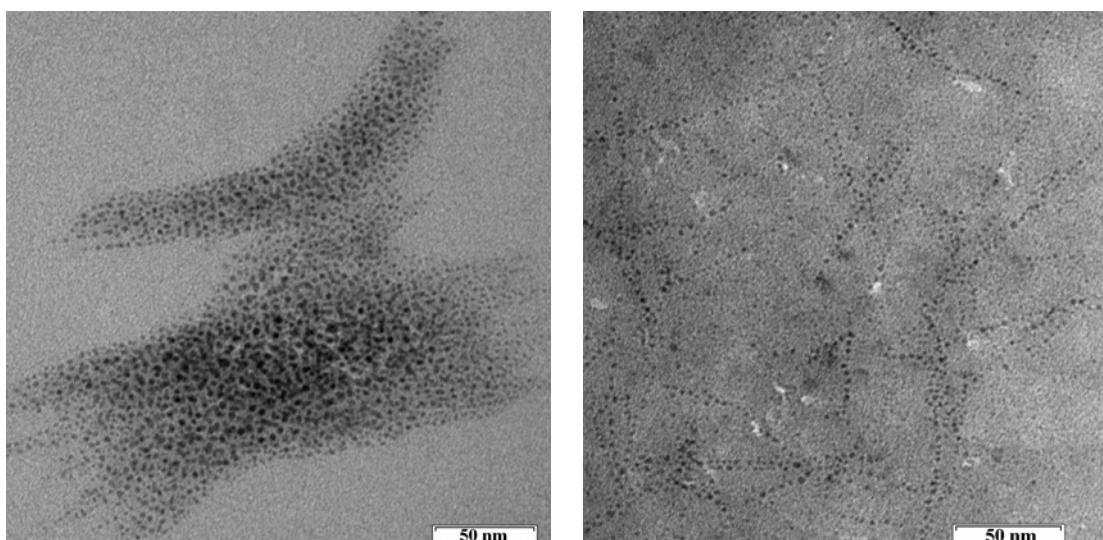


Figura 3.33. Imágenes TEM del amC_2 -protoporfirina 5×10^{-4} M con NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, Temperatura: 25°C, obtenidas inmediatamente después de haber preparado la disolución.

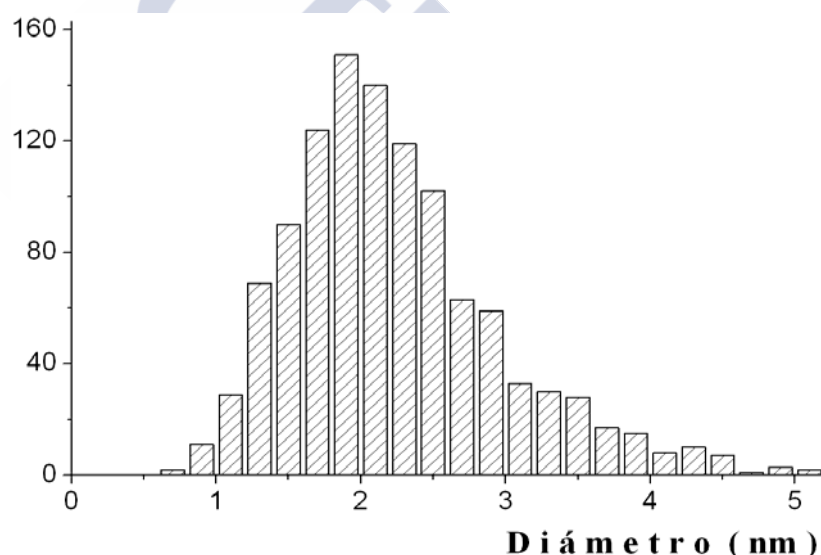


Figura 3.34. Histograma de distribución de tamaños de los agregados formados por el dímero amC_2 -protoporfirina observados en las condiciones indicadas en la Figura 3.33.

La Figura 3.33 transmite la sensación de que estas micelas tienen tendencia a aglomerarse en la misma región del espacio, bien en forma bidimensional (imagen de la izquierda) o lineal (imagen de la derecha). Sin embargo, estas agrupaciones pueden ser debidas a defectos de la película polimérica que recubre las rejillas que se usan en microscopía electrónica, o bien, a los procesos de evaporación requeridos para poder trabajar a alto vacío. Por lo tanto se recopilaban nuevas imágenes partiendo de una concentración diez veces superior y, simultáneamente, se estudió también la evolución con el tiempo.

Con un mismo grado de resolución (Figura 3.35), y tomadas las imágenes inmediatamente después de preparada la disolución, los resultados que se obtienen son muy similares a los observados en la Figura 3.33, izquierda.

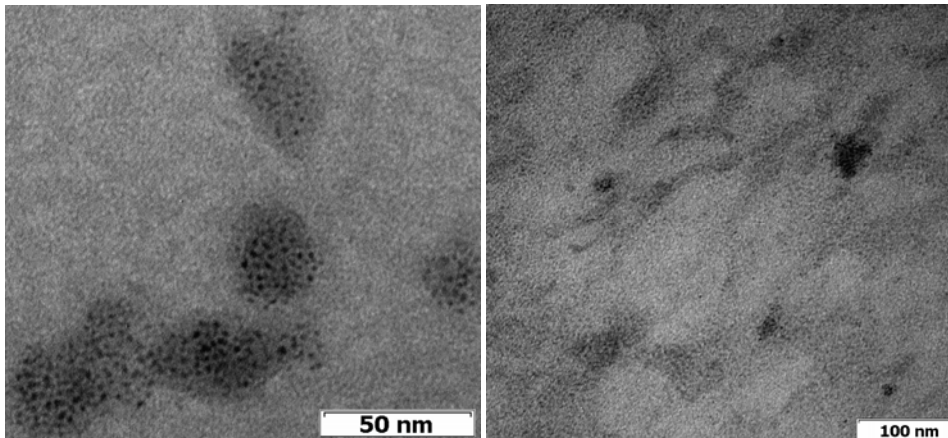


Figura 3.35. Imágenes TEM de amC_2 -protoporfirina 5×10^{-3} M obtenidas inmediatamente después de preparada la disolución.

La *Figura 3.36* muestra el histograma del tamaño de las partículas micelares. El valor medio obtenido, 1.6 ± 0.4 nm, es compatible con el determinado anteriormente.

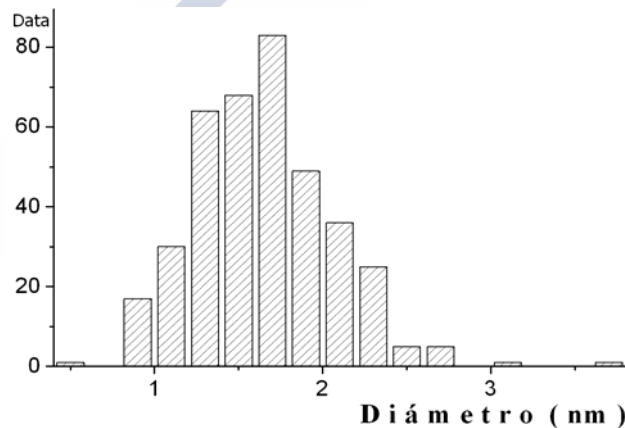


Figura 3.36. Histograma de distribución del tamaño de las micelas del dímero amC_2 -protoporfirina de concentración 5×10^{-3} M, inmediatamente después de la preparación de la disolución.

Transcurridos 8 días (manteniendo la muestra a temperatura ambiente en un recipiente herméticamente cerrado para evitar la evaporación y entrada de polvo atmosférico), se prepararon nuevas muestras para TEM. A diferencia de los dímeros anteriores, las imágenes (*Figura 3.37*) no muestran la formación de agregados globulares compactos y sólo se han detectado agregados grandes, amorfos y de aspecto vermiforme.

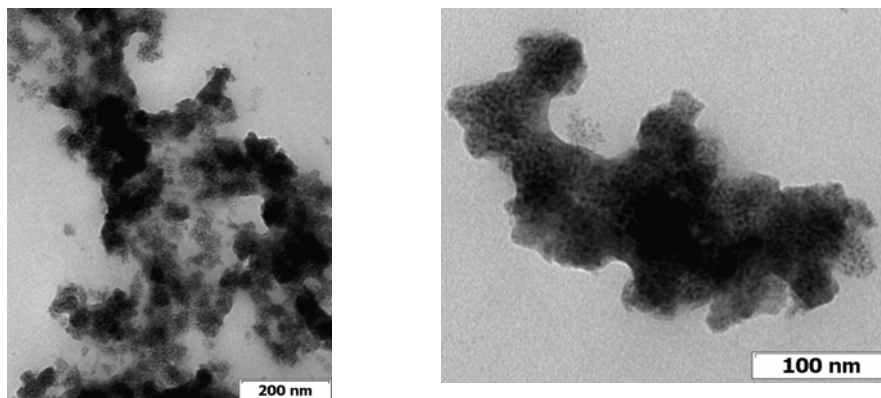


Figura 3.37. Imágenes TEM del amC_2 -protoporfirina 5×10^{-3} M transcurridos 8 días.

Una vista a mayor resolución (*Figura 3.38*) sugiere que estos agregados son en realidad un aglutinamiento de los agregados micelares ya comentados lo que vendría apoyado por el hecho de que, a pesar del largo tiempo transcurrido, se observan micelas libres y bien definidas.

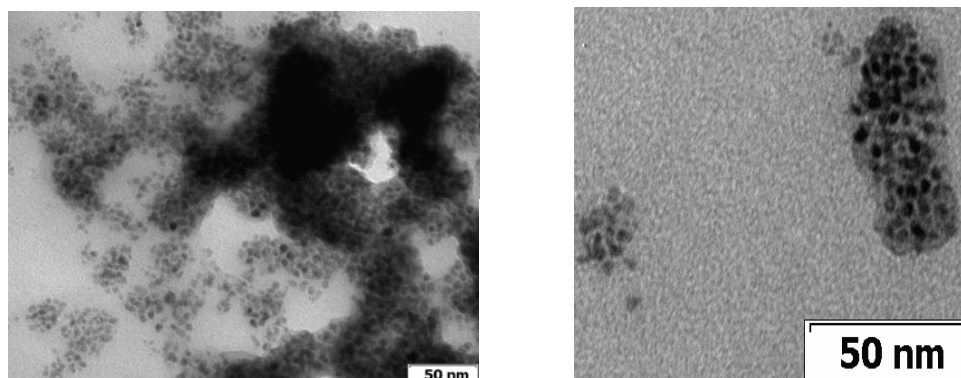


Figura 3.38. Microfotografías TEM del amC_2 -protoporfirina 5×10^{-3} M transcurridos 8 días.

Estudios en presencia de iones metálicos pesados

Las especiales características de cromóforo que confiere un puente derivado de porfirina, permiten el empleo de técnicas que pueden ofrecer nueva información sobre los estados de agregación de las muestras. Al exponer una muestra de esta naturaleza a la luz ultravioleta, en un microscopio confocal, la fluorescencia permite diferenciar la materia con propiedades de cromóforo de las que no tiene esta propiedad. Cuando sobre una muestra de amC_2 -protoporfirina, de concentración 5×10^{-3} M en agua (con 0.01 M de NaOH), se hace incidir luz ultravioleta la situación cambia. En la *Figura 3.39* (arriba) los filtros rojo y verde de fluorescencia indican que la muestra emite fotones con cierta intensidad de forma homogénea. Los agregados más grandes, descartadas impurezas, que se muestran en las imágenes, parecen no tener fluorescencia.

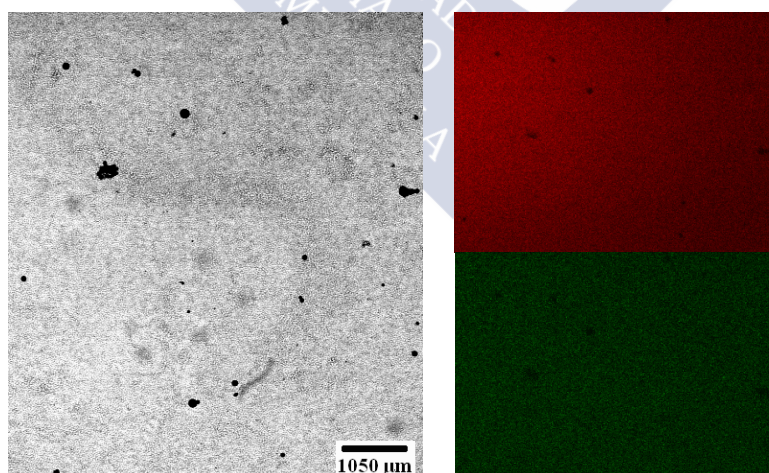


Figura 3.39. Imágenes de una disolución 5×10^{-3} M de amC_2 -protoporfirina obtenidas por microscopía confocal con una fuente ultravioleta y filtros rojo y verde.

Por otra parte, en las muestras de microscopía confocal no es raro que aparezcan partículas extrañas procedentes de la contaminación ambiental. Afortunadamente, la gran mayoría son fácilmente detectables y se descartan automáticamente de cualquier estudio. Sin embargo, se puede sacar cierta información acerca de la interacción del compuesto

con diferentes materiales. Por ejemplo, la *Figura 3.40* muestra como el dímero amC_2 -protoporfirina se adhiere a una fibra de algodón proveniente de un proceso de filtrado en la preparación de la muestra. El recubrimiento es homogéneo y la intensidad de la fluorescencia grande.

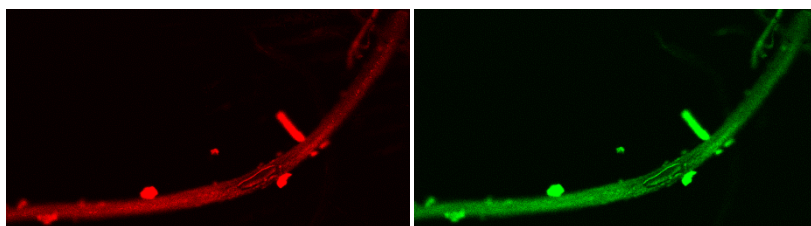


Figura 3.40. Imágenes de una fibra de algodón cubierta por amC_2 -protoporfirina y obtenidas por microscopía confocal con una fuente ultravioleta y filtros rojo y verde.

Se preparó una disolución de igual concentración pero con una mezcla de agua/acetona 1:1 como disolvente. En este caso, la solubilidad del compuesto es menor, y con ello la agregación del compuesto tiende a ser mayor (*Figura 3.41*). Al aumentar los fenómenos de coalescencia, los agregados que se forman son de carácter esférico, que pueden llegar a superar los 500 nm, y no tienen capacidad de fluorescencia pero, dado su tamaño son apreciables por contraste mediante microscopía confocal con fuente de luz ultravioleta tanto al utilizar el filtro rojo como el verde.

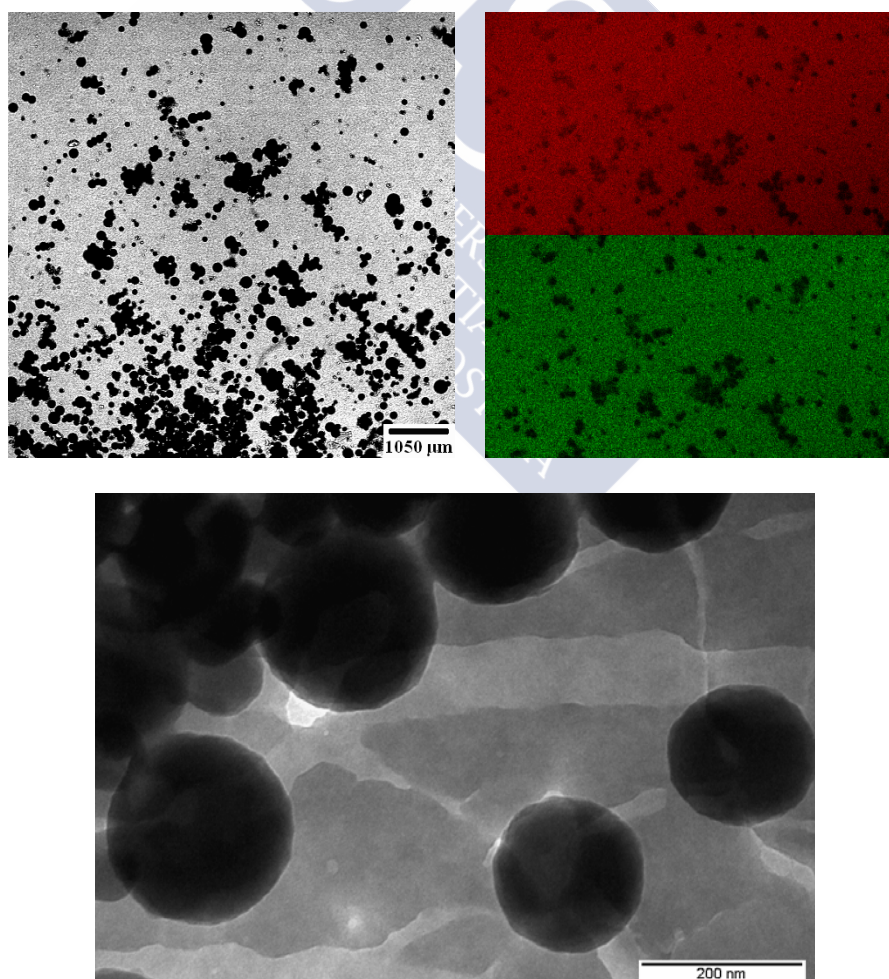


Figura 3.41. Imágenes de una disolución 5×10^{-3} M de amC_2 -protoporfirina en una mezcla agua/acetona 1:1. Arriba: microscopía confocal con una fuente ultravioleta y filtros rojo y verde. Abajo: TEM.

La *Figura 3.42* muestra el aspecto que posee una disolución de cloruro de cobalto (II), con presencia de precipitado, utilizado como blanco. La imagen ha sido obtenida mediante microscopía confocal. Como cabría esperar, el sólido no emite cuando se incide luz ultravioleta ya que a través de los filtros rojo y verde (únicamente el verde muestra leves señales pero corresponde a ruido) no aparece ninguna imagen.

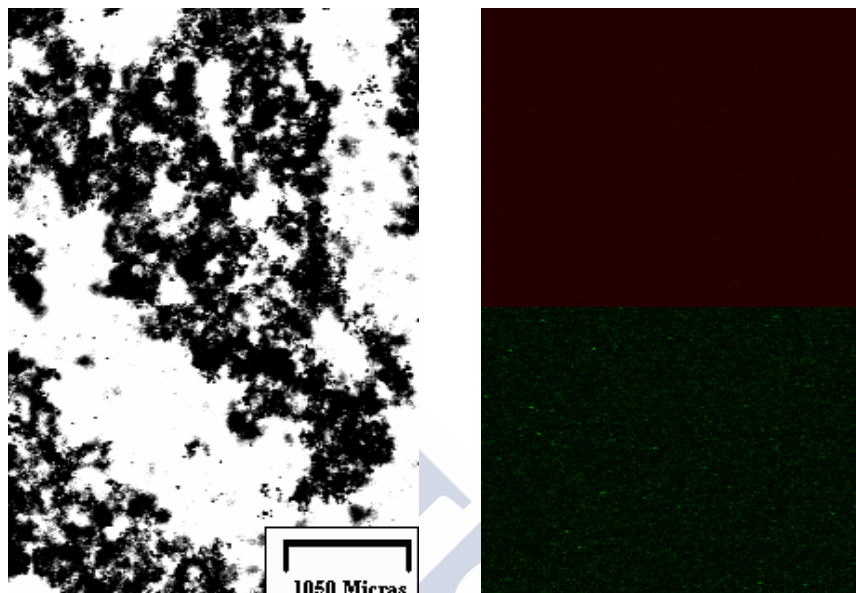


Figura 3.42. Imágenes de una disolución con CoCl_2 precipitado ($\text{pH}=9.90$). Las imágenes, rojo y verde, muestran la fluorescencia de la muestra al utilizar una fuente ultravioleta.

Se añadió cloruro de cobalto sobre una disolución 5×10^{-3} M del *amC₂*-protoporfirina con NaOH 0.01 M, para observar el efecto que produce sobre la agregación (*Fig. 3.43*). A simple vista la floculación fue mucho mayor que cuando se trabaja sin metal pesado. La fluorescencia observada mediante el filtro rojo muestra nubes de agregados (posiblemente formadas por micelas) y que la coalescencia continúa siendo escasa. Cuando se utiliza el filtro verde la señal es más débil y apenas resalta sobre el ruido.

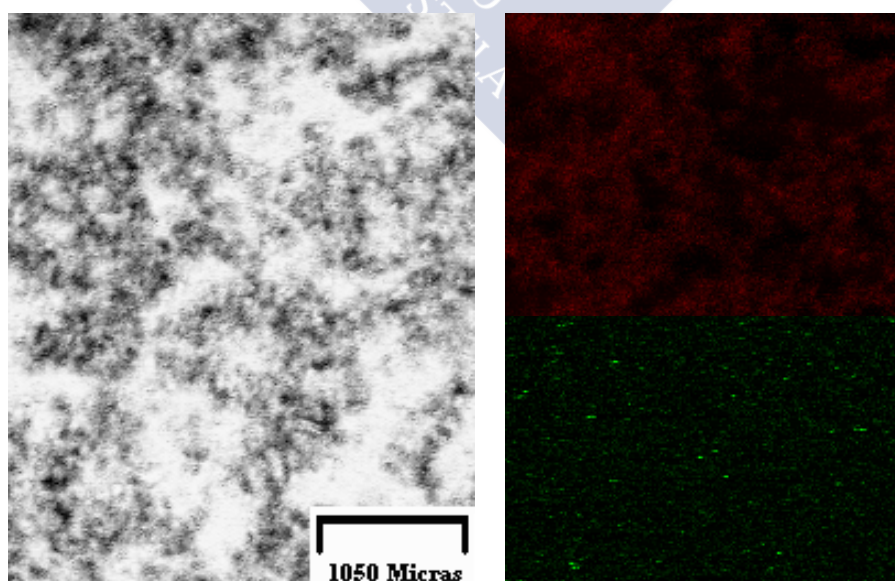


Figura 3.43. Imágenes de una disolución 5×10^{-3} M de *amC₂*-protoporfirina con CoCl_2 obtenidas por microscopía confocal con una fuente ultravioleta y con filtros rojo y verde.

3.4 DISCUSIÓN COMPARATIVA DE LA AGREGACIÓN DE DÍMEROS DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES.

En la *Figura 3.44* se representa la tensión superficial en la *cac* vs el valor de esta última para los compuestos investigados en la presente Tesis conjuntamente con los obtenidos anteriormente en el seno de este grupo de investigación (véase también la *Tabla 3.7*). La *Tabla 3.8* recoge las estructuras de todos estos compuestos.

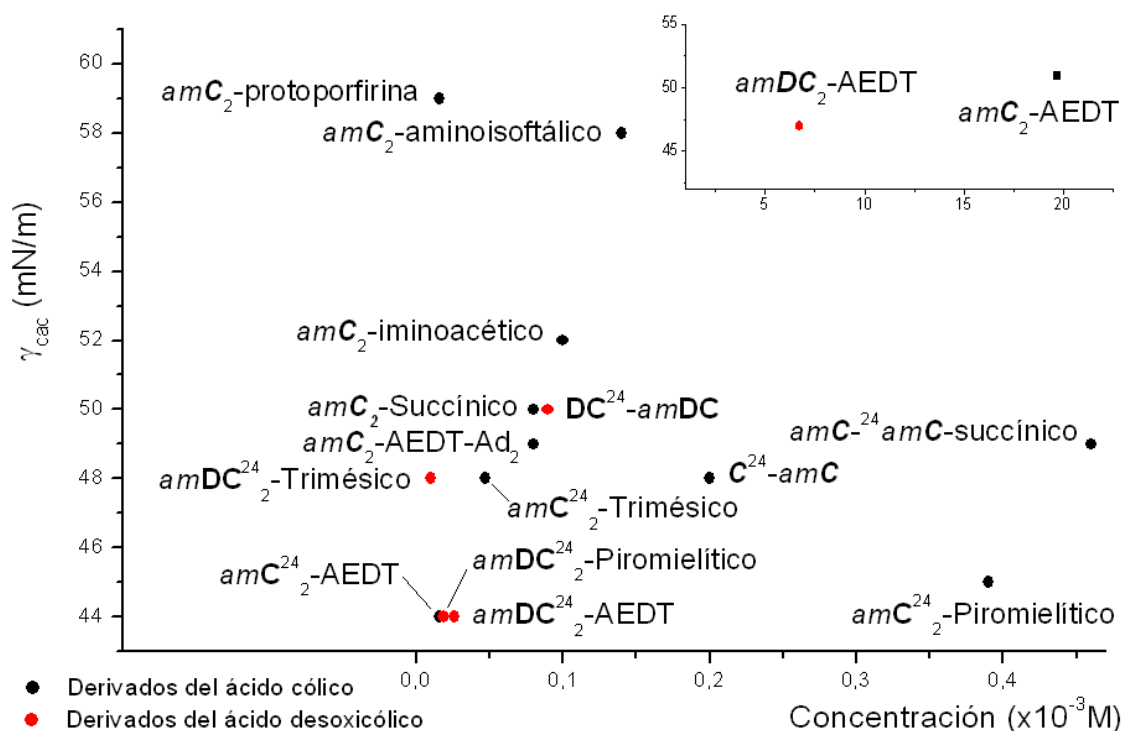


Figura 3.44. Tensión superficial en la *cac* (γ_{cac}) vs la *cac* para dimeros de los ácido cólico y desoxicólico.

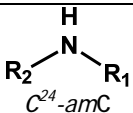
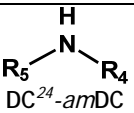
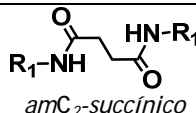
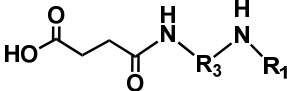
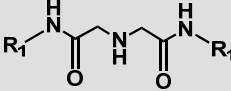
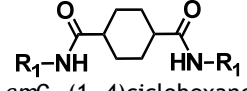
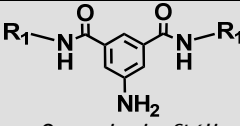
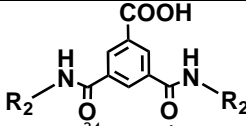
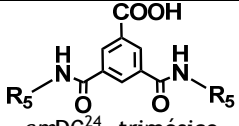
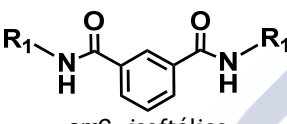
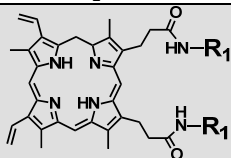
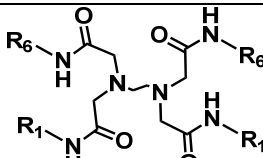
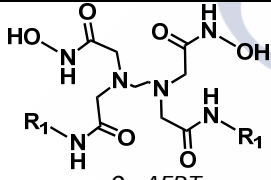
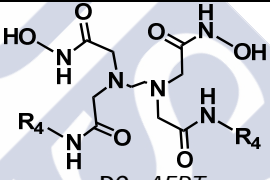
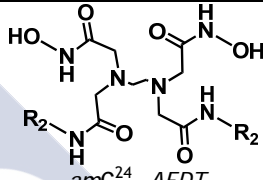
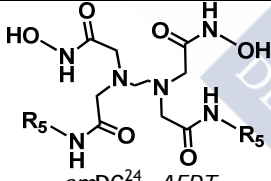
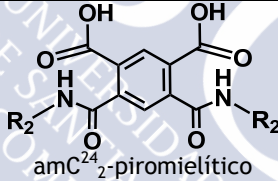
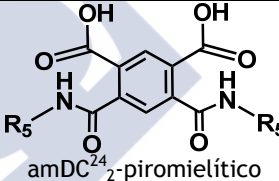
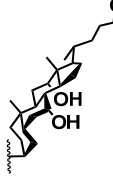
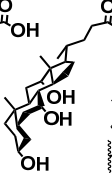
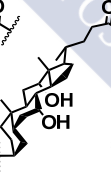

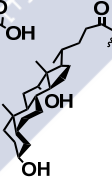

Tabla 3.7

Valores de *cac* de dimeros derivados de ácidos biliares a 25°C. Sobre fondo gris se indican los productos sintetizados y estudiados en la presente Tesis Doctoral.

Surfactante	$10^3 cac$ (M)	γ_{cac} (mN/m)	Surfactante	$10^3 cac$ (M)	γ_{cac} (mN/m)
C^{24} -amC. ³⁰	0.2	48	DC^{24} -amDC. ³⁰	0.090	50
amC_2 -succínico. ³¹	0.08	50	amC_2 - ²⁴ amC Succínico. ³⁰	0.46	49
amC_2 -iminodacético	0.1	52	amC_2 -(1, 4)ciclohexano. ³¹	-	45
amC_2 -isofotálico. ³¹	-	52	amC_2 -aminoisofotálico	0.14	58
amC_2 -protoporfirina	0.016	59	amC_2 -AEDT-ad ₂ ³⁰	0.08	49
amC_2 -AEDT. ³²	19.62	51	$amDC_2$ -AEDT. ³²	6.7	47
amC_2^{24} -AEDT. ³³	0.016	44	$amDC_2^{24}$ -AEDT. ³³	0.026	44
amC_2^{24} -trimésico ³⁰	0.047	48	$amDC_2^{24}$ -trimésico ³⁰	0.01	48
amC_2^{24} -piromielítico ³⁶	0.39	45	$amDC_2^{24}$ -piromielítico ³⁶	0.019	44

Tabla 3.8

Estructuras de los *dímeros derivados de ácidos biliares*. Sobre fondo gris se indican los productos sintetizados y estudiados en la presente Tesis Doctoral.

 C^{24} -amC	 DC ²⁴ -amDC	 <i>amC₂-succínico</i>			
 <i>amC²⁴ amC Succínico</i>	 <i>amC₂-iminodacético</i>	 <i>amC₂-(1,4)ciclohexano</i>			
 <i>amC₂-aminoisoftálico</i>	 <i>amC²⁴₂-trimésico</i>	 <i>amDC²⁴₂-trimésico</i>			
 <i>amC₂-isoftálico</i>	 <i>amC₂-protoporfirina</i>	 <i>amC₂-AEDT-ad₂</i>			
 <i>amC₂-AEDT</i>	 <i>amDC₂-AEDT</i>	 <i>amC²⁴₂-AEDT</i>			
 <i>amDC²⁴₂-AEDT</i>	 <i>amC²⁴₂-piromielítico</i>	 <i>amDC²⁴₂-piromielítico</i>			
 R₁	 R₂	 R₃	 R₄	 R₅	 R₆

En general, excepto los correspondientes a los derivados *amC₂-AEDT* y *amDC₂-AEDT*, todos los valores de *cac* oscilan en el intervalo $(0.01-0.4) \times 10^{-3}$ M, muy inferiores al del ácido cólico, para el que se han determinado valores comprendidos entre 0.01 y 0.02 M.

Los dímeros con restos biliares unidos por la posición 24 presentan los valores más bajos de *cac*, con la excepción del *amC²⁴₂-piromielítico*. La capacidad como agente surfactante puede medirse a través de la mínima concentración necesaria para obtener el máximo de reducción de la tensión superficial. Por lo tanto, los dímeros que presentan el mayor poder surfactante, el *amC²⁴₂-AEDT*, el *amDC²⁴₂-AEDT* y el *amDC²⁴₂-piromielítico*, causan una reducción de la tensión superficial hasta 44 mN/m con tan sólo una concentración entre 1.6 y 2.6×10^{-5} M. Esto se explica por las características

estructurales comunes a estos derivados que se comportan como surfactantes tipo *geminis*.³³⁻³⁴ Los surfactantes *geminis* constituyen una familia caracterizada por poseer al menos dos cadenas hidrófobas y dos grupos iónicos o polares. Dichos surfactantes tienen valores de *cac* que son, entre uno y tres órdenes de magnitud, menores que los correspondientes a los surfactantes monoalquílicos que se utilizan como referencia. Este hecho queda patente al comparar los valores del amC^{24}_2 -AEDT y del $amDC^{24}_2$ -AEDT con los de amC_2 -AEDT y $amDC_2$ -AEDT, respectivamente. El dímero amC_2 -AEDT-Ad₂, que incorpora dos restos adamantilo, presenta parámetros de *geminis* aunque, estrictamente hablando, su estructura no corresponde a este tipo de surfactantes.

Los dímeros con los restos de esteroide unidos al AEDT por la posición 3 conservan los grupos carboxílicos de las colas terminales libres, por lo que, al presentar cuatro grupos carboxilato y sólo dos restos esteroide, deberían ser más hidrófilos que los propios ácidos biliares sin modificar. Los valores de los parámetros experimentales así lo atestiguan. Los surfactantes *bolaform* tienen los grupos polares separados por una cadena alquílica hidrófoba. Consecuentemente, son surfactantes menos hidrófobos que los clásicos, llevando asociados valores más altos de la *cmc*.³⁵ Por lo tanto, se concluye que los dímeros a los que se refiere este párrafo, presentan características de surfactantes tipo *bolaform*. De hecho el dímero amC_2 -AEDT resultó ser el peor surfactante con una *cac* igual o mayor incluso que la del ácido cólico de partida. Esta conclusión está en consonancia con los parámetros determinados para derivados *bolaform* del ácido cólico en los que los grupos sustituyentes en C3 portan una función ácida por lo que presentan dos grupos carboxilato en los extremos del surfactante.³⁶ Asimismo, la mayoría de los dímeros restantes tiene características de *bolaform* ya que sus valores de *cac* son relativamente altos y la tensión superficial no baja de 47 mN/m en ningún caso.

Los dímeros con puentes de isoftálico o protoporfirina (voluminosos, rígidos y aromáticos) son los que menos reducen la tensión superficial en la *cac* (52-59 mN/m).

El efecto que se produce al reducir el número de grupos hidroxilo en el residuo esteroide parece no ser predominante. Así, cuando se pasa de un derivado de ácido cólico a uno de desoxicólico con el mismo puente de unión, en unos casos se reduce el valor de la *cac* y en otros aumenta.

La forma y el tamaño de los agregados formados por los distintos derivados, así como su evolución con el tiempo, muestran algunas diferencias entre sí. En la *Tabla 3.9* se muestran imágenes TEM y tamaños medios determinados a partir de tales imágenes y de las experiencias de la dispersión de luz láser para dímeros con puentes flexibles. Excepto el dímero del ácido desoxicólico, los demás dímeros presentaron agregados, más o menos globulares, con tamaños que varían en el intervalo 50-500 nm. Los procesos de asociación/fusión de partículas son rápidos con la aparición de grandes agregados vermiformes. En algunos casos, ejemplo representativo es el DC^{24} - $amDC$, se observa la formación de fibras. Por su parte, el dímero C^{24} - amC , con un grupo hidroxilo adicional en cada esteroide, forma tubos moleculares.

La *Tabla 3.10* muestra análogos resultados para dímeros con puentes rígidos. Los compuestos amC_2 -(1,4)ciclohexano y amC_2 -isoftálico originan agregados similares en tamaño y forma a los de los dímeros sin rigidez. En el caso del amC_2 -(1,4)ciclohexano aparecen también agregados en forma de pseudo-vesículas (de 38 nm de diámetro medio) siendo el único dímero que muestra este comportamiento. En presencia de NaCl, el amC_2 -aminoisoftálico mostró una agregación más lenta, teniendo los agregados de carácter micelar un tamaño en torno a 2 nm. Tales micelas forman agregados que tardan tiempo en empaquetarse y fusionarse. En el caso del amC_2 -protoporfirina, los agregados menores, sin fusionarse en una sola partícula, presentan un aspecto que recuerda a un "racimo de uvas apretadas".

Tabla 3.9

Radio hidrodinámico e imágenes TEM de dímeros de ácidos biliares ligados mediante puentes flexibles.
 R_{TEM} es el radio determinado a partir de imágenes TEM y R_h mediante dispersión de luz.

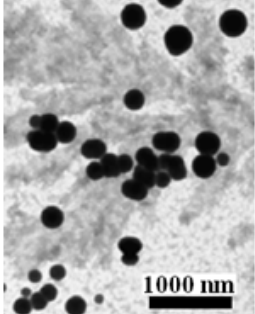
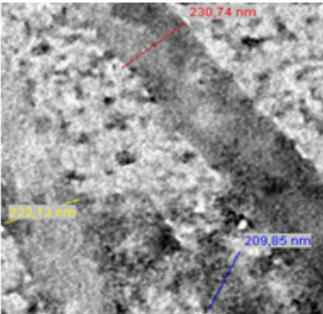
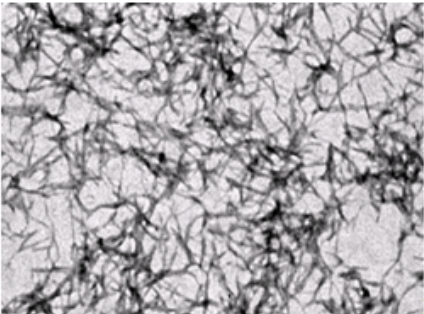
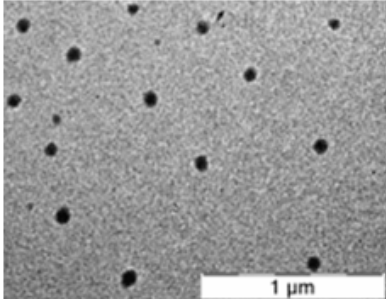
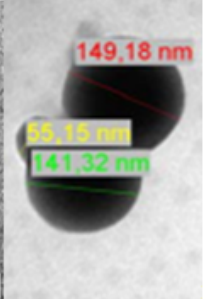
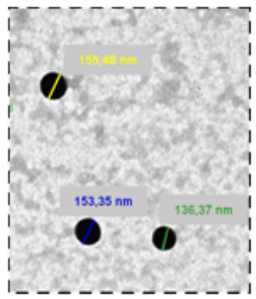
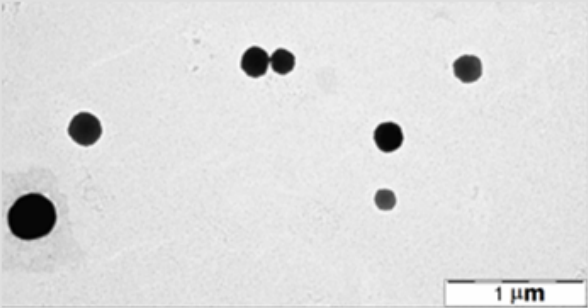
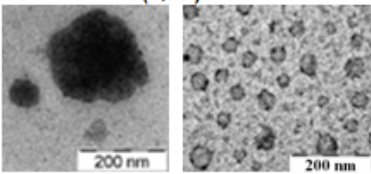
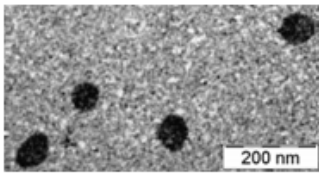
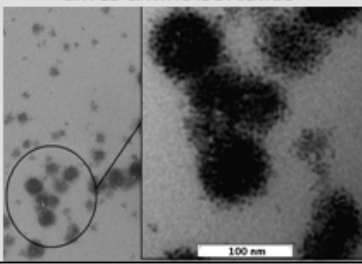
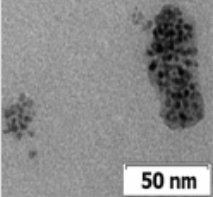
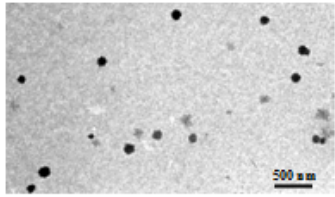
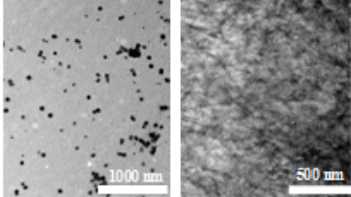
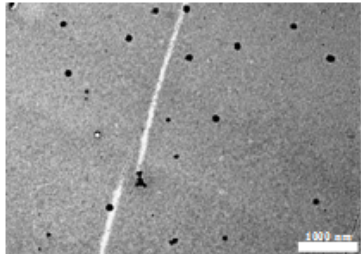
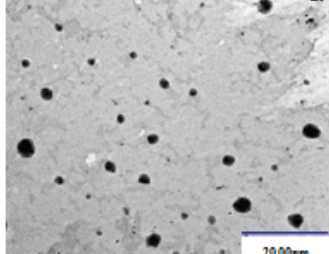
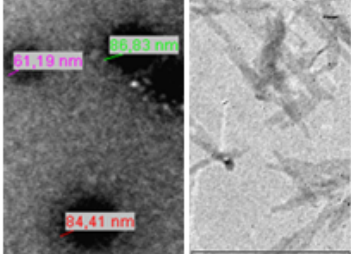
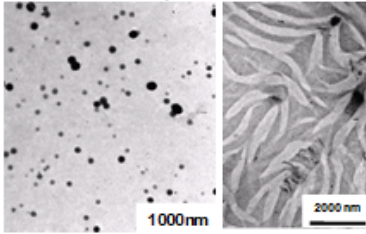
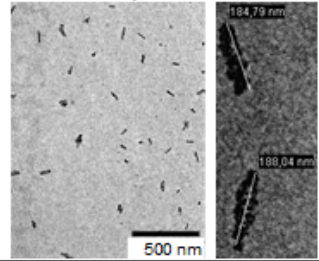
<p style="text-align: center;"><i>C²⁴-amC</i></p> 		<p style="text-align: center;"><i>DC²⁴-amDC</i></p> 
<p>R_{TEM} (nm) 75-200 R_h (nm) 125±5</p>		<p>R_{TEM} (nm) 55 R_h (nm) 68.7</p>
<p style="text-align: center;"><i>amC₂-succínico</i></p> 		<p style="text-align: center;"><i>Succínico-amC²⁴-amC</i></p> 
<p>R_{TEM} (nm) 27-100 R_h (nm) 93±7</p>		<p>R_{TEM} (nm) 55-150 R_h (nm) 149±9</p>
<p style="text-align: center;"><i>amC₂-iminodiacético</i></p> 		
<p>R_{TEM} (nm) 70-175 R_h (nm) 28-195</p>		

Tabla 3.10

Tamaño de agregados de dímeros de ácidos biliares unidos mediante anillos rígidos. RTEM es el radio determinado a partir de imágenes TEM y Rh mediante dispersión de luz. Sobre fondo gris se indican los productos sintetizados y estudiados en la presente Tesis Doctoral.

 <p><i>amC2</i>-(1, 4)ciclohexano</p>		 <p><i>amC2</i>-isoftálico</p>		 <p><i>amC2</i>-aminoisoftálico</p>	
RTEM (nm) - Rh (nm) 87±11		RTEM (nm) - Rh (nm) 89±6		RTEM (nm) 0.5-2 ; 20-100 Rh (nm) 1-2 ; 80-200	
 <p><i>amC2</i>-protoporfirina</p>		 <p><i>amC2</i>²⁴₂-trimésico</p>		 <p><i>amDC2</i>²⁴₂-trimésico</p>	
RTEM (nm) 1.6 Rh (nm) -		RTEM (nm) 57 Rh (nm) 67.7		RTEM (nm) - Rh (nm) 115	
 <p><i>amC2</i>-AEDT-ad₂</p>		 <p><i>amDC2</i>²⁴₂-AEDT</p>		 <p><i>amC2</i>²⁴₂-AEDT</p>	
RTEM (nm) - Rh (nm) 100		RTEM (nm) 100-200 Rh (nm) 114±5		RTEM (nm) 60-85 Rh (nm) 5 ; 150	
 <p><i>amDC2</i>²⁴₂-piromielítico</p>		 <p><i>amC2</i>²⁴₂-piromielítico</p>			
RTEM (nm) 34.5 Rh (nm) 84±7		RTEM (nm) 200 Rh (nm) 58.5			

Bibliografía.

- (1) Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, *12*, 2186.
- (2) Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1998**, *14*, 4359.
- (3) Jover, A.; Meijide, F.; Mosquera, V.; Vázquez Tato, J. *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*, 530.
- (4) Roe, J. M.; Barry, B. W. *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, *107*, 398.

- (5) Prosser, A. J.; Franses, E. I. *Colloids Surfaces, A* **2001**, 178, 1.
- (6) Alvarez Alcalde, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2008**, 24, 6060.
- (7) Álvarez Alcalde, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2009**, 25, 9037.
- (8) 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.
- (9) Šegota, S.; Težak, D. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 121, 51.
- (10) Kawabata, Y.; Shinoda, T.; Kato, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 3484.
- (11) Harvey, R. D.; Barlow, D. J.; Brain, A. P. R.; Heenan, R. K.; Zuberi, S.; Zuberi, T.; Lawrence, M. J. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, 164, 341.
- (12) Ramakanth, I.; Shankar, B. V.; Patnaik, A. *Chem. Comm.* **2008**, 4129.
- (13) Delaittre, G.; Dire, C.; Rieger, J.; Putaux, J.-L.; Charleux, B. *Chem. Comm.* **2009**, 2887.
- (14) Morigaki, K.; Walde, P. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **2007**, 12 75.
- (15) Almgren, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1508, 146.
- (16) Coldren, B.; Van Zanten, R.; Mackel, M. J.; Zasadzinski, J. A.; Jung, H.-T. *Langmuir* **2003**, 19, 5632.
- (17) Hao, J.; Zemb, T. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **2007**, 12 129.
- (18) Vallejo, M. C.; Matsuo, A. L.; Ganiko, L.; Soares Medeiros, L. C.; Miranda, K.; Silva, L. S.; Freymüller-Haapalainen, E.; Sinigaglia-Coimbra, R.; Almeida, I. C.; Puccia, R. *Eukaryotic Cell* **2011**, 343.
- (19) Park, C.; Lee, I. H.; Lee, S.; Song, Y.; Rhue, M.; Kim, C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1199.
- (20) Jung, H. T.; Coldren, B.; Zasadzinski, J. A.; Iampietro, D. J.; Kaler, E. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 1353.
- (21) Kim, K. T.; Winnik, M. A.; Manners, I. *Soft Matter* **2006**, 2, 957.
- (22) Tian, L.; Nguyen, P.; Hammond, P. T. *Chem. Commun.* **2006**, 3489.
- (23) Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Nunez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, 18, 987.
- (24) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, 87, 1666.
- (25) Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 821.
- (26) Bhattacharya, S.; Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Srivastava, A. *Molecular Gels. Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks*. G. Weiss and P. Terech (eds.), **2006**, Chapter 17. Springer, 613.
- (27) Scolaro, L. M.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Patane, S.; Cefali, E.; Allegrini, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2453.
- (28) Inamura, I.; Uchida, K. *Bull. Chem Soc. Jpn.* **1991**, 64, 2005.
- (29) Mazer, N. A. C., M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, 18, 3064.
- (30) Antelo Queijo, A. *Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares, Tesis Doctoral, USC* **2008**.
- (31) Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* **2006**.
- (32) Álvarez, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2009**, 25, 9037.
- (33) Alvarez, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2008**, 24, 6060.
- (34) Zana, R.; Xia, J.; eds. *Surfactants Science Series, Dekker, New York* **2004**, 117.

- (35) Zana, R. *Specialist Surfactants, Edited by Robb, I. D.* **1997**, 81.
- (36) Alvarez Alcalde, M. *Estructuras supramoleculares generadas por ácidos biliares y ciclodextrinas, Tesis Doctoral, USC* **2007**.



4 AGREGACIÓN DE TRÍMEROS Y TETRÁMEROS DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO

En este capítulo se mostrarán los resultados del estudio de diversos trímeros y tetrámeros obtenidos a partir del ácido cólico. En los dos trímeros sintetizados, el puente de unión es el ácido 5-aminoisoftálico. Dos de los residuos de ácido cólico están unidos por el grupo amino de la posición C3 a los dos grupos ácidos del puente, mientras que el tercero está unido por la posición C24 del esteroide al grupo amino del puente. Por lo tanto, este último esteroide tiene libre la función orgánica de la posición C3 que, en un caso, es un grupo hidroxilo (trímero C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico) y, en el otro, es un grupo amino (trímero amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico, *Figura 4.1*). Los esteroides están unidos al puente mediante enlaces amida.

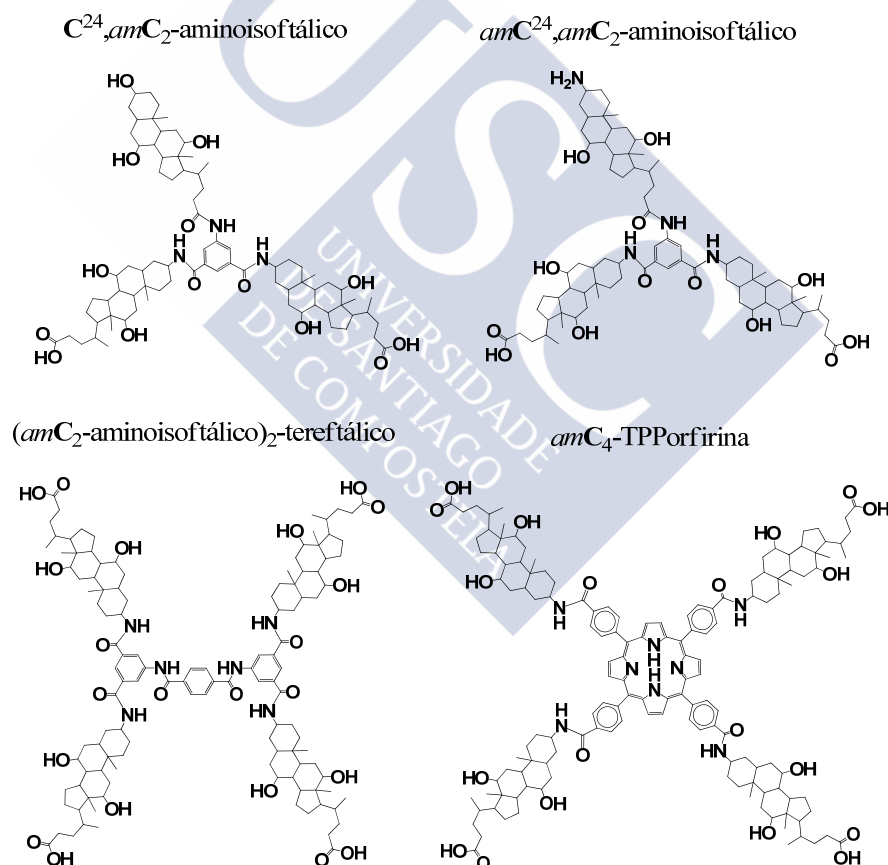


Figura 4.1. Estructuras de los trímeros y de los tetrámeros derivados del ácido cólico.

La naturaleza de los dos núcleos tetravalentes varía pero, en común, ambas estructuras presentan la característica de cierta rigidez estructural debida a la aromaticidad del núcleo empleado. En primer lugar, se sintetizó un núcleo de 1,3-ácido 5-(4-{[3,5-bis(carboxil)fenil]carbamoil}benzamido)benceno-1,3-dicarboxílico, para la obtención del $(amC_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$ y, en segundo lugar, se utilizó un producto comercial, la meso-tetra(4 carboxifenil)porfirina, para el derivado $amC_4\text{-TPPorfirina}$.

Como en el capítulo anterior, se mostrarán los resultados obtenidos de los estudios de tensión superficial, dispersión de luz láser y TEM. En el caso del derivado de porfirina, también se ha realizado un estudio mediante absorción ultravioleta visible.

4.1 TRÍMERO C²⁴,AMC₂-AMINOISOFTÁLICO.

Se realizaron algunos experimentos previos para determinar la *cac*, partiendo de distintas concentraciones iniciales y variando el medio acuoso. En comparación con los dímeros estudiados en el capítulo anterior, estos experimentos previos mostraron que el C²⁴,amC₂-aminoisofáltico tiene una menor solubilidad y una mayor capacidad para formar geles. Cabe destacar las propiedades de birrefringencia que presentaron algunos geles obtenidos al evaporar disoluciones del compuesto en mezclas de agua/acetona. Las sales inertes añadidas resultaron ser un factor decisivo ya que las disoluciones de este compuesto en disoluciones reguladoras de NaHCO₃/Na₂CO₃ terminaron precipitando antes de las 24 horas y las medidas de tensión superficial (mediante balanza) alcanzaban un valor máximo y luego decrecían gradualmente sin llegar al equilibrio. Se obtuvo una mayor estabilidad y mejor solubilidad en disoluciones con presencia de NaCl y NaOH. Todas estas variables limitan el medio y la concentración inicial de partida a la hora de determinar las características de surfactantes de los compuestos. Por ejemplo, la realización de medidas de fluorescencia o tensiómetro de gota requieren un tiempo relativamente largo, observándose la precipitación del soluto.

Tensión superficial.

El método más adecuado para el tipo de estudio que se pretende resultó ser la balanza de tensión superficial equipada con un plato de Wilhelmy. Los resultados obtenidos en presencia de NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M se recogen en la *Figura 4.2* en la que se representa la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración. Debe notarse que no es posible establecer una *cac* y que la tensión superficial mínima alcanzable es 52.9 mN/m. Por lo tanto, en comparación con surfactantes clásicos, el C²⁴,amC₂-aminoisofáltico es una molécula con poca capacidad para reducir la tensión superficial.

Para surfactantes de tipo *gemi* con largas cadenas alquílicas Rosen *et al*¹⁻² encontraron un comportamiento anómalo, en comparación con los surfactantes típicos. Por debajo de la *cac*, estos autores observaron un aumento del área superficial por molécula al disminuir la concentración, lo que atribuyeron a la formación de estructuras multicapa y/o a la formación de pequeños agregados oligoméricos como dímeros, trímeros o tetrámeros (y que consideran submicelas), no activos superficialmente. También se observó este fenómeno en surfactantes tipo *gemi* derivados de ácidos biliares, estudiados por nuestro grupo de investigación,³ cuya estructura está íntimamente relacionada con la de los aquí presentados. Sin embargo, por debajo de 10⁻⁶ M el comportamiento de este compuesto es extraño ya que al disminuir la concentración del surfactante la pendiente aumenta lo que significa que el área en exceso disminuye. Si las moléculas del producto cada vez tienen más espacio libre en la interfase para ubicarse, no resulta lógico que el área en exceso de la molécula, un área termodinámica, sea cada vez más pequeña (en torno a 116 Å²).

Como en casos anteriores, se calculó la concentración superficial de exceso mediante la ecuación de Gibbs y a partir de ella el área superficial por molécula, habiendo ignorado el tramo indicado. Los resultados obtenidos se recogen en la *Tabla 4.1* pero, por lo comentado, deben considerarse con cautela. La tabla también recoge los datos obtenidos

en una disolución reguladora de carbonato/bicarbonato, siendo congruentes con los anteriores.

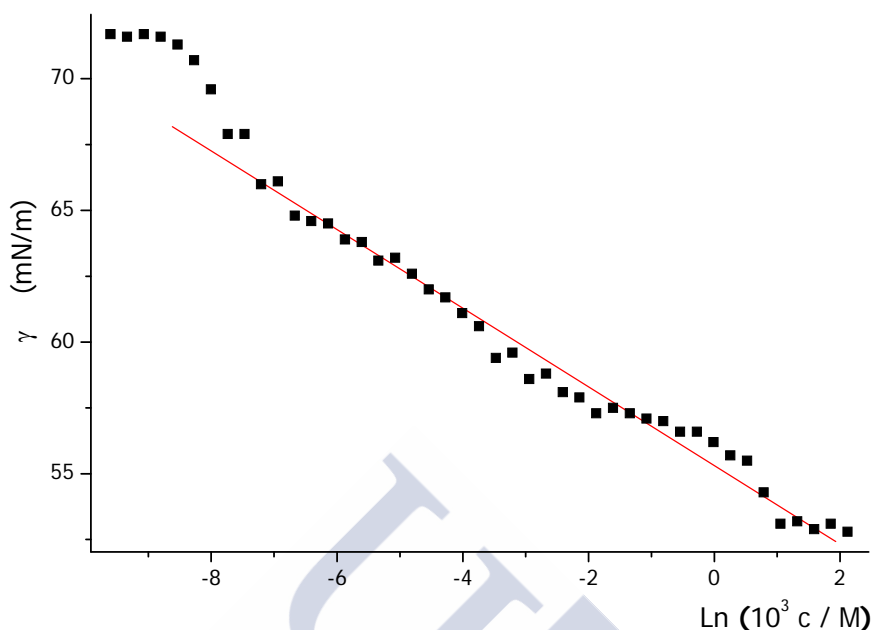


Figura 4.2. Representación de la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración de la sal del C²⁴, amC₂-aminoisoftálico en presencia de NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M, a 25 °C.

Tabla 4.1
Propiedades superficiales del C²⁴, amC₂-aminoisoftálico determinadas a 25°C por balanza de tensión superficial.

Disolución	pH	10 ⁷ Γ (mol m ⁻²)	a _o (Å ²)
[NaOH]= 0.01 M y [NaCl]= 0.04M	12	6.02	275
[NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃] = 0.015 M	9.90	6.78	244

Para comparar estos resultados con el área de la sección molecular se recurrirá a las estimaciones realizadas en la sección 2.5 (Tabla 2.32). Así, se obtiene un valor de es 360 Å² para la sección plana del compuesto (Figura 4.3). La diferencia entre ambos valores no es determinante para decantarse hacia una disposición plana en la interfase aire/agua o hacia la formación de una multicapa.

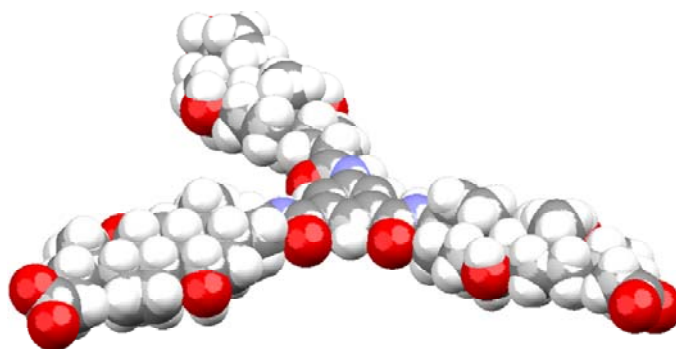


Figura 4.3. Representación en 3D del C²⁴, amC₂-aminoisoftálico.

Dispersión de luz láser.

Mediante dispersión de luz láser, se determinó el diámetro de los agregados formados en disolución acuosa. Se preparó una disolución 5.1×10⁻³ M de la sal del

trímero en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M. Las muestras se prepararon disolviendo el sólido en el volumen deseado, con ayuda de un baño de ultrasonidos. Una vez disuelto todo el sólido se filtraban (diámetro de poro 0.45 μm), de forma inmediata, para eliminar el polvo que pudieran contener. Este paso ha de ser rápido para evitar que se pierda muestra en el filtro. Las medidas se realizaron a 90° pasados 45 minutos desde la preparación de la disolución ya que a tiempos más cortos la intensidad de luz dispersada no es estable. Los resultados se muestran en la *Figura 4.4*, pudiendo destacar que el diámetro eficaz medio de todas las partículas presentes en la disolución es 126.3 nm.

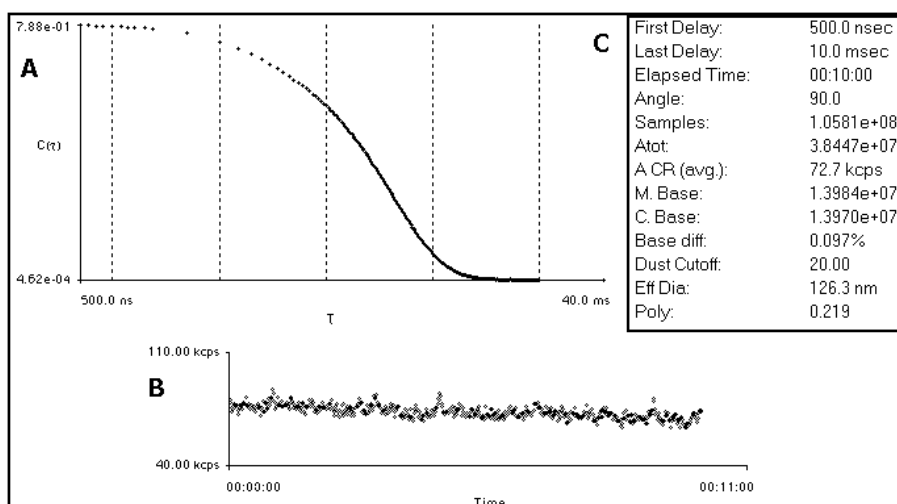


Figura 4.4. Función de autocorrelación (A), variación de kilocuentas (B) y parámetros del experimento (C). $[C^{24}, amC_2\text{-aminoisofáltico}] = 5.1 \times 10^{-3}$ M, NaOH 0.01 M, NaCl 0.04 M y $t = 45$ min.

El análisis de los datos según el método NNLS (*Non-Negatively Constrained Least Squares: multiple pass*) ofrece más información acerca de las poblaciones, tamaño y proporción de las partículas presentes (*Figura 4.5*).

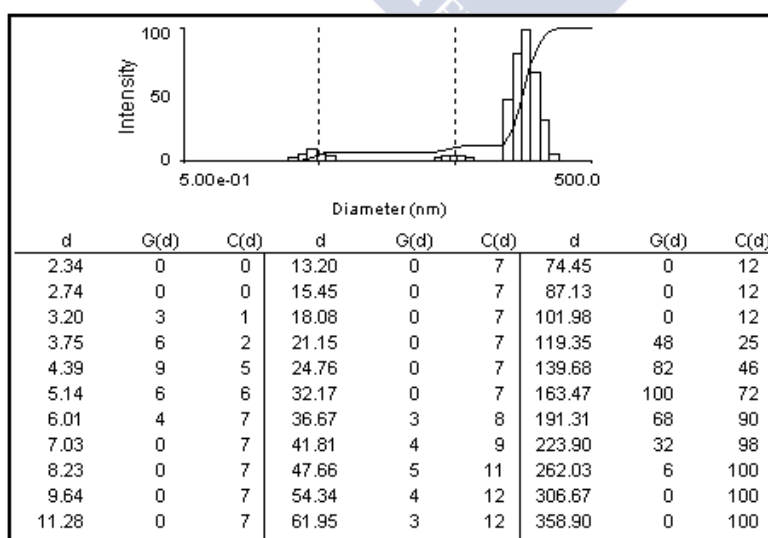


Figura 4.5. Representación de los datos de diámetro por intensidad obtenidos mediante NNLS de sal $C^{24}, amC_2\text{-aminoisofáltico}$ 5.1×10^{-3} M.

Al representar la intensidad vs diámetro de partícula se observan tres poblaciones (de 3.2 a 6.1 nm, de 36.67 a 61.95 nm y de 119 a 262 nm), siendo la tercera la que adquiere mayor peso. Dado que la intensidad de dispersión depende del tamaño de partícula, las partículas grandes dispersan mucha más la luz que las pequeñas por lo que estas últimas, aun siendo las más abundantes, pueden dispersar menos intensidad de luz que las más grandes.

Como ya se ha comentado, dependiendo de la fuerza iónica y de su naturaleza, las muestras pueden permanecer sin precipitar un par de días, aunque con el transcurso del tiempo, las medidas empeoran. En el caso de la muestra anterior, pasadas 24 horas no hubo precipitación pero la intensidad de la luz dispersada dejaba de ser estable (*Figura 4.6*).

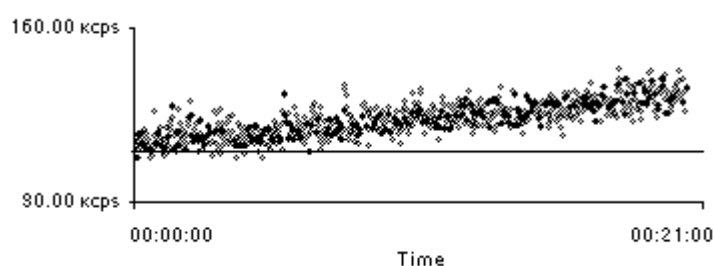


Figura 4.6. Intensidad de la luz dispersada (kilocuentas/s) vs tiempo en las condiciones indicadas en la *Figura 4.5*, después de 24 horas de su preparación.

Análisis de la forma y el tamaño mediante Microscopias.

Se prepararon varias disoluciones en agua con concentraciones en el intervalo $(0.1-5) \times 10^{-3} M$, sin electrólitos añadidos, para ser analizadas por AFM. Acto seguido las disoluciones fueron filtradas (poro del Filtro Anotopo-25: $0.2 \mu m$) y se prepararon las muestras para AFM pasadas 2 horas desde su preparación. Sobre una superficie lisa de silicio monocristalino se depositaron un par de gotas de la disolución y se dejó que se evaporara el disolvente dentro de una campana de flujo laminar para evitar el polvo. Cuando se trabaja con cualquier microscopía (AFM, TEM, SEM...) hay que tener en cuenta el tiempo de evaporación del disolvente ya que éste puede dar lugar a fenómenos de pre-concentración de la muestra, con lo que el tamaño de partícula se puede ver afectado al variar la concentración y también como consecuencia de la posible aglomeración de las partículas de la disolución. También pueden darse fenómenos de reorganización, como la cristalización de sales inorgánicas presentes en la disolución o del propio producto. Todo esto implica la necesidad de contrastar diferentes técnicas al mismo tiempo, por ejemplo, microscopías y dispersión de luz, para no caer en interpretaciones erróneas del significado de un resultado que solo está ocurriendo cuando se evapora el disolvente y no en disolución. En la técnica TEM se deposita una gota de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de una resina (Formvar, polímero formado por polivinil alcohol y formaldehído, como copolímeros, y polivinil acetato). La mayor parte del líquido se elimina y lo restante se seca rápidamente. Aunque esto reduce el efecto del tiempo de la evaporación del disolvente con respecto a la técnica de AFM, pueden surgir problemas adicionales ya que al requerirse alto vacío puede verse alterada la estructura del agregado. Por ejemplo, la deshidratación de un gel puede afectar a su tamaño y morfología. Como en anteriores casos, después de preparada la disolución, se filtró a través de un filtro de poro $0.45 \mu m$.

La *Figura 4.7* muestra algunas imágenes obtenidas mediante AFM. En las mismas se distinguen partículas esféricas de tamaño nanométrico, grandes agregados con estructura vermiforme y agregados cristalinos.

Incluso en la muestra más diluida (*Figura 4.7A*), se observan partículas esféricas conformando estructuras vermiformes. Este hecho refleja la tendencia del C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico a aglomerarse y precipitar con el tiempo. A una concentración de 5×10^{-4} M, las estructuras cristalinas llegan hasta $2 \mu\text{m}$ (*Figura 7B*), y a concentraciones mayores superan las $15 \mu\text{m}$ (*Figura 7D*). Los cristales presentan estructura de pequeñas fibras cristalinas empaquetadas en forma de haces (*vide infra*). Aunque la cristalización se vuelve el proceso predominante, la agregación de partículas sigue presente.

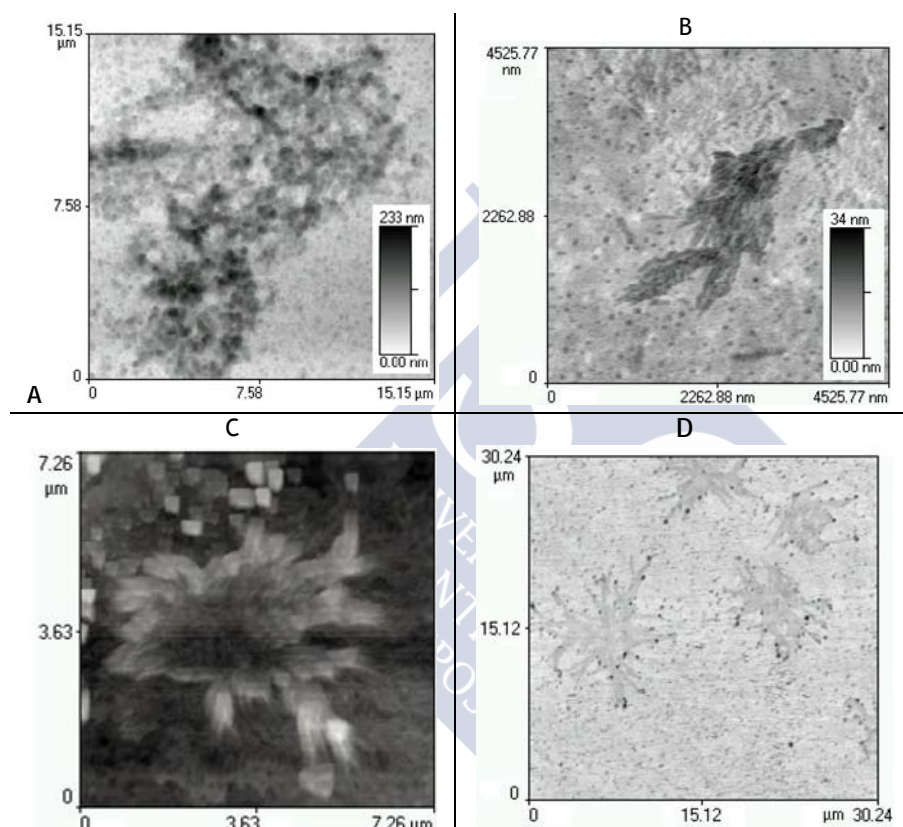


Figura 4.7. Imágenes AFM a distintas concentraciones del C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico. A) 1×10^{-4} M. B) 5×10^{-4} M. C) 1×10^{-3} M. D) 5×10^{-3} M.

La *Figura 4.8* muestra imágenes AFM así como el tamaño de algunas partículas obtenido mediante el análisis topográfico realizado por el propio equipo. Los valores determinados en el caso C (concentración 1×10^{-3} M) deben tomarse con precaución debido a la presencia de gran cantidad de cristales. En general, los tamaños así obtenidos son comparables con los que pueden determinarse mediante el software Image-J (*Figura 4.9*) de las partículas esféricas presentes. La ventaja de esta metodología es que permite disponer fácilmente de un mayor número de datos. No se observa una tendencia clara en la media de tamaño de partícula con la concentración, pero todos los valores están en el rango estimado anteriormente por dispersión de luz. Esta aleatoriedad puede ser consecuencia del efecto que sobre el tamaño de partícula tiene el tiempo de secado de la muestra, según lo descrito anteriormente.

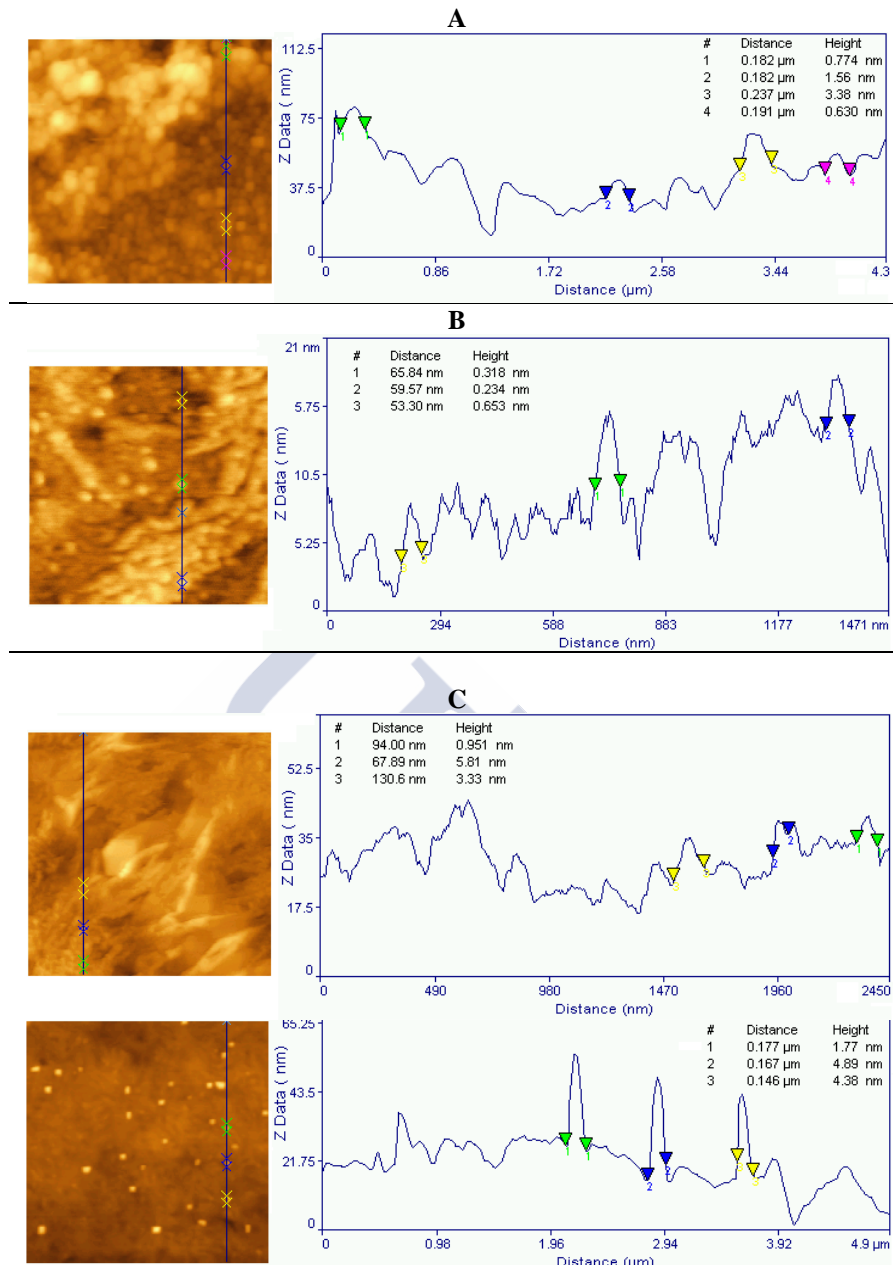


Figura 4.8. Análisis de las imágenes AFM a distintas concentraciones de C^{24} , amC_2 -aminoisofáltico. A) 1×10^{-4} M. B) 5×10^{-4} M. C) 1×10^{-3} M. D) 5×10^{-3} M.

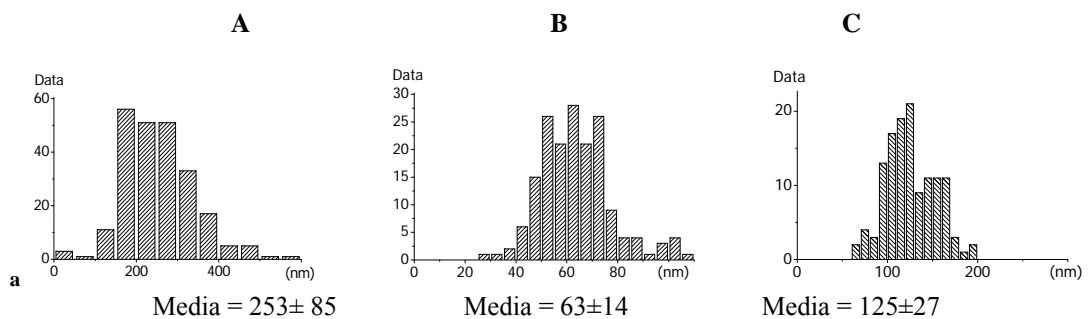


Figura 4.9. Histogramas de la distribución del diámetro de partículas del C^{24} , amC_2 -aminoisofáltico a distintas concentraciones. A) 1×10^{-4} M. B) 5×10^{-4} M. C) 5×10^{-3} M.

La solubilidad del trímero en agua (MilliQ) es muy baja, ya que la tendencia a agregarse es muy grande, llegando a precipitar el soluto de una disolución 5×10^{-4} M

incluso antes de las 12 horas. Sin embargo, en suspensión permanecen grandes partículas (de hasta 500 nm de diámetro) aun transcurrida una semana de su preparación y precipitada ya una gran parte del soluto. En las imágenes TEM estas partículas esféricas muestran una alta densidad de materia y de contorno irregular (*Figura 4.10*). Al mismo tiempo, se pueden observar procesos de *sintering* que se reconocen al ver partículas que se fusionan para formar una más grande. Por lo tanto, al pasar el tiempo y precipitar en parte, no se detiene la agregación del C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico sino que se ve ralentizada por la baja concentración de partículas que permanecen en suspensión.

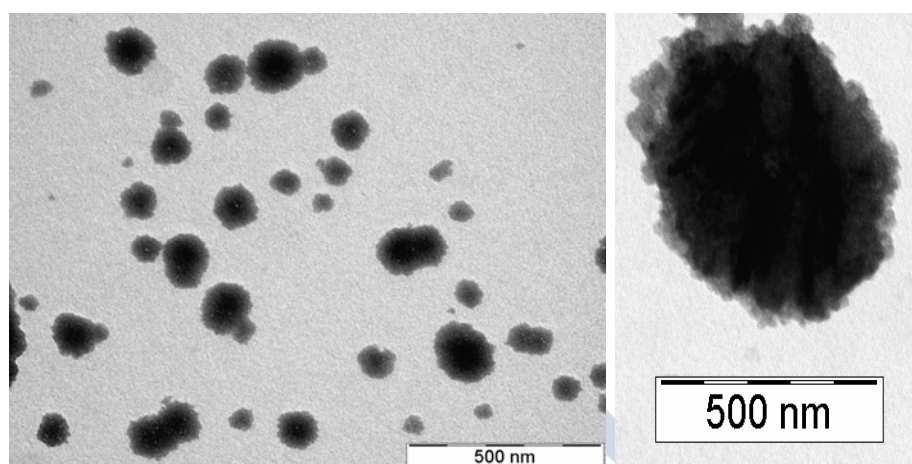


Figura 4.10. Imagen TEM del C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico (5×10^{-4} M) tras una semana de la preparación de la disolución.

Con el fin de obtener un monocristal, se intentó la cristalización del compuesto en medio acuoso para lo que se calentó agua (sin llegar a hervir) y se disolvió la máxima cantidad posible (0.023 M aproximadamente). Se requirieron largos tiempos de agitación. Una vez disuelto y separado de la fuente de calor, el C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico gelifica al disminuir la temperatura. Este gel conserva una gran fluidez, aspecto turbio y se observa birrefringencia. Al tomar una muestra y analizarla mediante microscopía confocal y TEM (*Figura 4.11*) se observan estructuras cristalinas en forma de fibras empaquetadas.

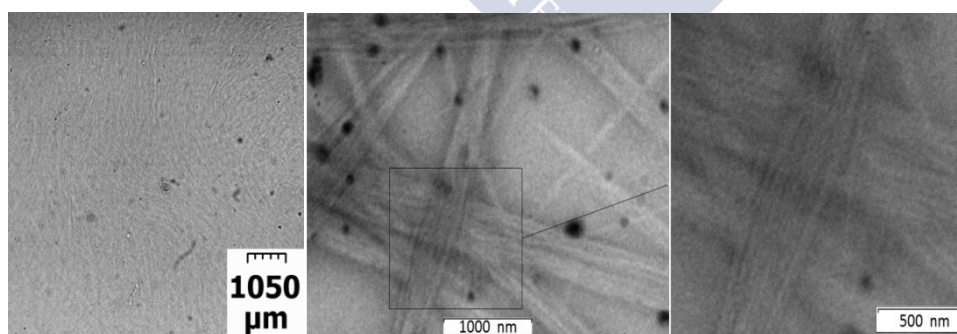


Figura 4.11. Imágenes confocal (izquierda) y TEM (central y derecha) del trímero C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico (0.023 M) tras una 1 hora de la preparación de la disolución.

Con el fin de mejorar la solubilidad del compuesto, se intentó la cristalización en una mezcla de disolventes para lo que se escogió la mezcla de agua/acetona. La lenta evaporación de la acetona permitió la obtención de un cristal de un tamaño aceptable, de 1×3 mm. Al tratarse de haces de fibras cristalinas, como muestran las imágenes SEM

(Figura 4.12) y de microscopia confocal (Figura 4.13) la estructura no pudo ser resuelta mediante la técnica de monocristal de rayos-X.

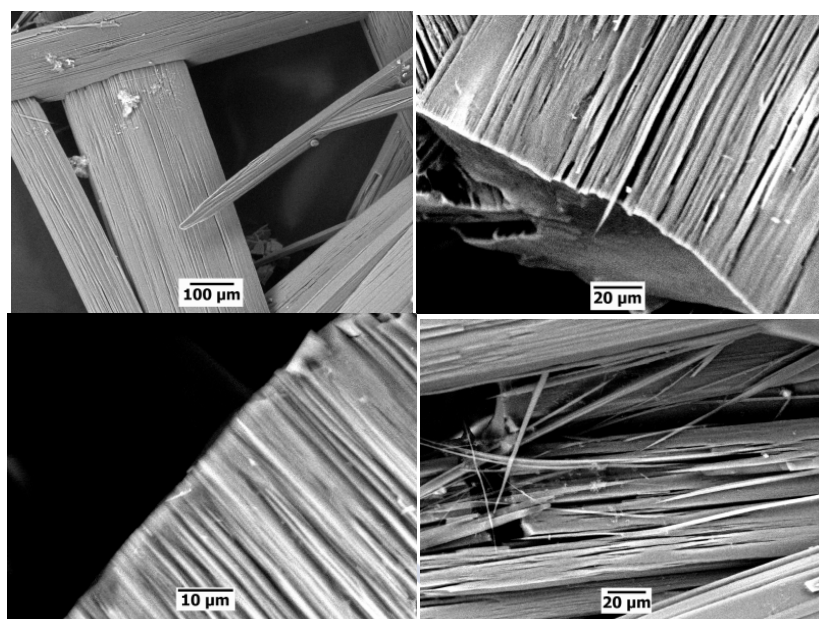


Figura 4.12. Microfotografías SEM de cristales de C²⁴, amC₂-aminoisofthalico.

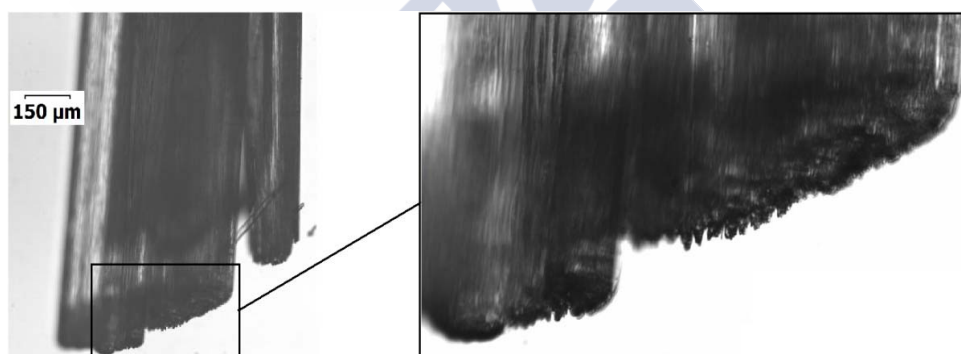


Figura 4.13. Imagen confocal de un cristal de C²⁴, amC₂-aminoisofthalico.

Retornando a los estudios de agregación en disolución, se obtuvieron imágenes a diferentes tiempos y se midió el tamaño de partículas, ignorando los grandes agregados de producto precipitado. La Figura 4.14 resume las imágenes de los resultados más representativos obtenidos de una disolución 5×10^{-3} M en presencia de una disolución reguladora de NaHCO₃/Na₂CO₃ 0.05 M, transcurrida una hora desde su preparación.

Se puede observar que conviven en la disolución pequeñas partículas, inferiores a 20 nm (posiblemente micelas), partículas esféricas más grandes, de aproximadamente 50 nm, y estrechas fibras (posiblemente cristalinas) con otras de tamaño superior. Se midieron (mediante el software Image-J) separadamente los tamaños de cada tipo de estructura y los histogramas se representan en la Figura 4.15.

Un escrutinio más detallado de las partículas esféricas de tamaño ≈ 50 nm permitió detectar partículas tipo donuts o pseudo-vesículas. En la Figura 4.16 se indican mediante círculos y flechas las partículas detectadas, cuya distribución de tamaños (y ampliación) se recogen en la Figura 4.17, después de 1 y 24 horas desde la preparación de la disolución.

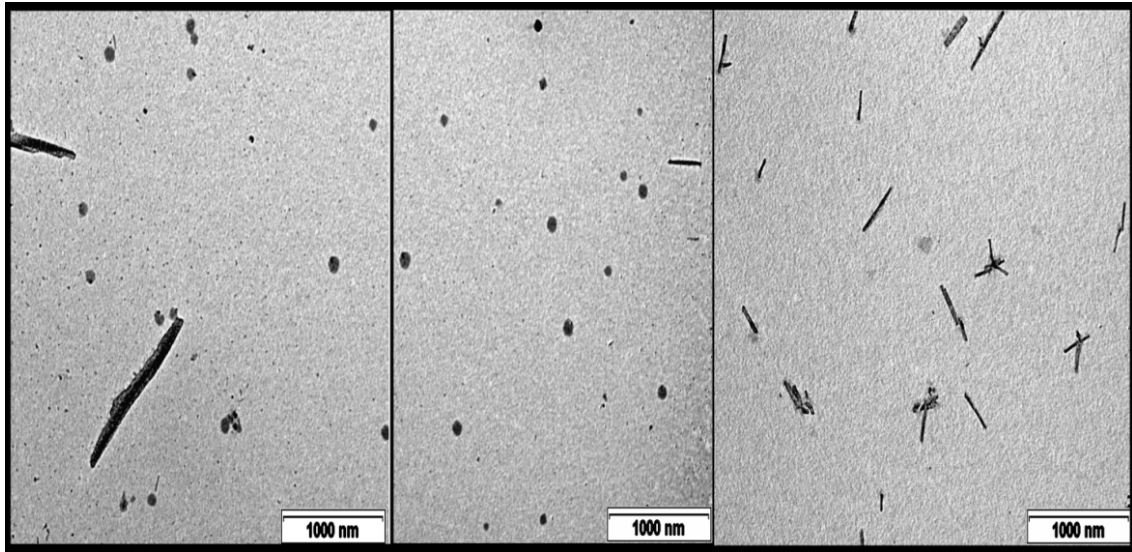


Figura 4.14. Imágenes TEM de los agregados originados por una disolución 5×10^{-3} M de C^{24} , amC_2 -aminoisulfático con regulador de $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0.05 M, transcurrida una hora desde la preparación de la misma.

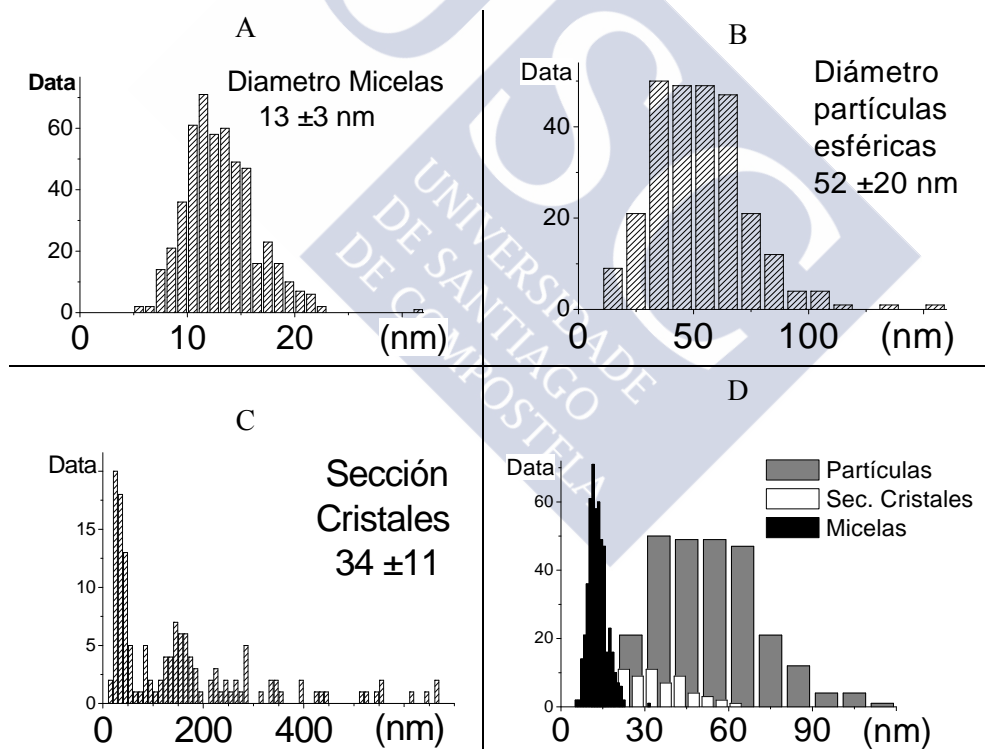


Figura 4.15. Histogramas de la distribución de diámetros de las partículas observadas en imágenes TEM del C^{24} , amC_2 -aminoisulfático al cabo de 1 hora. A) Agregados micelares B) Partículas esféricas. C) Diámetro de las fibras cristalinas. D) Superposición de los histogramas.

Sin embargo, al cabo de cuatro días las pseudo-vesículas dejan de ser observadas y las partículas esféricas sin estructura interna, habiendo aumentado su tamaño medio y la polidispersidad (Figura 4.18). Siguen apareciendo fibras y estructuras cristalinas de gran tamaño que, al menos en algunos casos, corresponden a carbonatos.

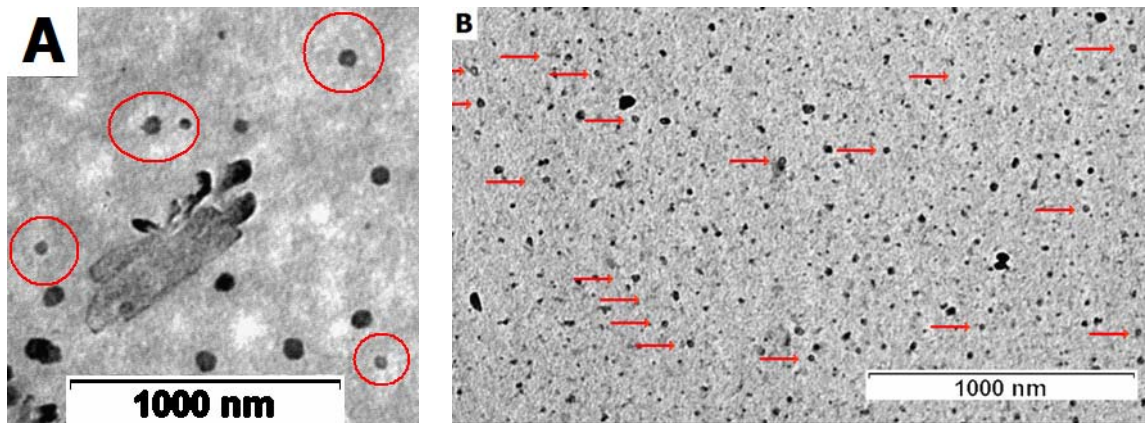


Figura 4.16. Microfotografías TEM de los agregados originados por el C^{24} , amC_2 -aminoisofáltico (disolución $5 \times 10^{-3} M$ con $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0.05 M). A) Transcurrida 1 hora de la preparación y B) 24 horas.

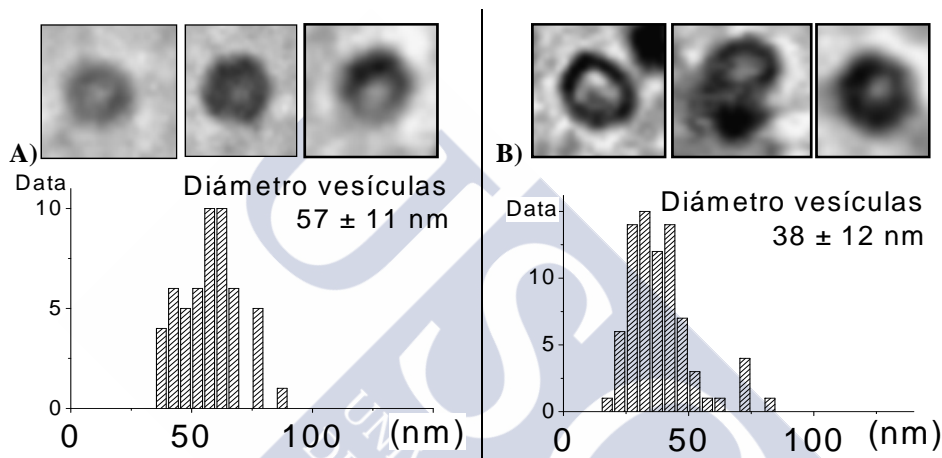


Figura 4.17. Microfotografías TEM y tamaño de las pseudo-vesículas del C^{24} , amC_2 -aminoisofáltico ($5 \times 10^{-3} M$ con $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0.05 M) transcurridas A) 1 hora. B) 24 horas de la preparación de una disolución.

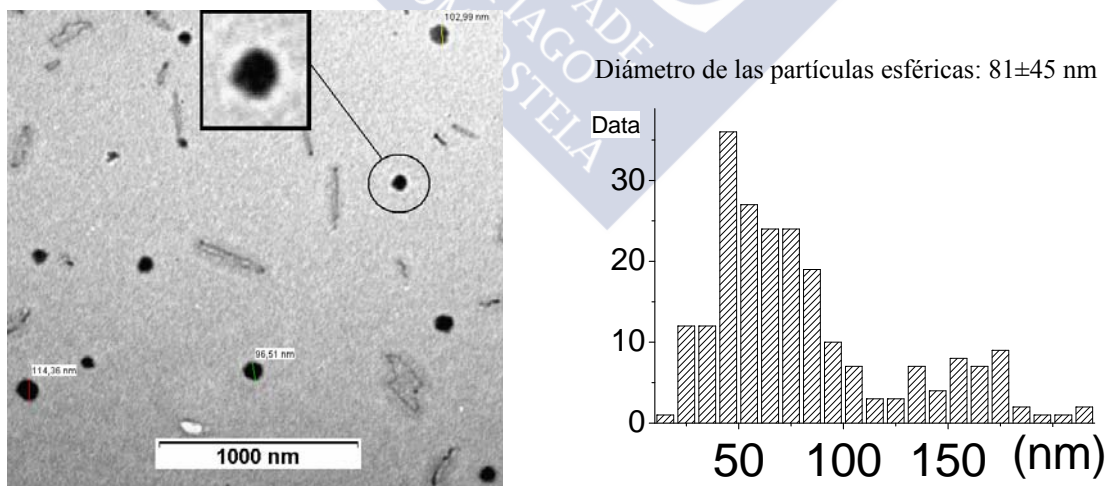


Figura 4.18. Imagen TEM del C^{24} , amC_2 -aminoisofáltico ($5 \times 10^{-3} M$ con $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0.05 M) transcurridos 4 días de la preparación. Histograma de la distribución de tamaños de las partículas esféricas.

Como c en el capítulo anterior, se han realizado estudios de la agregación del trímero en $NaOH$ 0.01 M. Se observa que la solubilidad mejora pues no aparece precipitado pasadas 24 horas de la preparación de la disolución, aunque la disolución presenta turbidez. Esto imposibilita el análisis mediante dispersión de luz. Se deja pasar tiempo,

hasta 14 días, a temperatura ambiente, esperando que la disolución se estabilice y los agregados más grandes se acumulen en el fondo, y se observa que los que permanecen en suspensión tienen forma irregular (diámetro medio = 43 nm; *Figura 4.19*). Aun transcurrido este tiempo aparecen unos pocos agregados que recuerdan en tamaño y forma a las pseudo-vesículas ya comentadas. No están bien definidas y la densidad de materia es baja (*Figura 4.19B*). Al aumentar la resolución, las imágenes que se obtienen sugieren que estas partículas están formadas por otras de menor tamaño (diámetro medio = de 4 ± 1 nm, *Figura 4.19C*). Recordemos que en los experimentos de dispersión de luz, se había observado una población con un tamaño comprendido entre 3 y 6 nm (*Figura 4.5*) y que había sido asignada a micelas.

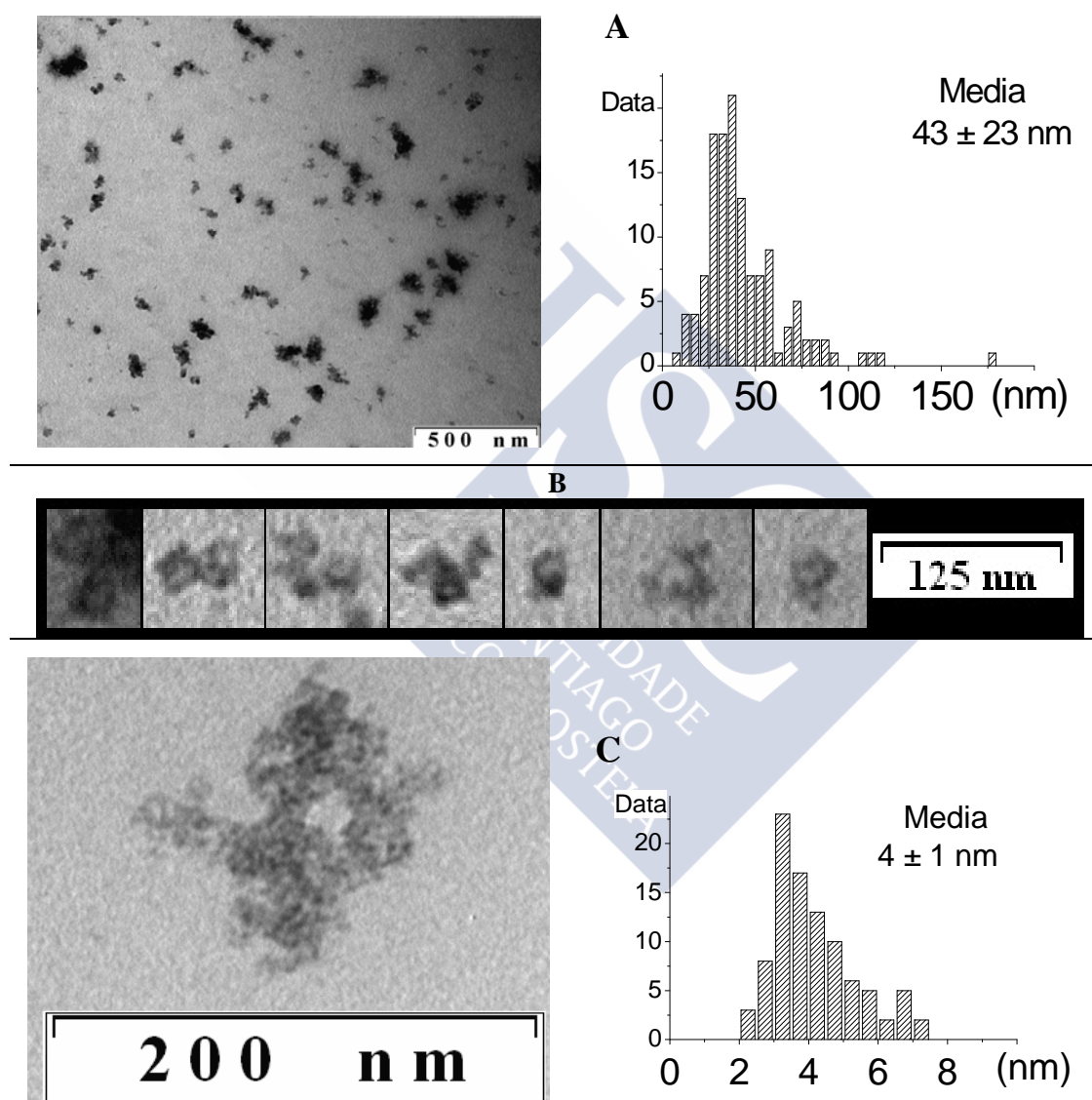


Figura 4.19. Imágenes TEM del C^{24} , amC_2 -aminoisulfático (4.9×10^{-3} M con NaOH 0.01 M) tras 14 días. A) Imagen general e histograma de distribución del tamaño. B) Imágenes de pseudo-vesículas. C) Imagen TEM e histograma de distribución del diámetro de las micelas que forman parte de la estructura de los agregados.

Con el fin de estudiar el posible efecto de la temperatura sobre la agregación, se realizaron algunos experimentos a 4 °C. Se observó que los agregados tenían un aspecto más compacto y un tamaño ligeramente inferior (diámetro = 31 ± 15 nm, *Figura 4.20*).

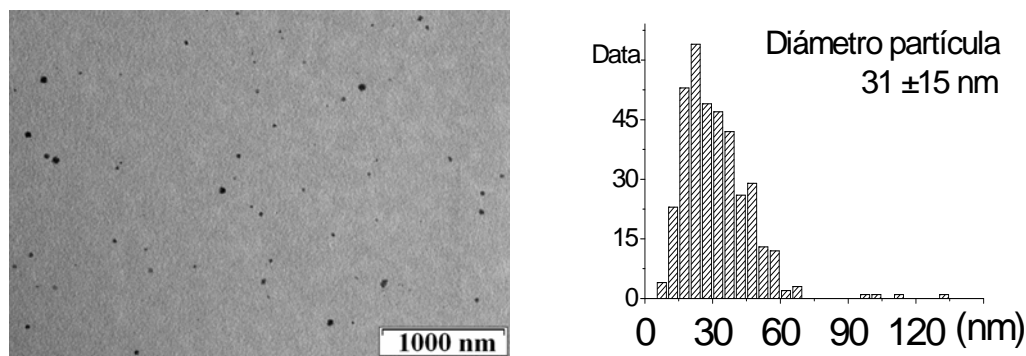


Figura 4.20. Imagen TEM del C^{24},amC_2 -aminisoftálico (4.93×10^{-3} M en NaOH 0.01 M) transcurridos 9 días desde la preparación de la disolución. Temperatura 4 °C.

Efecto de iones metálicos pesados.

De una disolución C^{24},amC_2 -aminisoftálico 5×10^{-3} M en presencia de $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 0.050 M, preparada para el estudio de los fenómenos de agregación, se empleó una parte para observar la influencia al añadir una sal de un metal pesado. La Figura 4.21 es representativa de los resultados obtenidos, al añadir Co^{2+} sobre dicha disolución.

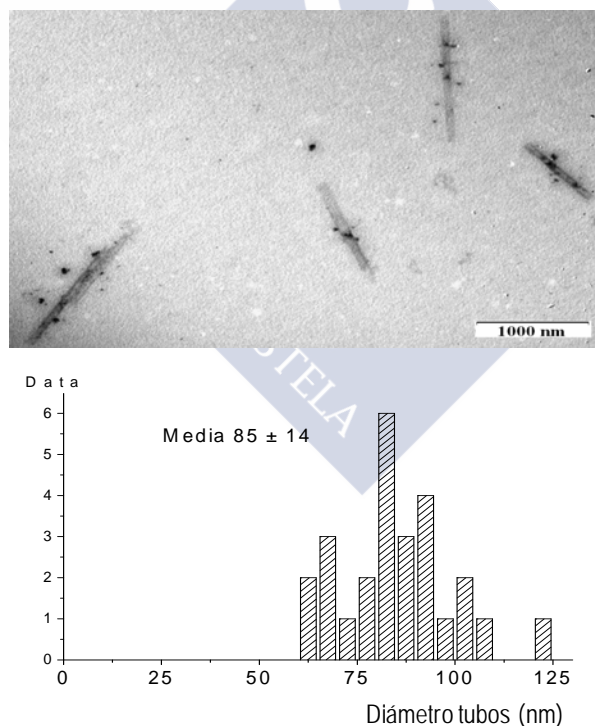


Figura 4.21. Imagen TEM de tubos moleculares formados de una disolución 5×10^{-3} M de C^{24},amC_2 -aminisoftálico con $CoCl_2$ y representación de la dispersión del diámetro de los tubos.

Como muestra la figura, la adición de este ion origina la aparición de estructuras tubulares, hecho repetidamente encontrado para diversos derivados de ácidos biliares. Sin embargo, permanece una población de agregados esféricos dispersos. La sección de los tubos observados varía en el intervalo 60-125 nm con una media de 85 ± 14 nm. En las imágenes de la Figura 4.22 puede verse una magnificación de los tubos. La disolución se

mantuvo en reposo durante un largo periodo de tiempo y se analizó, mediante IPC, el contenido en cobalto que permanece en suspensión obteniendo un valor de $[\text{Co}^{2+}] = 0,068 \pm 0,006 \text{ mg/L}$ a $\text{pH}=9.90$.

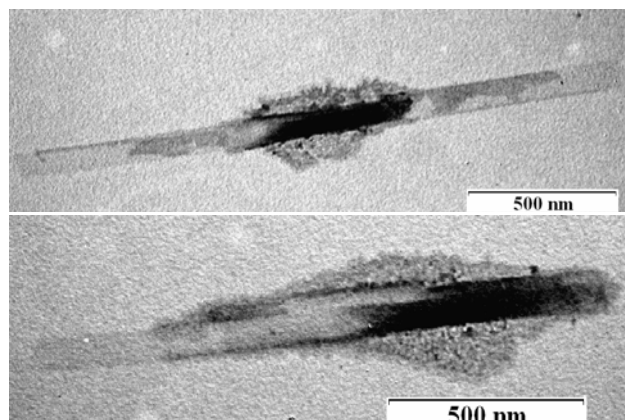


Figura 4.22. Imágenes TEM de los tubos obtenidos de $\text{C}^{24}, \text{amC}_2$ -aminoisoftálico con CoCl_2 .

Al mezclar a saturación FeCl_3 con la disolución $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ del trímero $\text{C}^{24}, \text{amC}_2$ -aminoisoftálico, en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M , y posterior filtración del exceso de sal metálica, la situación cambia drásticamente. Aparecen abundantes estructuras cristalinas (Figura 4.23) con geometría fractal (frecuentes cuando se utilizan sales inorgánicas). El FeCl_3 es muy soluble en agua formándose un complejo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ de color amarillo claro. De las disoluciones acuosas cristaliza el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de color amarillo marrón. Se emplea en el tratamiento de aguas residuales y la producción de agua potable por sus propiedades como floculante.

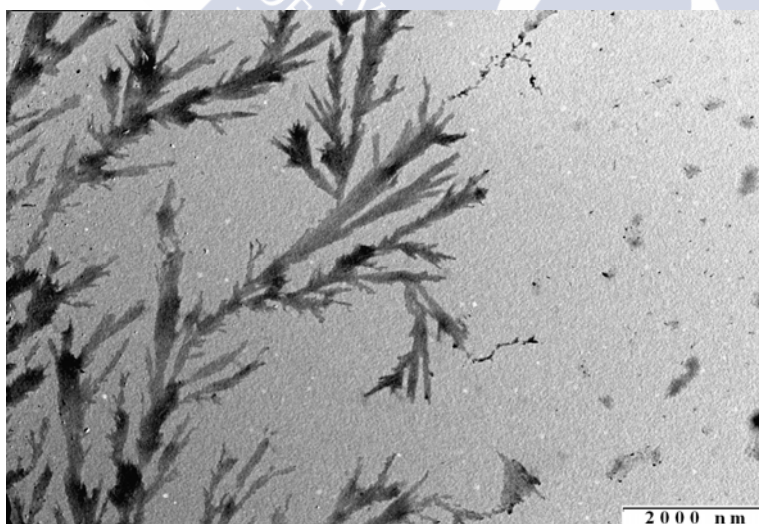


Figura 4.23. Imágenes de cristales obtenidos de una disolución $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ de $\text{C}^{24}, \text{amC}_2$ -aminoisoftálico con FeCl_3 .

En mucha menor cantidad, se observan algunos tubos moleculares (Figura 4.24) de menor longitud (no superan los 350 nm) que los anteriores, pero de igual diámetro ($78 \pm 16 \text{ nm}$).

Al añadir MgCl_2 a la disolución $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ del trímero $\text{C}^{24}, \text{amC}_2$ -aminoisoftálico con disolución tampón 0.050 M carbonato/bicarbonato, aparecen pequeñas estructuras cristalinas en forma agujas (Figura 4.25). La media de la sección de la estructura

cristalina es 25 ± 7 nm, ligeramente inferior a la encontrada cuando se trabaja en ausencia de metal pesado.

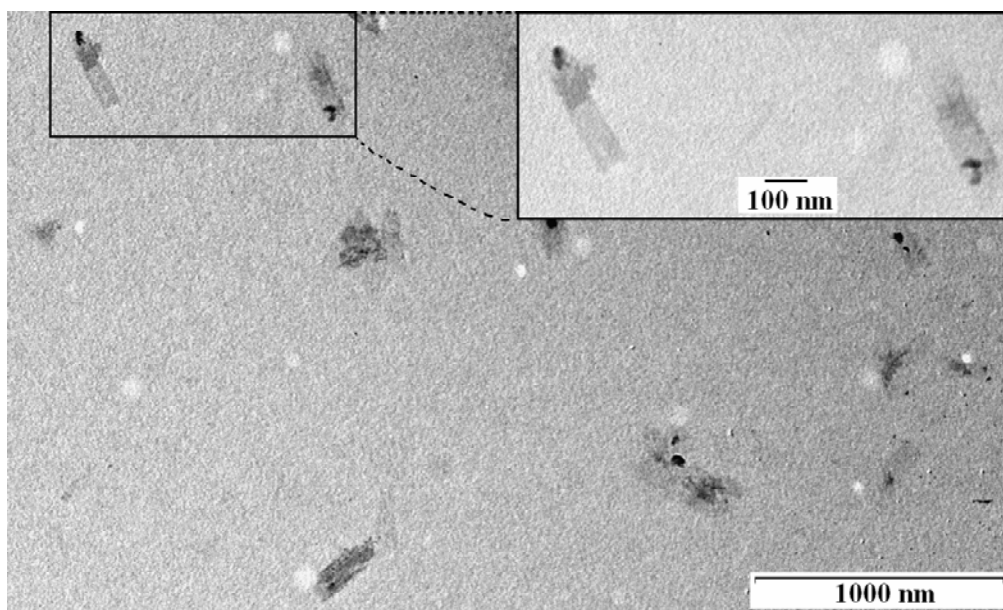


Figura 4.24. Imágenes TEM de tubos obtenidos de una disolución 5×10^{-3} M de C^{24} , *amC*₂-aminoisofáltico con $FeCl_3$.

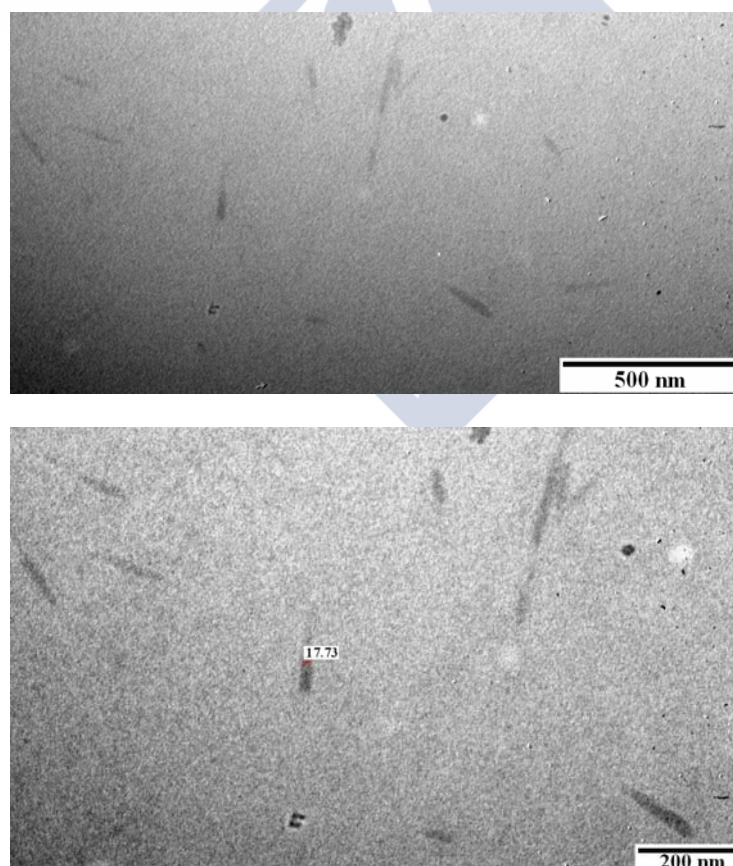


Figura 4.25. Imágenes TEM de una disolución 5×10^{-3} M de C^{24} , *amC*₂-aminoisofáltico con $MgCl_2$.

4.2 TRÍMERO amC^{24},amC_2 -AMINOISOFTÁLICO.

Se puede adelantar que el comportamiento del trímero amC^{24},amC_2 -aminoisoftálico es parecido al del hasta aquí estudiado, siendo más soluble y con mayor tendencia a la formación de geles.

Tensión superficial.

La Figura 4.26 recoge los resultados obtenidos de las medidas de tensión superficial para una disolución de concentración inicial 4.25×10^{-3} M que se va diluyendo progresivamente. La disolución de trabajo se preparó en NaOH 0.01 M para así asegurar la completa ionización del soluto. Al representar la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración, se puede observar que la tensión no baja de 56 mN/m. Aunque podría estimarse un valor de 1.5×10^{-3} M para la *cac*, debe tenerse en cuenta que a estas concentraciones se observa la formación de geles que podrían modificar el valor de la tensión superficial, introduciendo incertidumbres sobre el verdadero significado de las medidas. Además debe tenerse presente que la tensión superficial no se reduce hasta límites habituales para surfactantes.

A partir de la pendiente recogida en la figura, se determinó el valor del área superficial por molécula (Tabla 4.2), muy similar al obtenido para el trímero C^{24},amC_2 -aminoisoftálico (Tabla 4.1). Dado que la diferencia entre ambos trímeros se reduce al cambio de un grupo hidroxilo por otro amino en la posición 3 del resto de ácido cólico unido por la posición 24, se puede aceptar el valor ya utilizado de 360 \AA^2 para la sección molecular (Figura 4.3). Ante estas similitudes, las conclusiones alcanzadas referentes a la composición de la interfase vistas en el apartado anterior son válidas para el presente trímero.

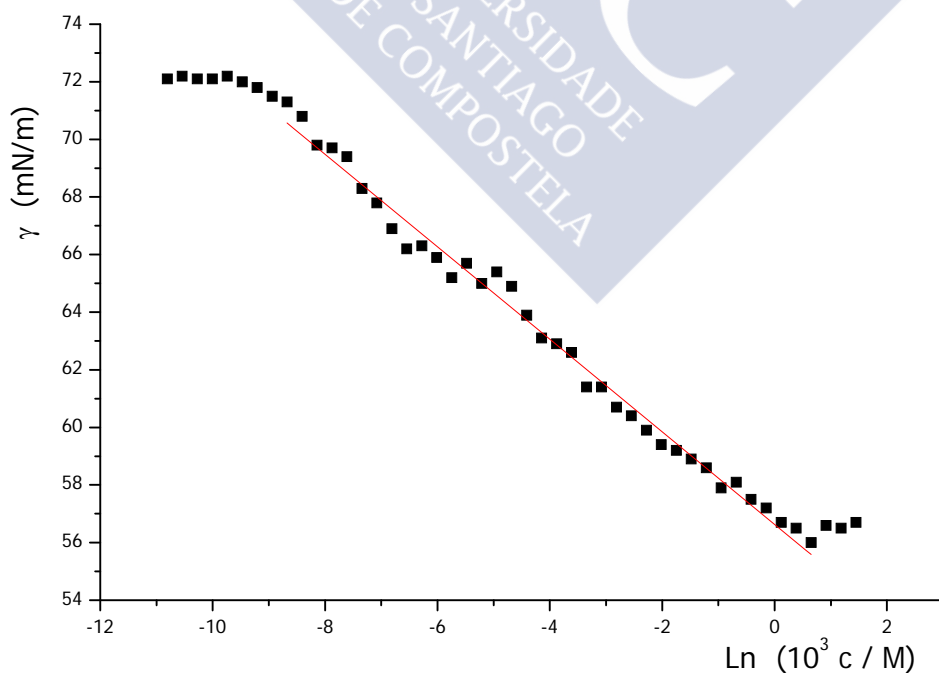


Figura 4.26. Tensión superficial vs logaritmo neperiano de la concentración de la sal del amC^{24},amC_2 -aminoisoftálico en NaOH 0.01 M y temperatura 25 °C.

Tabla 4.2.
Propiedades superficiales del amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico determinadas a 25°C por balanza de tensión superficial.

amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico	$10^7 \times \Gamma$ (mol m ⁻²)	a_o (Å ²)
[NaOH]= 0.01 M	6.58	252

Dispersión de luz láser.

Con el mismo protocolo de preparación de muestra, se determinó el diámetro de los agregados mediante dispersión de luz de la sal del amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico 5×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M. Las medidas se realizaron a 90° pasados 30 minutos desde la preparación de la muestra. Los resultados se muestran en la *Figura 4.27* y fueron analizados con el modelo NNLS. En las condiciones experimentales indicadas, el amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico presenta una polidispersidad elevada. En la representación de la intensidad frente al diámetro (*Figura 4.28*) se observan dos poblaciones: una de ellas, con tamaños comprendidos entre 45 y 392 nm, que adquiere el mayor peso, mientras que la otra, de 0.87 a 5.23 nm, aparece de forma tenue. Como en casos anteriores, dado que la intensidad de la dispersión depende fuertemente del tamaño de la partícula, en realidad, las partículas más grandes constituyen la población más pequeña y las partículas pequeñas la más abundante.

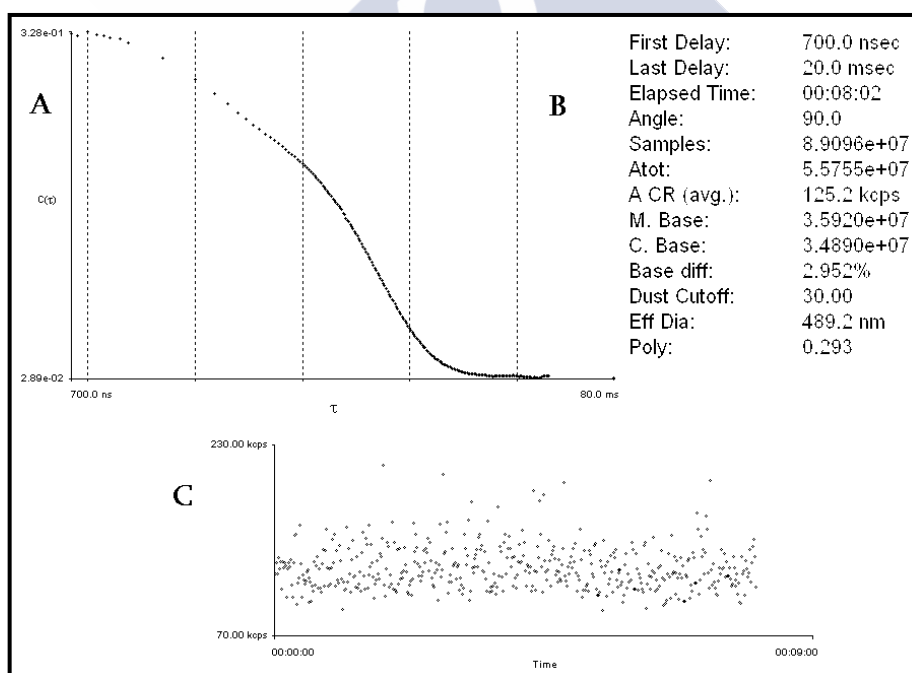


Figura 4.27. (A) Ejemplo de una función de autocorrelación. (B) Parámetros y resultados. (C) Intensidad de la luz dispersada en kilo-cuentas ($[amC^{24}$, amC_2 -aminoisoftálico] = 5×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M, a los 30 min de preparada la muestra).

Aunque la sal del amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico tiene una gran tendencia a agregarse, la muestra anterior no precipitó incluso después de una semana. Sin embargo, se observó que la variación de la intensidad de la luz dispersada era poco estable lo que se traducía en valores del diámetro efectivo elevados y alta polidispersidad (*Figura 4.29*).

Análisis de la forma y el tamaño mediante TEM.

Las imágenes TEM evidencian la formación de partículas pequeñas, de tamaño micelar, agregados esféricos de tamaño intermedio y grandes agregados amorfos, aunque no aparecen estructuras cristalinas (Figura 4.30).

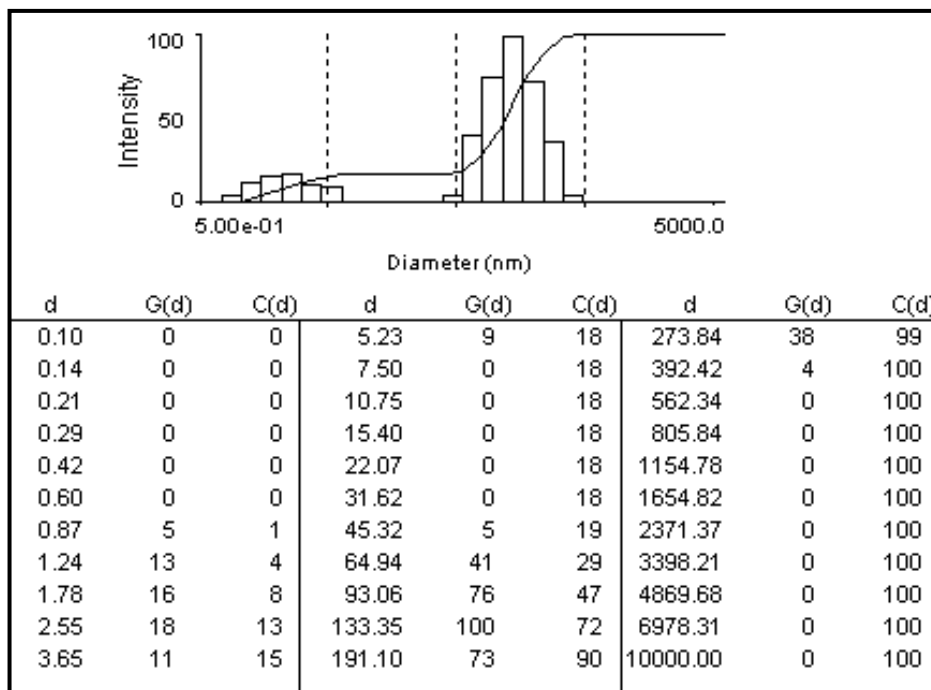


Figura 4.28. Representación intensidad-diámetro obtenida mediante NNLS de los resultados de dispersión de luz en las condiciones experimentales de la Figura 4.28.

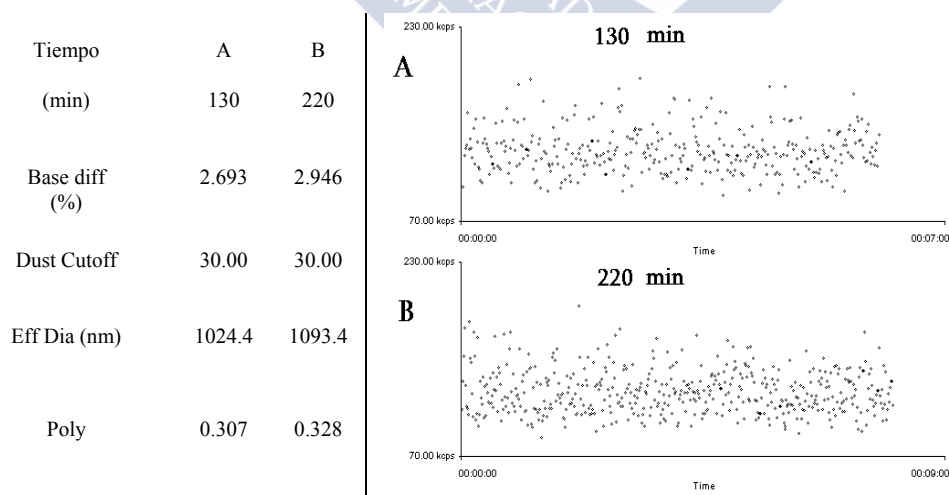


Figura 4.29. Resultados de las medidas de dispersión de luz del amC^{24} , amC_2 -aminoisofáltico $5 \times 10^{-3} M$ en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M a (A) 130 y (B) 220 minutos desde su preparación.

Las partículas más pequeñas aparecen en las imágenes de microscopía menos definidas, con una mayor polidispersidad de tamaños y más aglutinadas que en el caso

del C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico (Figura 4.31). El tamaño medio (6.8 ± 2.3 nm) es ligeramente superior al observado para el C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico (4 ± 1 nm).

Al aumentar la fuerza iónica del medio, mediante la adición de NaCl, aparecen estructuras cristalinas y disminuye la presencia de grandes agregados. Los cristales no tienen calidad suficiente para poder obtener los parámetros estructurales. Al analizar el tamaño de los agregados se obtuvo un valor medio de 19 ± 6 nm (Figura 4.32).

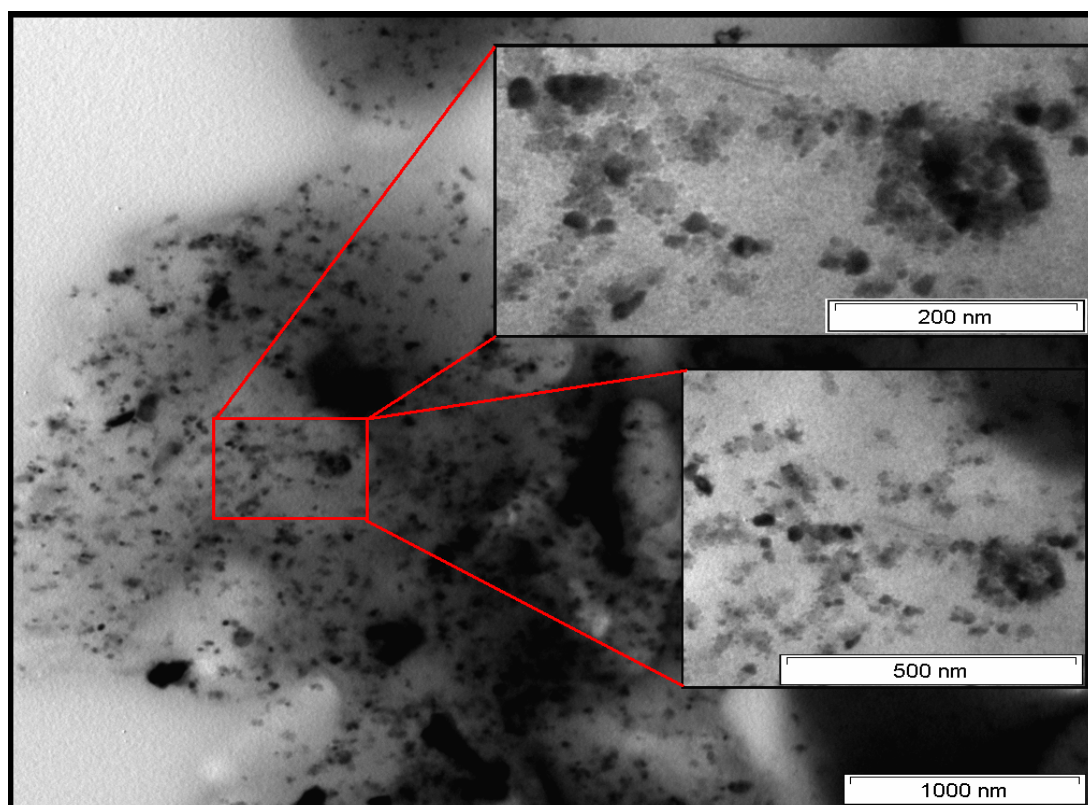


Figura 4.30. Visión general de los agregados formados (imagen TEM) por el amC^{24}, amC_2 -aminoisoftálico 4.25×10^{-3} M en NaOH 0.01 M transcurridas 24 horas desde su preparación.

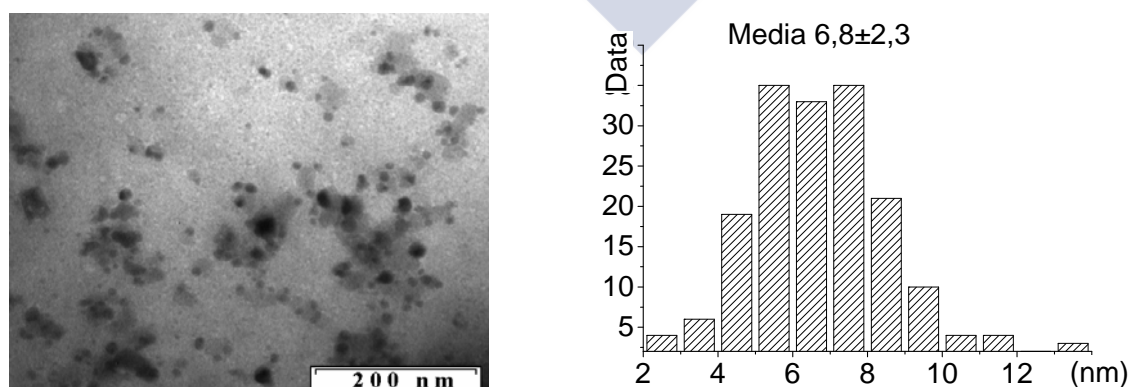


Figura 4.31. Imagen TEM e histograma del tamaño de las partículas micelares del amC^{24}, amC_2 -aminoisoftálico 4.25×10^{-3} M en NaOH 0.01 M tras 24 horas.

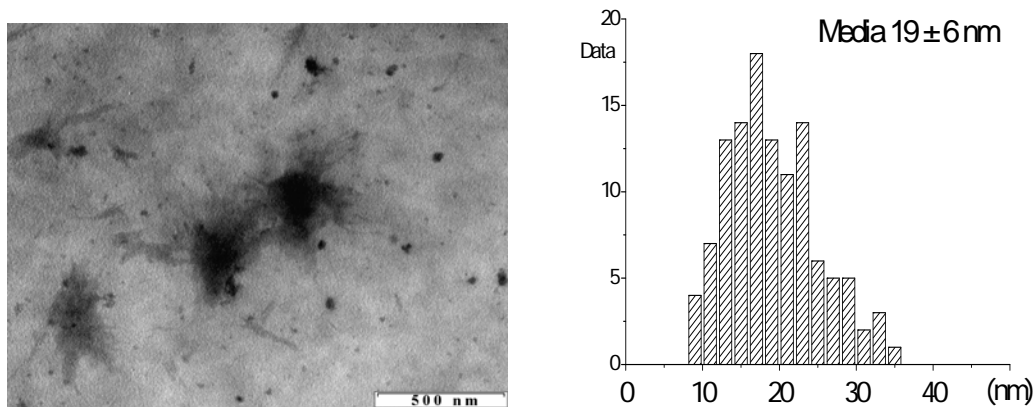


Figura 4.32. Imagen TEM e histograma de la distribución del tamaño de los agregados formados por la sal del amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico 4.16×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M, después de tres días.

Aunque surgen algunas dificultades por la baja solubilidad del compuesto, a medida que se aumenta la concentración, el amC^{24} amC_2 -aminoisoftálico gelifica con mayor consistencia. Una disolución 0.02 M, que aun conserva fluidez, al ser observada bajo luz polarizada muestra birrefringencia. Al analizar esta muestra mediante microscopía TEM (Figura 4.33) se observan fibras altamente entrecruzadas con una sección de 14.5 ± 2.9 nm.

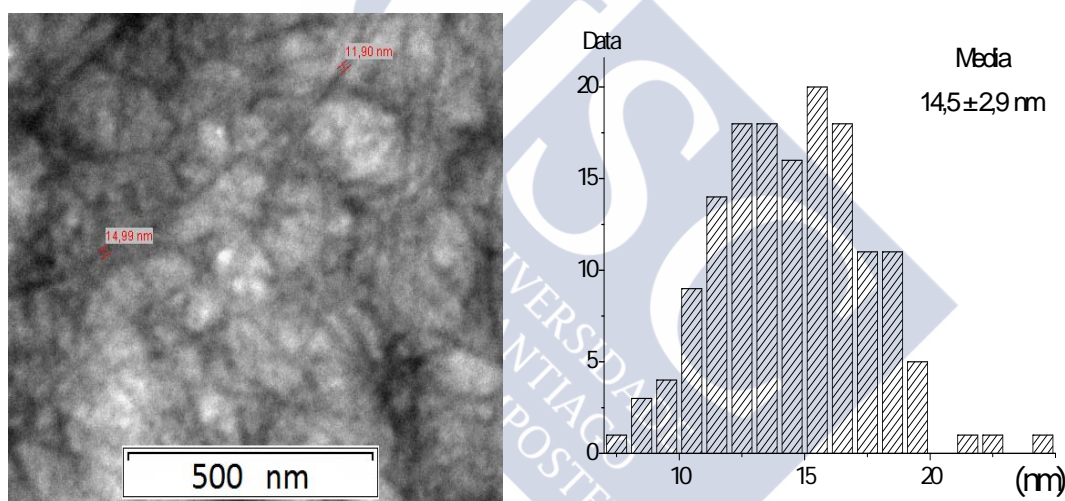


Figura 4.33. Fibras entrecruzadas observadas mediante TEM e histograma de distribución de sus secciones. $[amC^{24}, amC_2\text{-aminoisoftálico}] = 0.020$ M, tras una hora de la preparación de la disolución.

4.3 TETRÁMERO (amC_2 , AMINOISOFTÁLICO) $_2$ -TEREFTÁLICO.

Tensión superficial.

En comparación con el trímero anterior, el (amC_2 -aminoisoftálico) $_2$ -tereftálico presenta mayores capacidades para formar geles y estabilidad frente a la precipitación. El primer hecho limita la concentración inicial de partida para el estudio de su comportamiento como surfactante mediante la técnica de tensión superficial. Las experiencias se realizaron en NaOH 0.01 M, que asegura una completa ionización del tetra-ácido. La Figura 4.34 muestra los resultados obtenidos a 25 °C. Aunque se alcanzó la concentración de 7.4×10^{-3} M, no llegó a observarse una *cac*, siendo la tensión superficial mínima 63.3 mN/m.

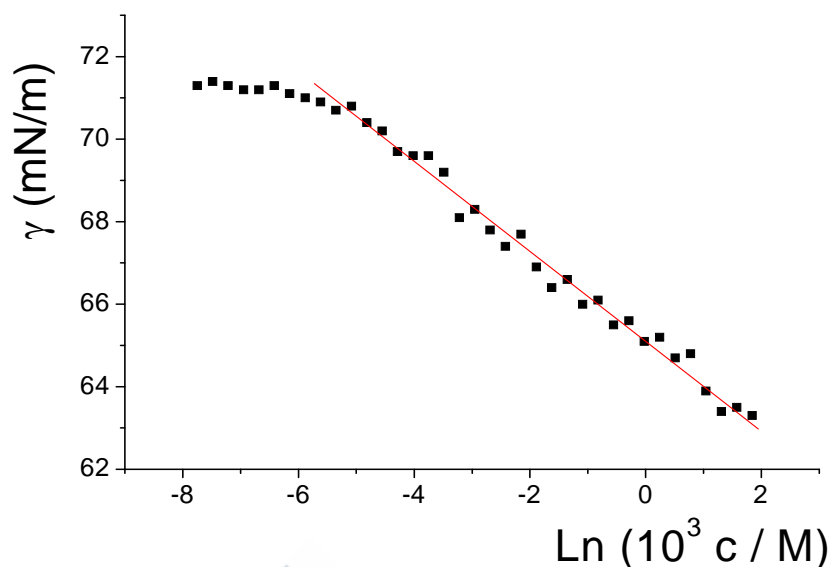


Figura 4.34. Tensión superficial vs logaritmo neperiano de la concentración de la sal del (*amC*₂-aminoisoftálico)₂-tereftálico en NaOH 0.01 M a 25 °C.

Del modo habitual, se ha calculado un valor del área por molécula de 377 Å² (Tabla 4.3). En comparación con los trímeros, este valor es superior en aproximadamente 100 Å², valor que corresponde a la sección molecular de un residuo de ácido biliar. Para una disposición plana de la molécula (Figura 4.35), se había estimado un valor de en la sección 563 Å² (Tabla 2.32, Sección 2.5), superior en 186 Å² al valor de a_0 . Esta diferencia sugiere que los esteroides en la estructura no se encuentran totalmente planos en relación con la superficie, sin que se pueda realizar una propuesta más concreta.

Tabla 4.3

Propiedades superficiales del (*amC*₂-aminoisoftálico)₂-tereftálico en NaOH 0.01 M a 25°C.

$10^7 \Gamma$ (mol×m ⁻²)	a_0 (Å ²)
4,4	377

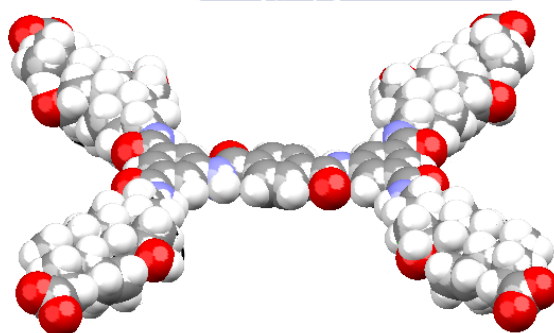


Figura 4.35. Representación en 3D del (*amC*₂-aminoisoftálico)₂-tereftálico.

Dispersión de luz láser.

Mediante dispersión de luz láser se determinó el diámetro de los agregados formados en una disolución acuosa 5.1×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, que se preparó según los procedimientos descritos con anterioridad. Transcurridas 3 horas desde la preparación de la disolución, la estabilidad en la variación de kilocuentas permitió la recogida de datos. El diámetro eficaz obtenido a partir de los resultados

experimentales es de 35.6 nm y la polidispersidad de 0.08. Estos valores, referidos a todas las partículas presentes en la disolución, están por debajo de los obtenidos para los compuestos anteriores en los que una rápida velocidad de agregación iba acompañada de un diámetro eficaz muy superior y una polidispersidad más elevada.

La aplicación del análisis NNLS se muestra en la *Figura 4.36*. En la representación intensidad vs diámetro aparecen dos poblaciones de tamaños comprendidos en los intervalos 13-40 nm y 78-157 nm y una tercera, con mucho menor peso a 3.61 nm. Sin embargo, en la representación número vs diámetro, esta última población es la única presente. Una vez más, tales resultados indican que las partículas grandes son escasas mientras que las más pequeñas son las más abundantes.

Se desea destacar que las disoluciones de este tetrámero tienen una gran estabilidad en el tiempo ya que el soluto puede permanecer sin precipitar durante meses. Se ha comprobado que durante los primeros días la estabilidad de la intensidad de luz dispersada mejora con el tiempo (*Figura 4.37*).

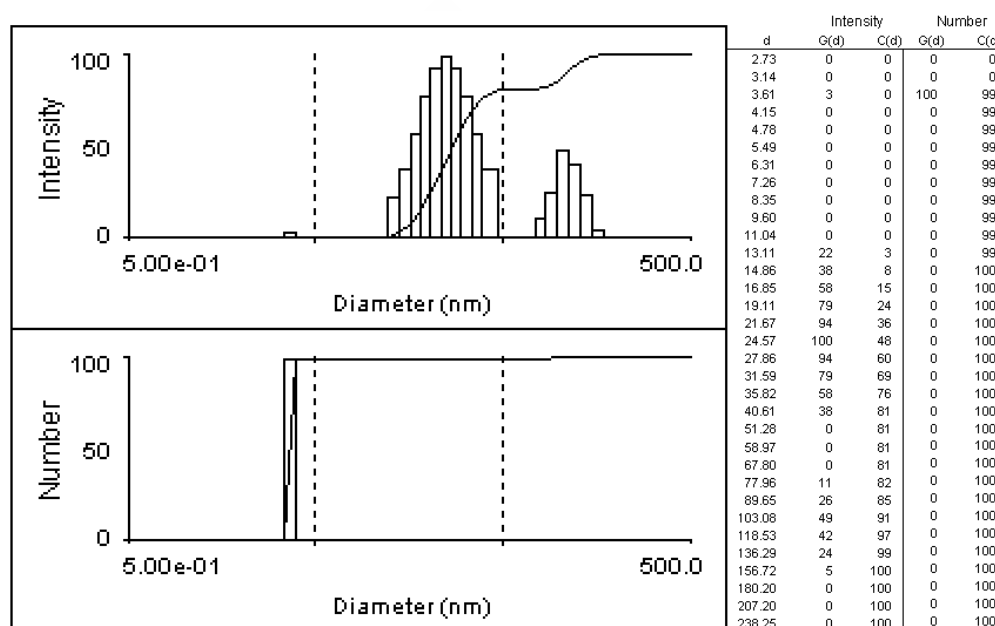


Figura 4.36. Representaciones de los datos obtenidos mediante NNLS. [(*amC*₂-aminoisofáltico)₂-tereftálico]= 5.13×10⁻³ M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, a 25 °C, transcurridas 3 horas desde la preparación de la disolución.

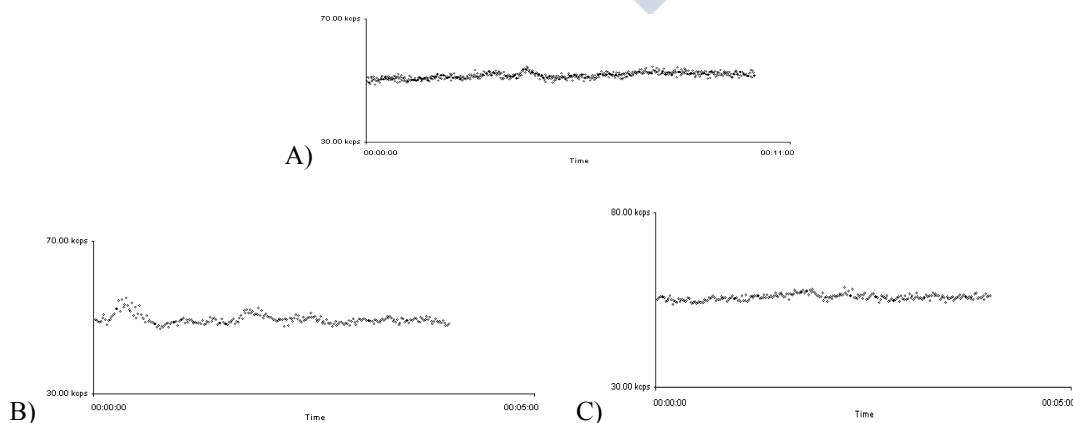


Figura 4.37. Representación de la variación de intensidad de luz dispersada por una disolución de la sal de (*amC*₂-aminoisofáltico)₂-tereftálico en las condiciones de la *Figura 4.30* a las 26 horas (A), 48 horas (B) y 5 días (C).

A diferencia del tratamiento NLS, el análisis CONTIN intenta minimizar el número de las poblaciones presentes. Así, por ejemplo, dos poblaciones próximas en NLS pueden aparecer como una sola en CONTIN. La *Figura 4.38* muestra los resultados de este análisis realizado sobre la misma disolución transcurridas 24 y 48 horas desde su preparación. Las representaciones sugieren la existencia de una única población cuyo tamaño no varía con el tiempo. En las representaciones número vs diámetro los tamaños medios se encuentran en torno a 10 nm.

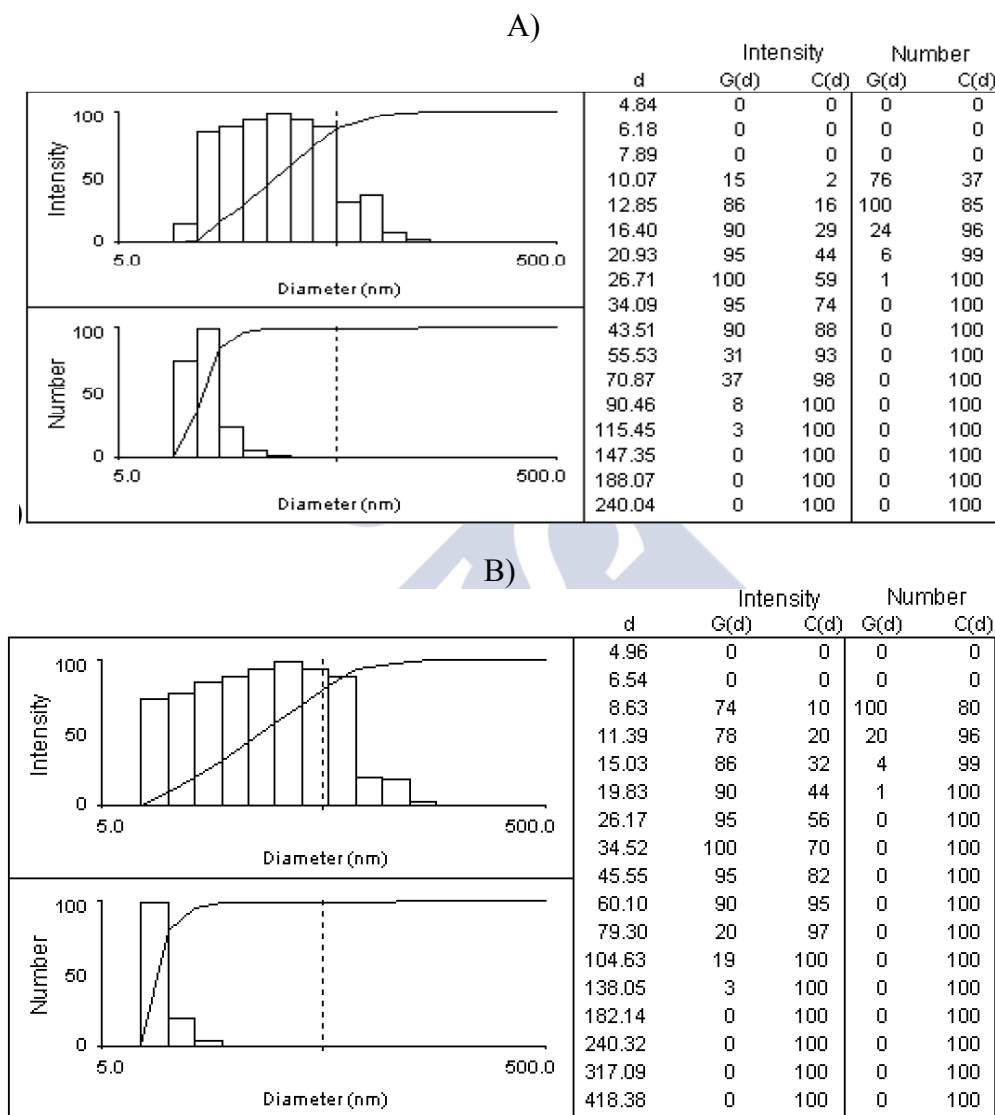


Figura 4.38. Representaciones de los datos obtenidos mediante CONTIN. [(*amC*₂-aminoisoftálico)₂-tereftálico] = 5.13×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, a 25 °C, transcurridas 24 horas (A) y 48 horas (B) desde la preparación de la disolución.

Análisis de la forma y el tamaño mediante TEM.

Las muestras utilizadas para la obtención de imágenes mediante TEM para el (*amC*₂-aminoisoftálico)₂-tereftálico fueron preparadas con el mismo protocolo explicado anteriormente. Las imágenes se obtuvieron a diferentes tiempos tras la preparación de la disolución y se midió el tamaño de las partículas presentes.

Tras una hora de la preparación de la disolución, se observan partículas esféricas de tamaño micelar, agregados mayores (que al ampliar las imágenes parecen estar formados

por los agregados menores) y no hay presencia de cristales (*Figura 4.39*). Al realizar el recuento de las partículas de cada tipo se obtienen los histogramas mostrados en la misma figura. El tamaño de las partículas pequeñas (diámetro = 2.6 ± 0.8 nm) sugiere que puede tratarse de micelas. El tamaño de los agregados mayores apenas supera los 60 nm, la población más abundante ronda los 15 nm, y el valor medio es de 20 ± 13 nm. Ya se han descrito observaciones similares en otros compuestos de la presente tesis. Estos resultados son congruentes con los obtenidos mediante la dispersión de luz.

Las partículas mayores se observan también tras 57 días de reposo, para una disolución 4.3×10^{-3} M en presencia de una disolución reguladora de carbonato/bicarbonato 0.015 M. La *Figura 4.40* muestra dos imágenes obtenidas. Como se puede observar, persiste una gran concentración de partículas en suspensión con una media de 19 ± 12 nm (*Figura 4.41A*), mientras que los agregados más grandes apenas superan los 50 nm. En alguna imagen aparecen algunos precipitados coloidales más grandes, superando los 500 nm, pero lo hacen de forma esporádica. Estos resultados están corroborados por el estudio de la dispersión de luz, ya que la muestra anterior exhibe una sola población entre 5 y 35 nm (*Figura 4.41B*), analizados los datos mediante el método CONTIN. Si se tiene en cuenta que las partículas más pequeñas de la población ganan peso al representar número frente a diámetro, se reafirma el hecho de que los agregados del sistema son pequeños.

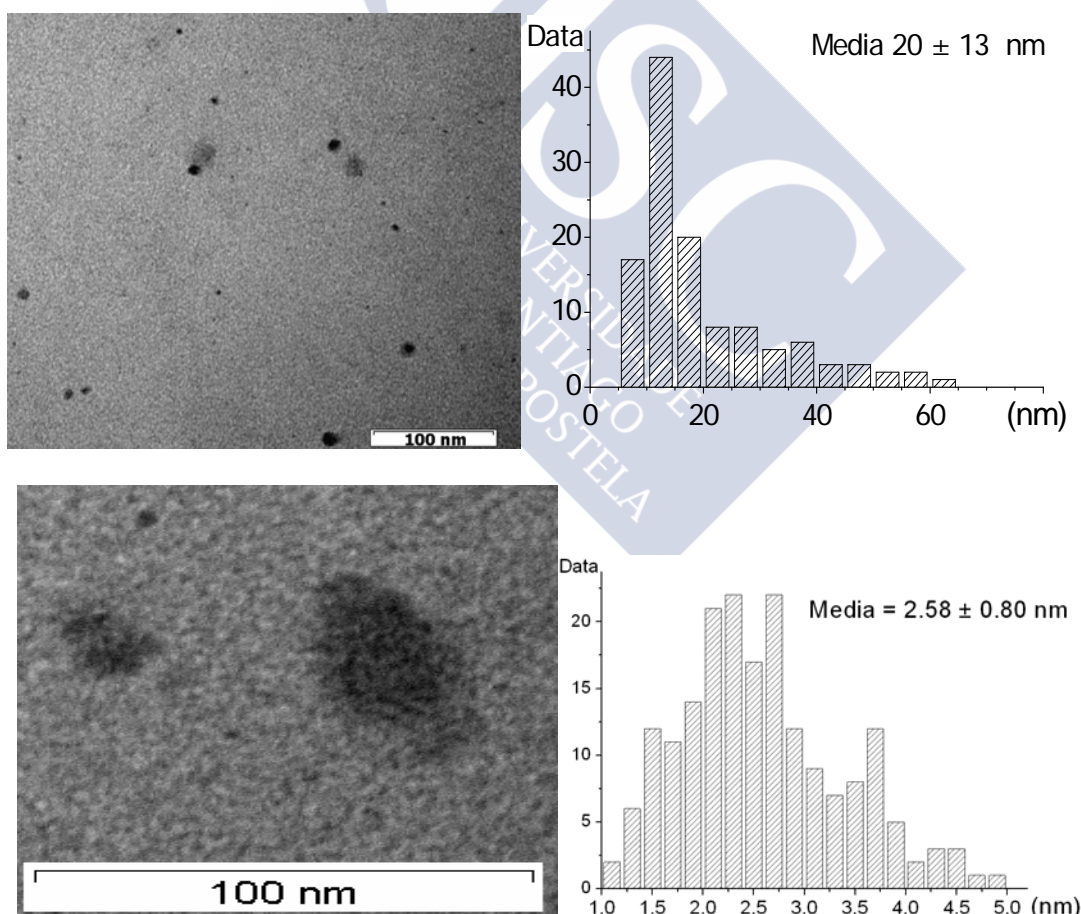


Figura 4.39. Imágenes TEM del $(amC_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$ 5.13×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M al cabo de 1 hora desde la preparación de la disolución. Histogramas de la distribución del diámetro de las partículas.

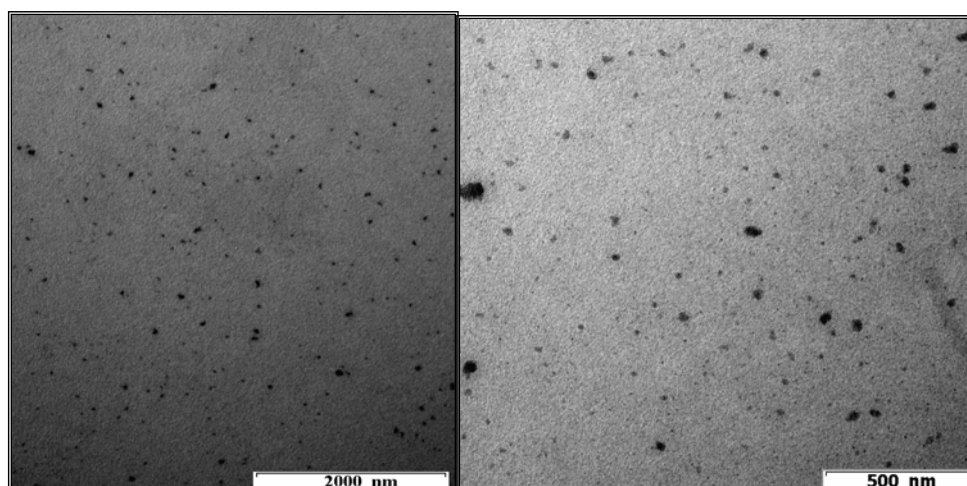


Figura 4.40. Microfotografías TEM de los agregados de $(amC_2\text{-aminoisofthalico})_2\text{-tereftalico}$ transcurridos 57 días de la preparación de una disolución 4.3×10^{-3} M en disolución reguladora de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.015 M.

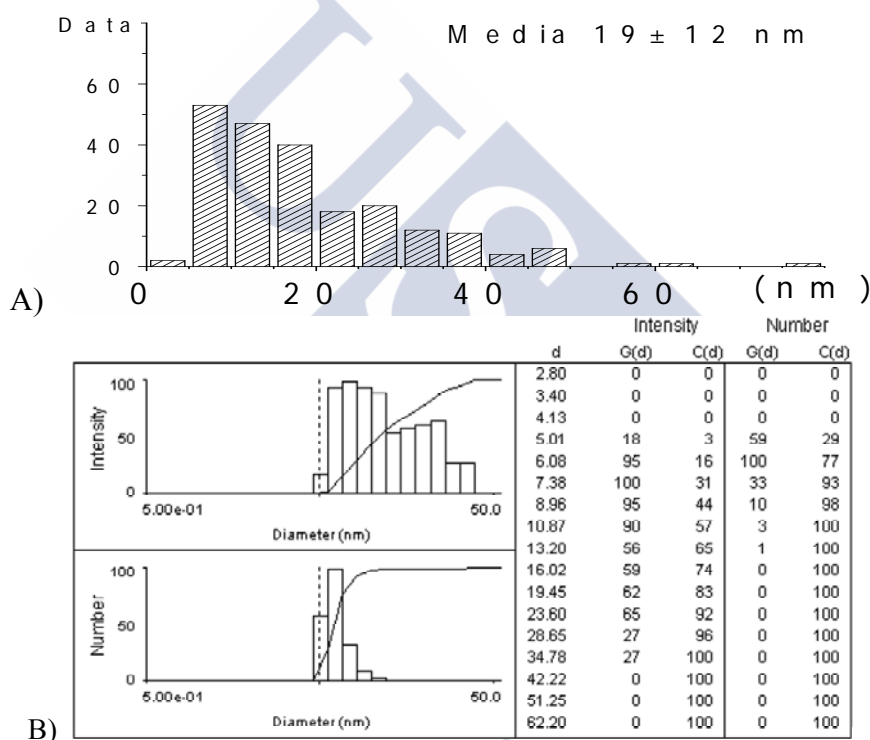


Figura 4.41. (A) Histograma de tamaños obtenido a partir de imágenes TEM de una disolución 4.3×10^{-3} M con tampón de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.015 M. (B) Dispersión de tamaños de los agregados presentes en la disolución anterior determinados mediante el método CONTIN de la dispersión de luz.

Sin embargo, para la disolución 5.13×10^{-3} M en NaOH 0.01 M y NaCl 0.09 M, en las imágenes TEM, tomadas, tras 48 horas de reposo de la disolución a temperatura ambiente, aparecen agregados de estructura amorfa con un tamaño medio de 53 ± 27 nm (Figura 4.42) aunque una población de partículas, alrededor de 20 nm, mantiene la moda del análisis estadístico. Las micelas se mantienen sin agregarse en suspensión.

Este último tamaño es compatible con el determinado a partir de imágenes TEM (Figura 4.43) para una disolución 4.2×10^{-3} M en carbonato/bicarbonato 0.1 M y tras 56 días de reposo, ya que se ha determinado un tamaño medio de 69 ± 22 nm (véase el histograma de la Figura 4.44A). Cabe destacar la presencia de fibras muy delgadas en

diferentes zonas de las imágenes. Su tamaño es reducido y su imagen carece de fuerte contraste.

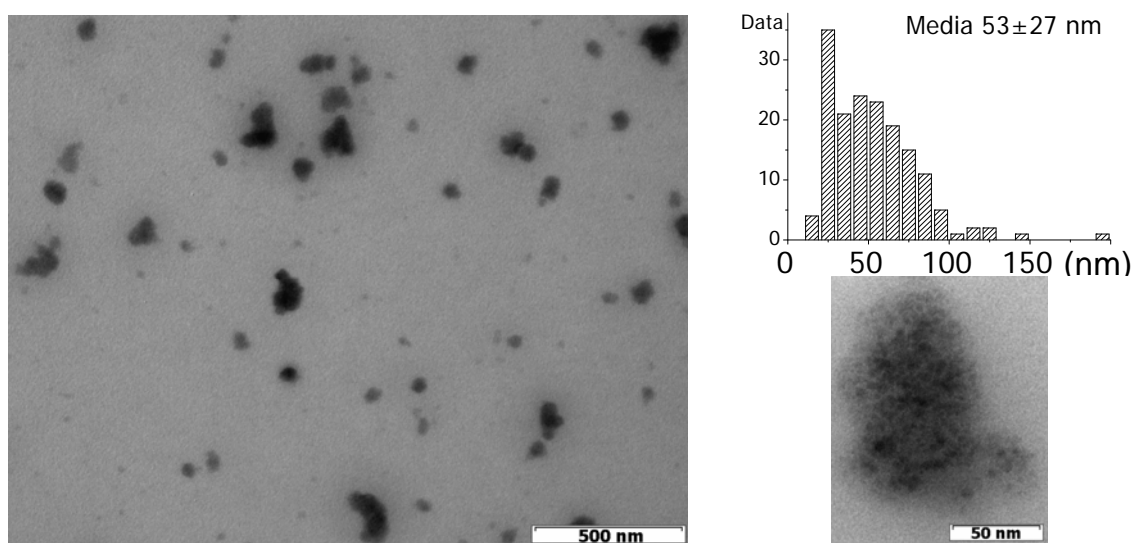


Figura 4.42. Microfotografías TEM del $(amC_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$ tras 48 horas (5.13×10^{-3} M, $[\text{NaOH}] = 0.01$ M y $[\text{NaCl}] = 0.09$ M).

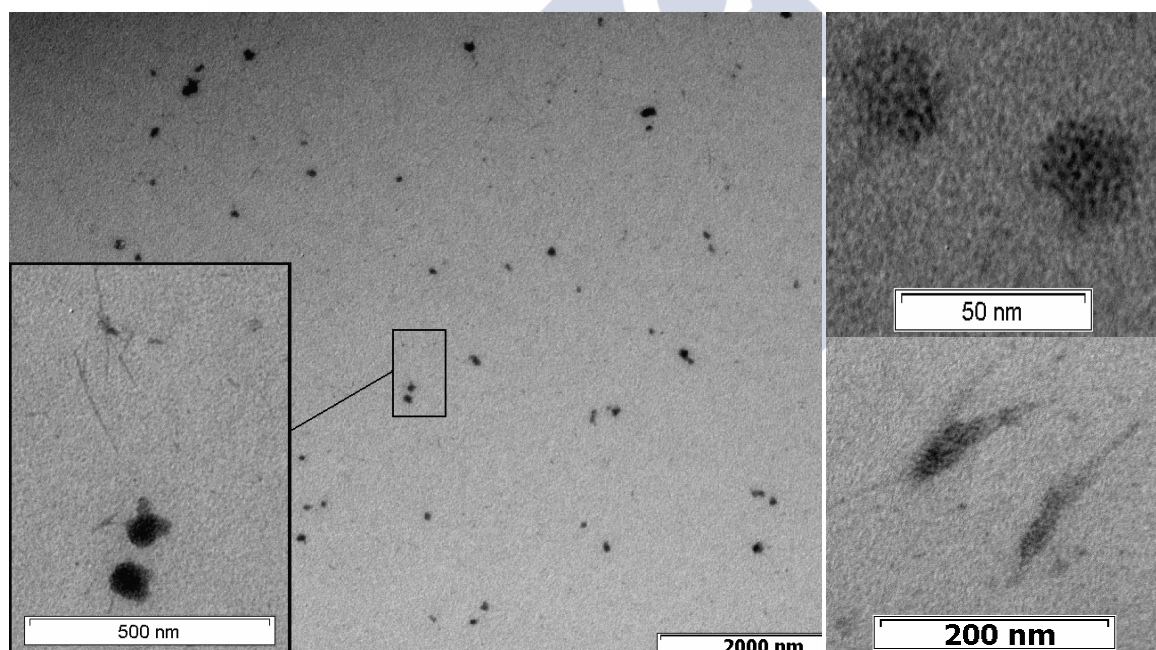


Figura 4.43. Imágenes TEM de los agregados originados por el $(amC_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$ transcurridos 56 días de la preparación de una disolución 4.2×10^{-3} M en presencia de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.1M.

Los resultados anteriores son compatibles con los obtenidos mediante análisis de la dispersión de luz, dado que se ha obtenido un diámetro eficaz de 55.8 nm, siendo la polidispersidad igual a 0.26. El modelo CONTIN, en intensidad, muestra una población entre 23 y 173 nm, si bien, en número la población de mayor peso sigue siendo la de micelas de 3 nm de tamaño (Figura 4.44B).

En definitiva, en comparación con los compuestos anteriores, la estabilidad de las disoluciones del tetrámero (*amC*₂-aminoisofáltico)₂-tereftálico resultó ser mayor ya que puede superar semanas sin que aparezca ningún precipitado coloidal.

Se intentó la recristalización del compuesto en medio acuoso para lo que se calentó agua (sin llegar a hervir) y se disolvió la máxima cantidad posible del tetrámero (0.012 M, aproximadamente). Dada la baja solubilidad del compuesto, se requirieron largos tiempos de agitación. Una vez disuelto y separado de la fuente de calor, el (*amC*₂-aminoisofáltico)₂-tereftálico gelifica al disminuir la temperatura. Este gel muestra consistencia, aspecto turbio y presenta birrefringencia bajo luz polarizada, fenómeno característico de los cristales líquidos. Al tomar una muestra y analizarla mediante microscopía confocal (*Figura 4.45 izquierda*) se observan rosetas de cristales en forma de fibras, y al hacerlo mediante microscopía TEM (*Figura 4.45 derecha*) se observan ondas típicas de cristales líquidos.

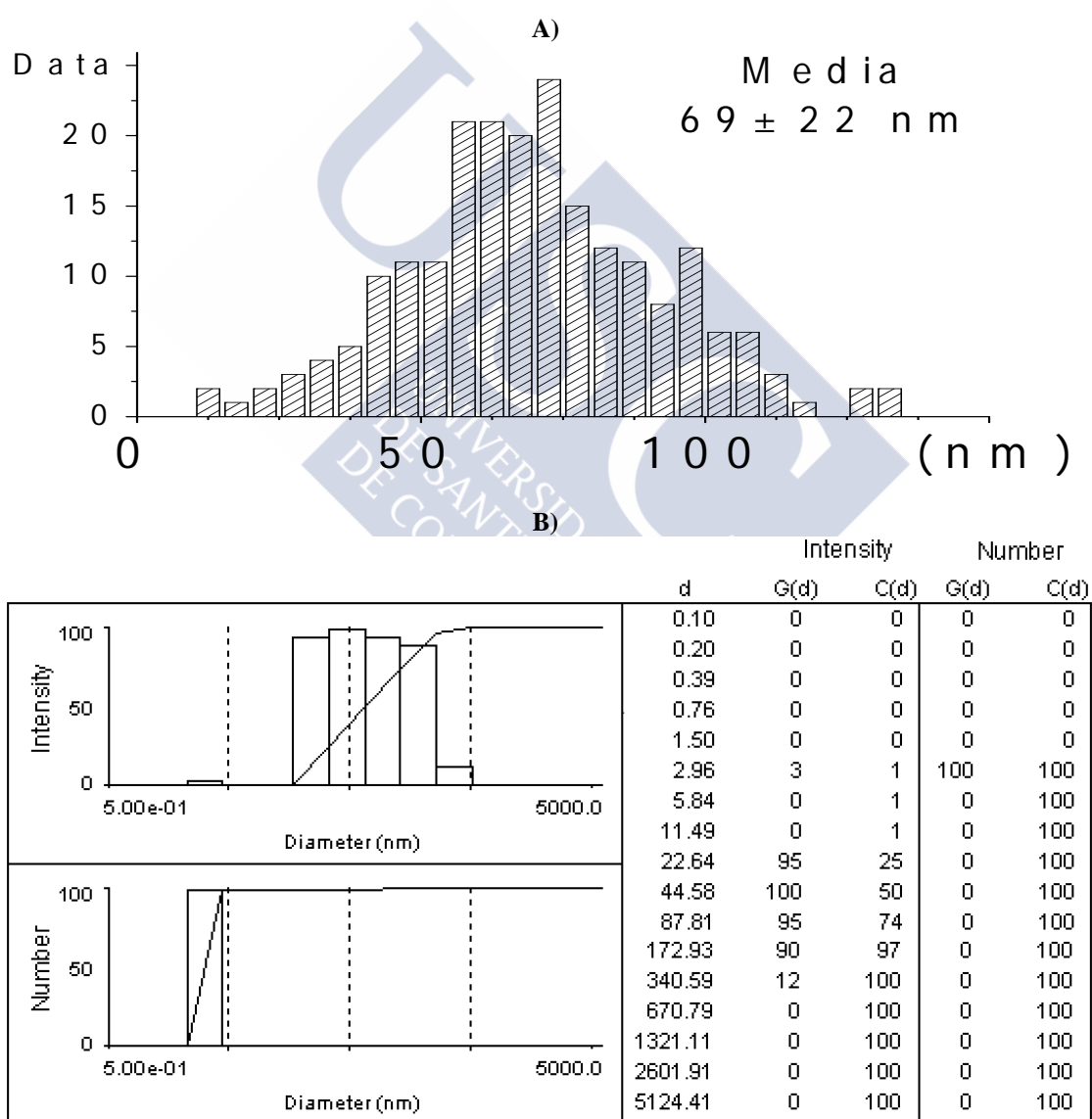


Figura 4.44. (A) Histograma del tamaño de los agregados observados por TEM y (B) resultados derivados de los experimentos de dispersión de luz (método CONTIN), transcurridos 56 días de la preparación de una disolución $4.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ con tampón de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0.1 M.

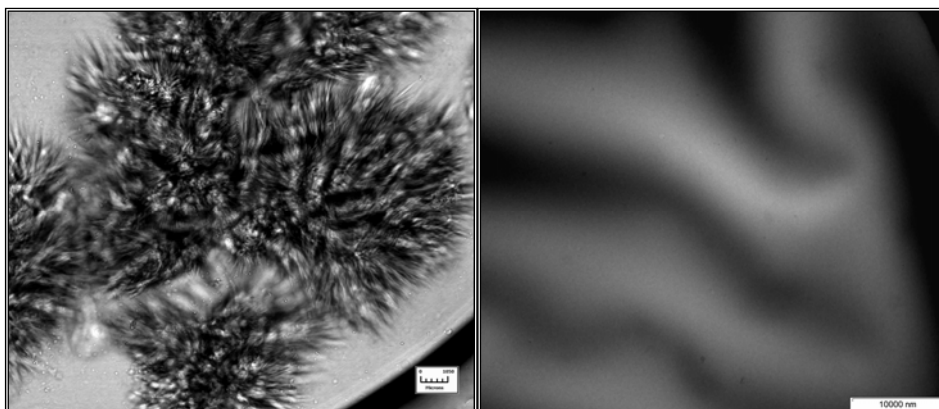


Figura 4.45. Microfotografías TEM (izquierda) y confocal (derecha) de los cristales líquidos del $(amC_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$.

4.4 TETRÁMERO $amC_4\text{-TPPORFIRINA}$.

Tensión superficial.

Gracias a los restos de sales biliares, el tetrámero es mucho más soluble que la tetrafenilporfirina. Se debe indicar que siempre se trabajó con disoluciones de concentración inferior a 0.01 M porque, a partir de este límite, adquieren comportamientos de gel y, además, se vuelven tan oscuras que no se puede detectar, visualmente o por espectrometría vis-UV, si el cromóforo se encuentra totalmente disuelto. Las disoluciones con las que se realizaron los experimentos de tensión superficial se prepararon en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M para asegurar la completa ionización del soluto y la estabilización de los agregados. La *Figura 4.46* muestra la representación de la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración, y no se detecta la *cac*.

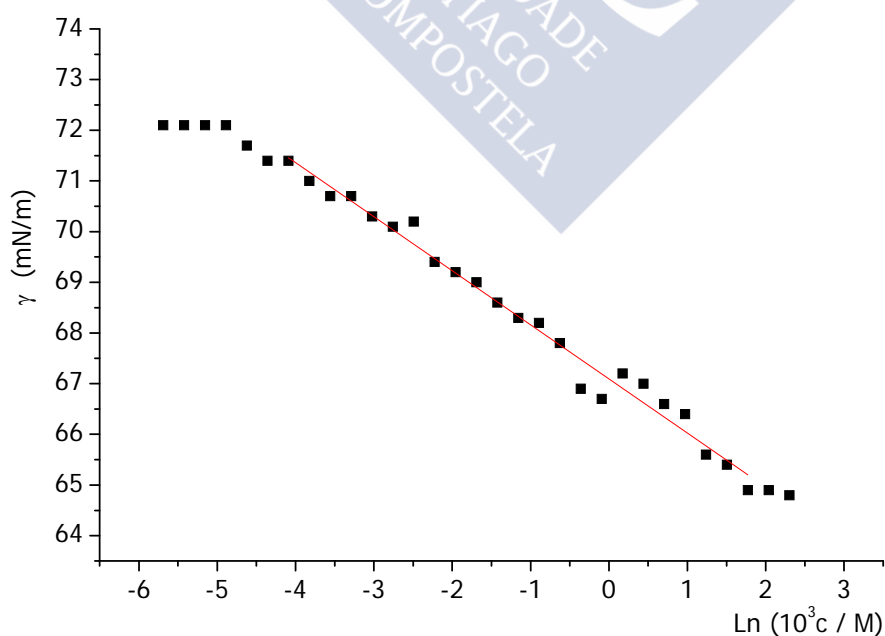


Figura 4.46. Tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración de la sal del $amC_4\text{-TPPorfirina}$ en NaOH 0.01 M y NaCl 0.04 M, y temperatura 25°C.

Siguiendo lo descrito en casos anteriores, se ha calculado el área superficial por molécula en la interfase aire/agua. Los resultados se muestran en la *Tabla 4.4* y se compararon con la estimación realizada en la *Sección 2.5* que conduce a un valor de 609 Å² para el área de la molécula proyectada sobre un plano (*Figura 4.47*). La diferencia entre estos valores (>200 Å²) sugiere que la molécula no adopta una disposición perfectamente plana en la superficie, aunque la carencia de información adicional no permite proyectar conclusiones más precisas.

Tabla 4.4
Propiedades superficiales determinadas a 25°C por balanza de tensión superficial.

<i>amC₄-TPP</i> porfirina	$\Gamma \times 10^7$ (mol m ⁻²)	a_0 (Å ²)
[NaOH]= 0.01 M.	4.15	400
[NaOH/NaCl]= 0.05 M.	4.30	385

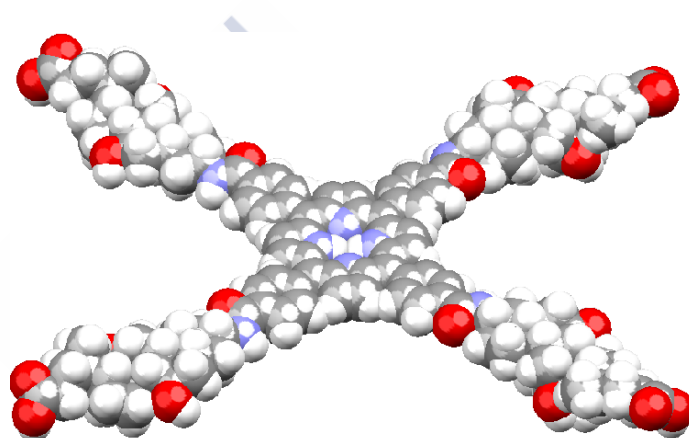


Figura 4.47. Representación en 3D del *amC₄-TPP* porfirina.

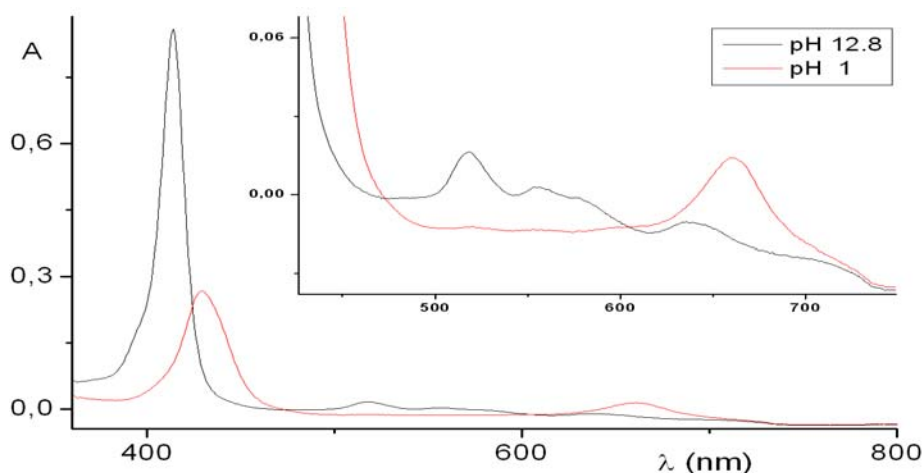
Dada la naturaleza cromófora de este tetramero y, en particular, su absorción en la región de la longitud de onda del láser (632.8 nm), no es posible el estudio de su comportamiento en disolución mediante dispersión de luz ya que dicha absorción interfiere con los fenómenos de dispersión de luz de las partículas en suspensión.

Absorción ultravioleta/Visible.

Para la obtención de los espectros de absorción se utilizaron cubetas de 1 cm y 1 mm de paso óptico para la tetrafenilporfirina y el tetramero *amC₄-TPP* porfirina, respectivamente.

En otros apartados ya se han comentado las generalidades de los espectros de absorción ultravioleta-visible de las porfirinas. Recuérdese que en el espectro se observan bandas-Q (originadas por la transición S₀→S₁) y una banda B intensa en la región azul del espectro visible, originada por la transición al segundo estado excitado (S₀→S₂).

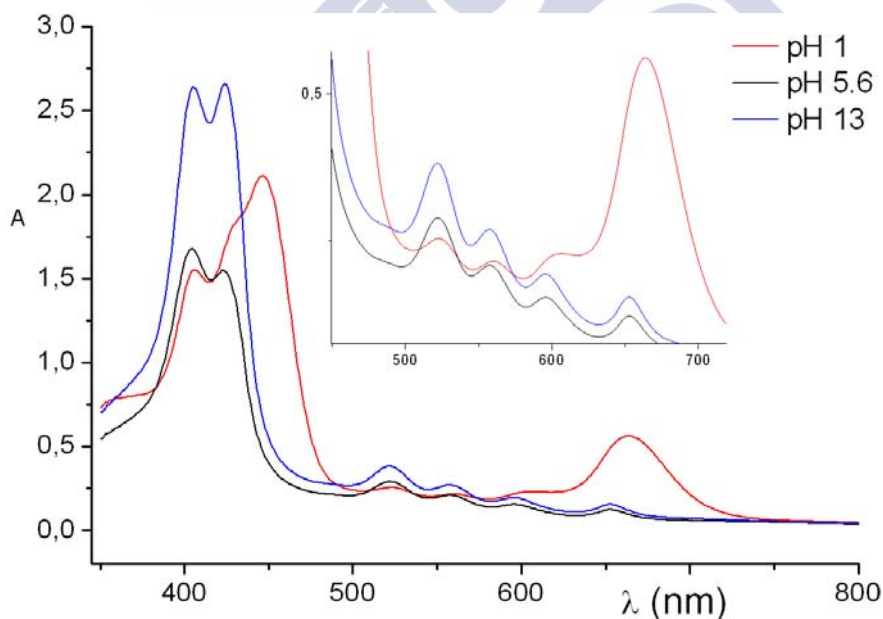
Se realizó un estudio a 25 °C de la variación del espectro de absorción de la tetrafenilporfirina (puente del tetramero) con el pH y se comparó con la del propio tetramero. En medio básico la banda B aparece a 414 nm en la tetrafenilporfirina (*Figura 4.48*) que en el caso del *amC₂-protoporfirina* aparecía desdoblada en dos bandas, 405 y 424 nm (*Figura 4.49*). Para la tetrafenilporfirina las bandas Q aparecen a 518, 556, 578 y 636 nm y las del tetramero lo hacen a 522, 557, 595 y 653 nm, es decir, sufren un desplazamiento batocrómico.



pH	B (nm)		Q (nm)			
12.8	414		518	556	578 ^h	636
1	429					661

Figura 4.48. Representación de los resultados de las medidas de absorción UV-VIS de la tetrafenil-porfirina a distintos pH valores del pH (h = hombro)

Cabe destacar que el *amC₄-TPPorfirina* no presenta la banda de absorción J (banda que implica la interacción axial π - π entre dos o más restos de porfirina, tanto en disolución como en estado sólido y que aparece aproximadamente a 480 nm) y la banda B aparece desdoblada en dos o tres componentes según el pH del medio (tabla de la *Figura 4.49*) lo que podría ser consecuencia de la modificación de la estructura electrónica respecto al compuesto de partida.



pH	B (nm)			Q (nm)			
13	405	424		522	557	595	653
5.6	404	423		522	557	596	653
1	406	428 ^h	446	523	561	599 ^h	663

Figura 4.49. Representación de los resultados de las medidas de absorción UV-VIS del *amC₄-TPPorfirina* $6.6 \times 10^{-5} \text{M}$ a distintos valores del pH. (h = hombro).

Se ha estudiado la variación que se produce en el espectro de absorción ultravioleta-visible al cambiar la concentración en disolución acuosa a pH 12. En la *Figura 4.50*, correspondiente a la tetrafenilporfirina, no se observa ninguna banda-J en medio básico. Lo mismo ocurre con el derivado *amC₄-TPPorfirina* (*Figura 4.51*). A partir de estos espectros se han determinado los coeficientes de absorptividad molar recogidos en la *Tabla 4.5*.

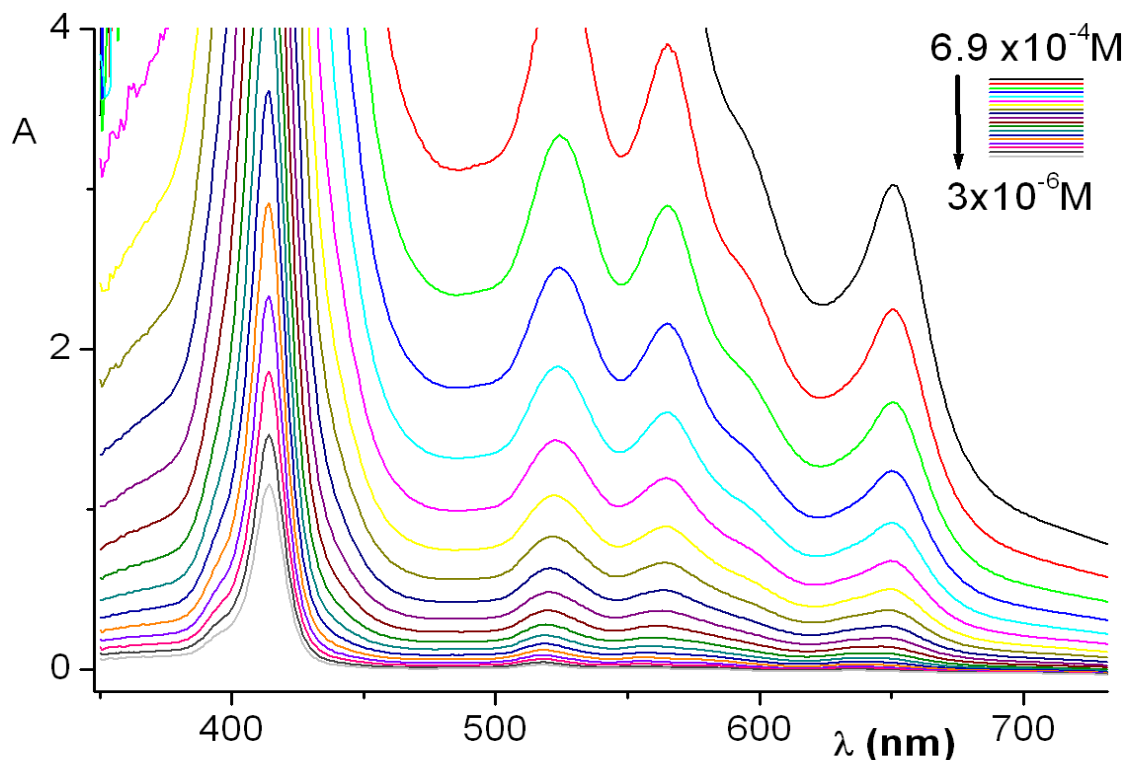


Figura 4.50. Espectros UV-VIS de la tetrafenilporfirina (TPP) a distinta concentración, paso óptico de 1 cm y pH 12.

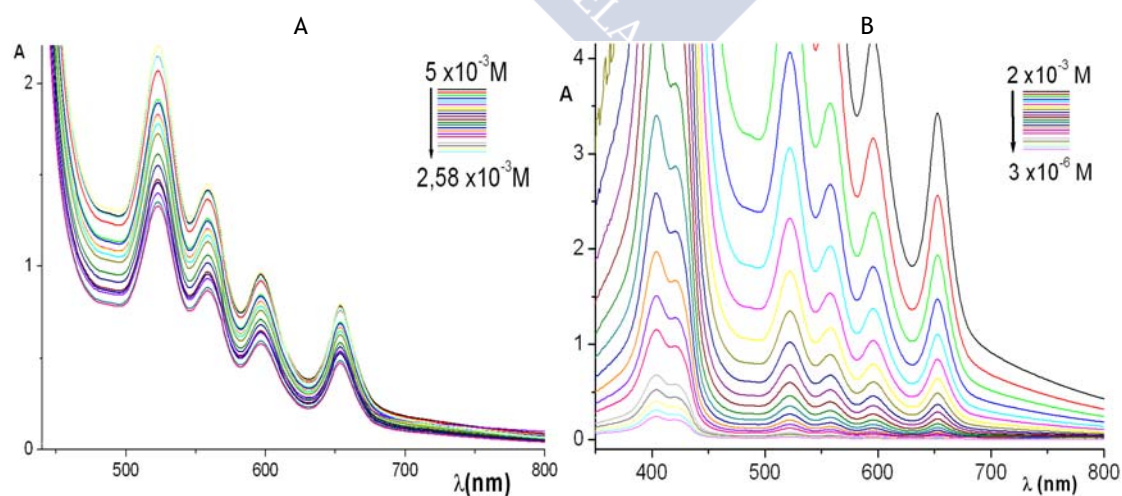


Figura 4.51. Espectros de absorción UV-VIS de la *amC₄-TPPorfirina*. Dependencia con la concentración a pH 12. A) Paso óptico de 1 mm y B) 1 cm.

Tabla 4.5
Coeficientes de absorptividad molar de las bandas Q del tetrámero *amC₄-TPPorfirina*.

Longitud de onda (nm)	522	558	596	653
$10^{-3}\epsilon$ ($M^{-1} cm^{-1}$)	4.83	3.14	2.11	1.71

La adición de metanol permite una variación homogénea de la polaridad del medio, dada su miscibilidad con el agua, y además resulta un disolvente idóneo para el *amC₄-TPPorfirina*, como ya fue observado en el proceso de síntesis del compuesto. Se han realizado espectros partiendo de una disolución acuosa de *amC₄-TPPorfirina* 6.6×10^{-4} M a pH 12, que se diluía progresivamente con metanol. De esta forma la concentración del compuesto disminuye y la de metanol aumenta. En los espectros (Figura 4.52) se observa que la posición de las bandas-Q cambia. Asimismo, cuando el porcentaje en metanol supera el 30 %, se observa la aparición de una pequeña banda-J a 482 nm, lo que indica que el proceso que la origina depende de la polaridad del medio. Se han observado resultados similares al emplear dimetilsulfóxido como disolvente adicionado. La aparición de la banda-J indica que se están produciendo solapamientos de orbitales π en disolución lo que implica la formación de asociaciones moleculares. No se puede distinguir si estas asociaciones son de tipo dímero o de mayor orden. Este resultado muestra la gran tendencia a la asociación que esta molécula posee, incluso en medios menos polares donde se mejora su solubilidad.

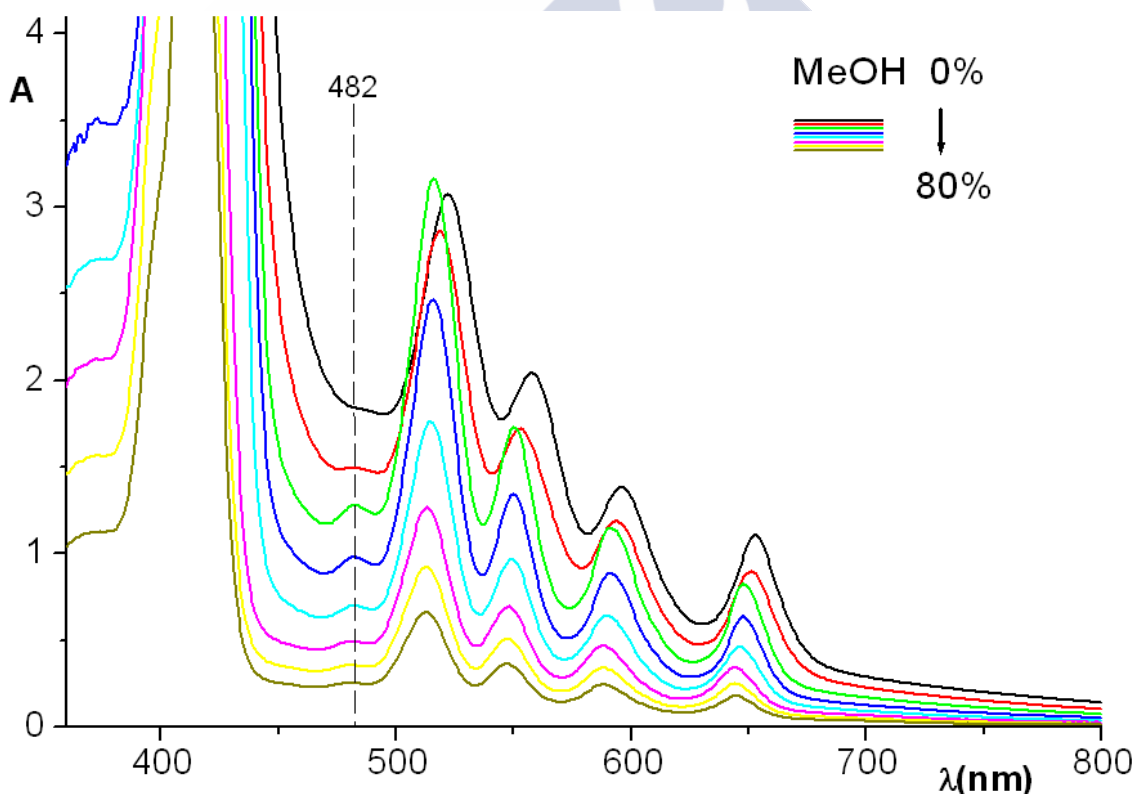


Figura 4.52. Espectros de absorción UV-VIS del tetrámero *amC₄-TPPorfirina* a pH 12 variando su concentración y la proporción de metanol.

Estudios de tamaño de partícula por TEM.

Se prepararon varias disoluciones del *amC₄-TPPorfirina* en NaOH 0.01 M para ser analizadas por TEM. Las imágenes obtenidas para una disolución de 5×10^{-3} M tras tres horas de reposo (Figura 4.53) muestran estructuras irregulares (con un tamaño medio de 40 nm, Figura 4.54 izquierda) que parecen estar formadas a partir de partículas pequeñas, presumiblemente micelas. Esta aseveración viene apoyada por la medida de los tamaños de este tipo de partículas observadas libres y asociadas, ya que los mismos son 2.0 ± 0.4 nm y 3.0 ± 0.5 nm, respectivamente, mostrando la Figura 4.54 derecha los histogramas de distribución de los tamaños. Al tener en cuenta el error relativamente grande que se comete al hacer mediciones de partículas tan pequeñas a partir de imágenes TEM, se puede aceptar que ambas poblaciones corresponden al mismo tipo de partícula.

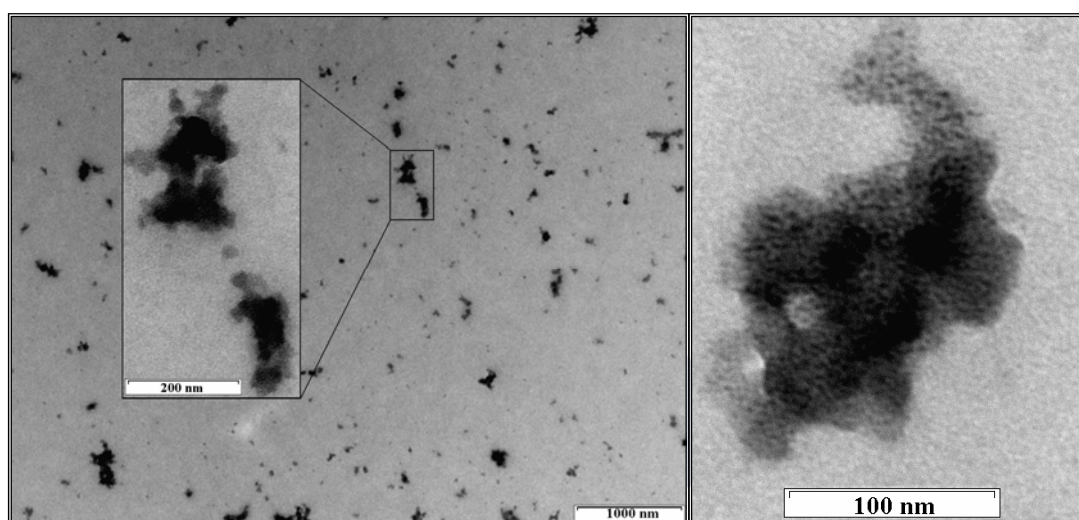


Figura 4.53. Imágenes TEM de los agregados originados por el *amC₄-TPPorfirina* tras 3 horas de la preparación de una disolución 5×10^{-3} M en NaOH 0.01M.

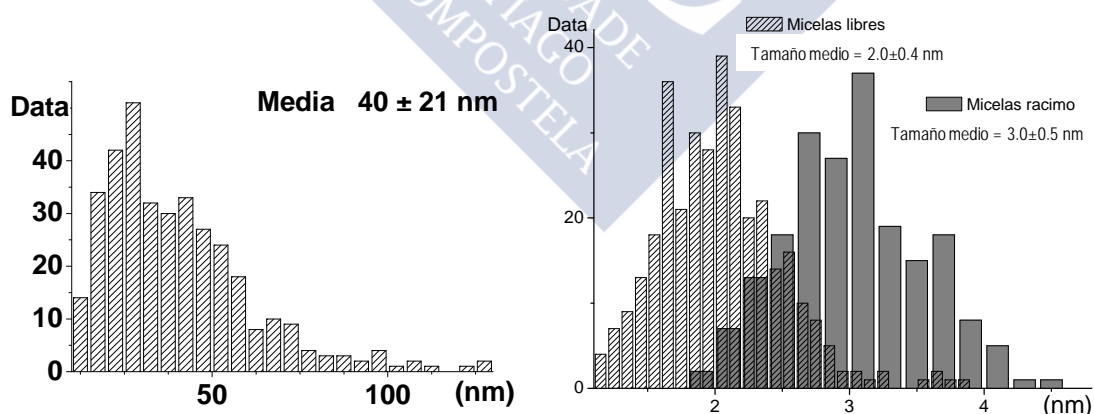


Figura 4.54. Histograma de los diámetros los agregados observados por TEM correspondientes al *amC₄-TPPorfirina* tras 3 horas de la preparación de una disolución 5×10^{-3} M en NaOH 0.01M. Izquierda: partículas amorfas. Derecha: partículas (asignadas a micelas) libres o asociadas en los agregados amorfos.

Transcurridas 24 horas desde la preparación de la disolución, se sigue observando una gran abundancia de micelas libres, así como asociadas formando parte de racimos

(Figura 4.55). Por la forma muy irregular de estos racimos, no se han realizado determinados de su tamaño.

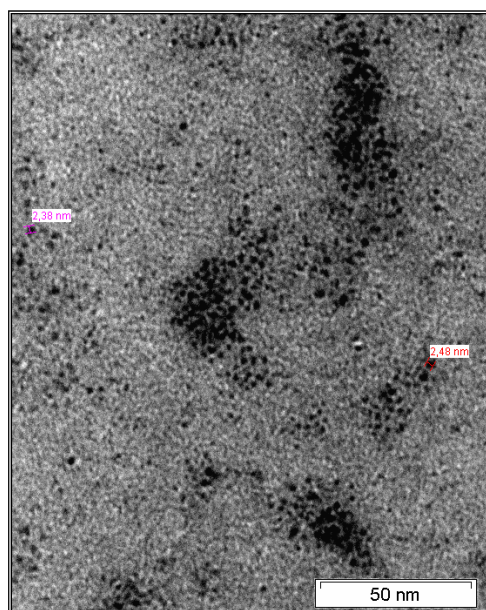


Figura 4.55. Imagen TEM de micelas libres y asociadas en racimos obtenida tras 24 horas de la preparación de una disolución $5 \times 10^{-3} \text{M}$ de *amC₄-TPPorphirina* en NaOH 0.01M.

Bajo el microscopio confocal, iluminando la muestra con luz ultravioleta y un filtro rojo, las disoluciones anteriores aparecen como una nube muy dispersa (Figura 4.56). Como cabría esperar, dada la poca resolución de esta técnica en comparación con TEM, no se observa con claridad ningún agregado. Esta imagen es muy diferente de la que se puede observar una vez que el producto precipita. La Figura 4.57 muestra el aspecto de precipitados coloidales ya que, en ningún caso, se observaron estructuras cristalinas. Esta imagen fue obtenida a partir de una disolución concentrada de *amC₄-TPPorphirina* 0.01 M en agua sin ningún co-soluto añadido, transcurridas 24 horas desde su preparación.

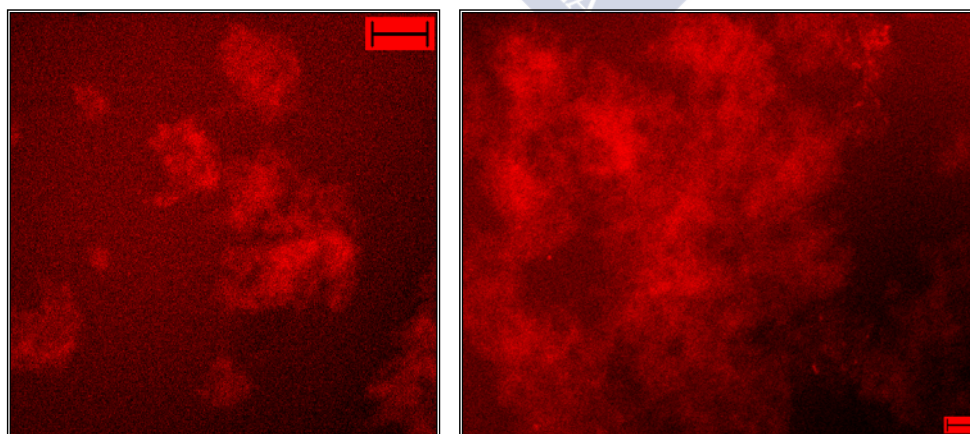


Figura 4.56. Imágenes de microscopía confocal con luz ultravioleta y un filtro en la región del rojo de una disolución de *amC₄-TPPorphirina* $5 \times 10^{-3} \text{M}$ en NaOH 0.01M tras 3 horas de su preparación. La barra indica $1050 \mu\text{m}$.

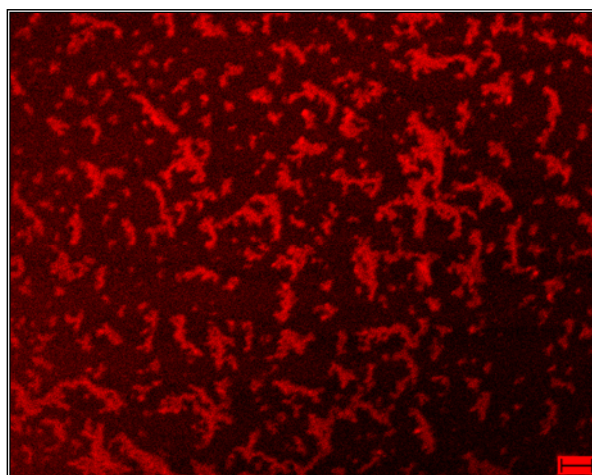


Figura 4.57. Imagen de microscopía confocal con luz ultravioleta y un filtro en la región del rojo de los precipitados coloidales de una disolución de *amC₄-TPPorphirina* 0.01 M en agua, transcurridas 24 horas desde su preparación. La barra indica 1050 μm .

Se añadió cloruro de cobalto sobre una disolución 5×10^{-3} M del *amC₄-TPPorphirina* en NaOH 0.01 M, para observar el efecto que el catión produce sobre la agregación. La imagen TEM de la *Figura 4.58* sugiere la formación de un gel dado que no se ven agregados independientes y la materia aparece prácticamente como un continuo. Llama la atención que como en el caso del *amC₂-protoporfirina* desaparece la fluorescencia en la región del verde (*Figura 4.59*).

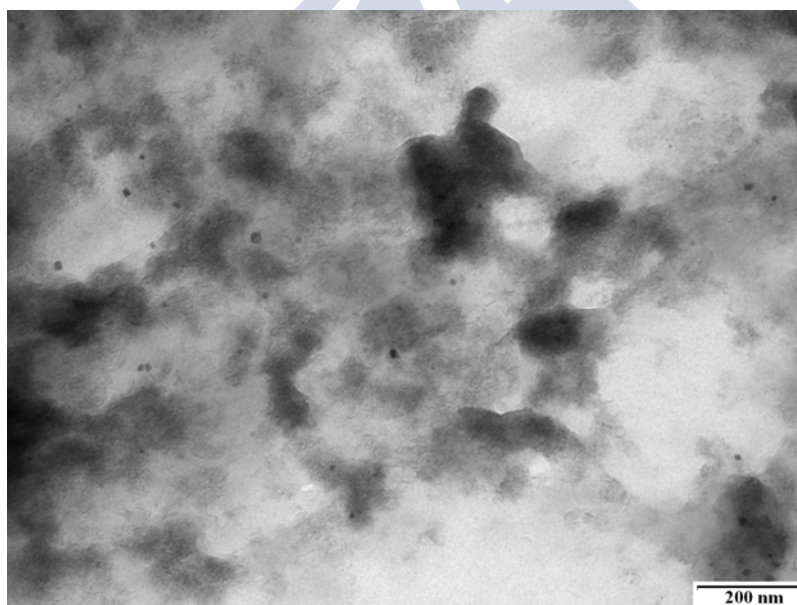


Figura 4.58. Imagen TEM de una disolución 5×10^{-3} M de *amC₄-TPPorphirina* con CoCl_2 .

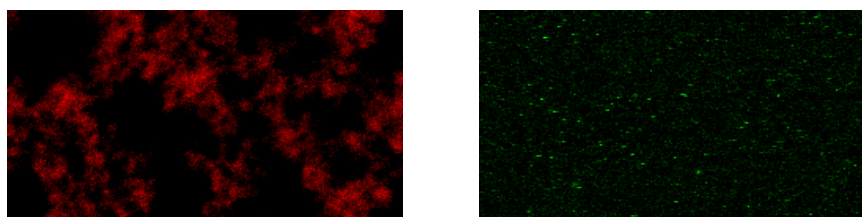


Figura 4.59. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de una disolución 5×10^{-3} M de *amC₄-TPPorphirina* con CoCl_2 , con una fuente ultravioleta y filtros rojo y verde

Se realizó una prueba de complejación del ion cobalto (II) con el anillo tetrapirrólico del tetrámero, obteniéndose el producto *amC*₄-TPPorfirina(Co) (Figura 4.60). Para ello, 0.26 g del tetrámero se pusieron a reflujo una hora y media con 20 mL de metanol y 1 g de CoCl₂ 6H₂O. Pasado ese tiempo se dejó enfriar el crudo de reacción, se precipitó añadiendo agua y se filtró. Se transforma el ácido en la sal, disolviéndolo en la mínima cantidad de agua en medio básico, se eliminan los restos de cloruro de cobalto no disuelto por filtración lo que no se ha disuelto y se precipita en acetona. Aunque no llevaron a cabo purificaciones posteriores, dada la escasa cantidad obtenida, el espectro de absorción ultravioleta-visible muestra el aspecto típico de las metaloporfirinas. Al introducir un metal en el corazón de la porfirina ocurren cambios importantes en la posición, forma e intensidad de las bandas producidas por la absorción de luz ultravioleta-visible (Figura 4.61).⁴⁻⁶

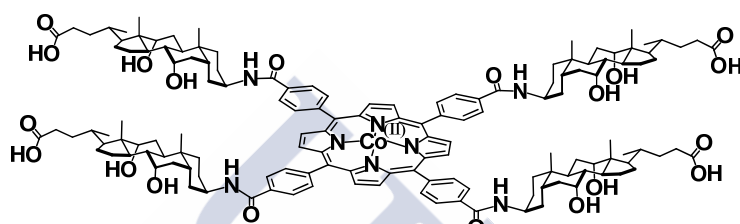


Figura 4.60. Estructura molecular del *amC*₄-TPPorfirina(Co).

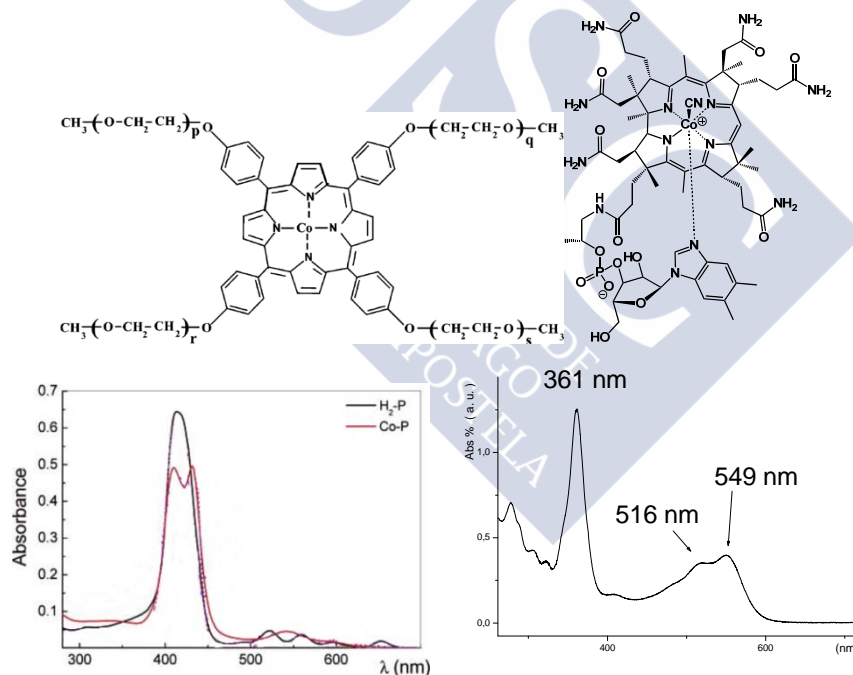


Figura 4.61. Estructura molecular y espectro de absorción UV-visible de dos ejemplos de metaloporfirinas de cobalto.⁶ Véase también <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/036.html>

Para el compuesto que nos ocupa, respecto al *amC*₄-TPPorfirina, desaparece prácticamente el desdoblamiento de la banda Soret y, asimismo, el número de bandas Q se reduce de cuatro a una que aparece a 533 nm (Figura 4.62 y Tabla 4.6). A efectos comparativos en la misma figura se superponen los espectros del *amC*₄-TPPorfirina sola y en presencia de Co²⁺ (sin complejar). Ello viene motivado por el reajuste de los orbitales HOMO y LUMO en la porfirina complejada respecto a la libre.⁷⁻⁸ De las observaciones anteriores puede concluirse que la simple disolución del *amC*₄-TPPorfirina en presencia de cloruro de cobalto (II) no es suficiente para la complejación del catión por enlaces η¹-

pirrol. También resalta el hecho de que, en presencia del catión, las bandas Q I, II y III se desplazan hacia el azul, respecto al tetrámero libre, y que aparece un pequeño hombro (488 nm) en la región de la banda J del espectro (Figura 4.62). Hasta el momento, en ningún estudio en disolución acuosa de los derivados de porfirina presentados en este trabajo, se ha observado la banda J como tal, dado que únicamente apareció de forma tenue, cuando se mezclan disolventes.

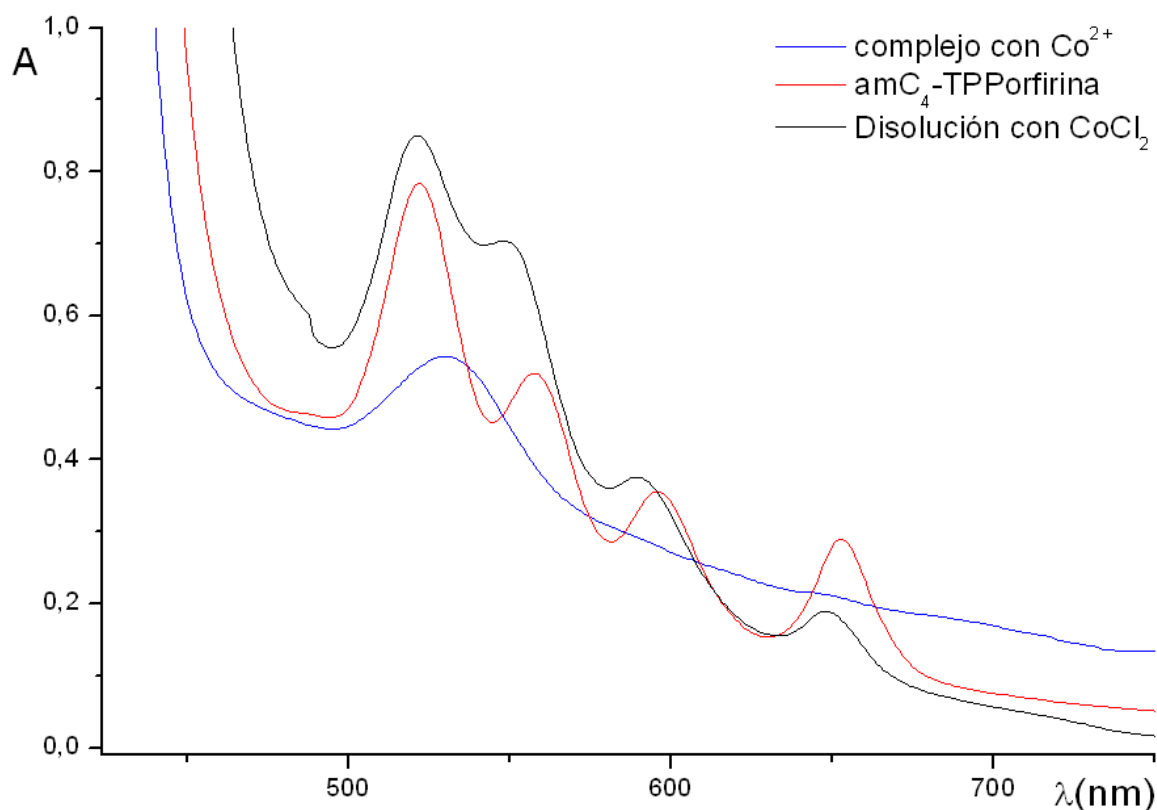


Figura 4.62. Espectros de absorción ultravioleta-visible de tres disoluciones $\approx 2.0 \times 10^{-4}$ M de: amC_4 -TPPorfirina (rojo), $CoCl_2 + amC_4$ -TPPorfirina (negro) y amC_4 -TPPorfirina(Co) (azul).

Tabla 4.6
Bandas de absorción ultravioleta-visible de las disoluciones ($\approx 2.0 \times 10^{-4}$ M).

Disolución	Bandas →	B	J	Q			
				IV	III	II	I
amC_4 -TPPorfirina		405 424	-	522	558	596	653
amC_4 -TPPorfirina con $CoCl_2$		- 425	488	521	548	590	648
amC_4 -TPPorfirina(Co)		416	-	533	-	-	-

No se detecta ninguna actividad fluorescente a partir de una disolución del amC_4 -TPPorfirina(Co) 5×10^{-3} M en NaOH 0.01 M, aunque permanece su carácter de gel (Figura 4.63), apareciendo fibras con fuerte contraste (Figura 4.64).

Al añadir $MgCl_2$ a la disolución 5×10^{-3} M del amC_4 -TPPorfirina en NaOH 0.01 M, mediante TEM (Figura 4.65, se observó la formación de una gran cantidad de pequeños cristales pertenecientes a dos tipos de estructuras cristalinas, siendo una de ellas correspondiente al cloruro de magnesio, fácilmente reconocible. La otra estructura cristalina se presenta en forma de pequeñas agujas, que se supone que corresponden al tetrámero de la porfirina. Lamentablemente, no se ha conseguido un tamaño de cristal

suficiente para ser resuelto por difracción de rayos X. Respecto al tamaño, la media de la sección del cristal resultó de 54 ± 13 nm.

El precipitado es fácilmente observable por microscopía confocal, siendo de destacar que el sólido tiene una ligera actividad fluorescente en la región del rojo. De nuevo, la actividad fluorescente en la región del verde desaparece (*Figura 4.66*).

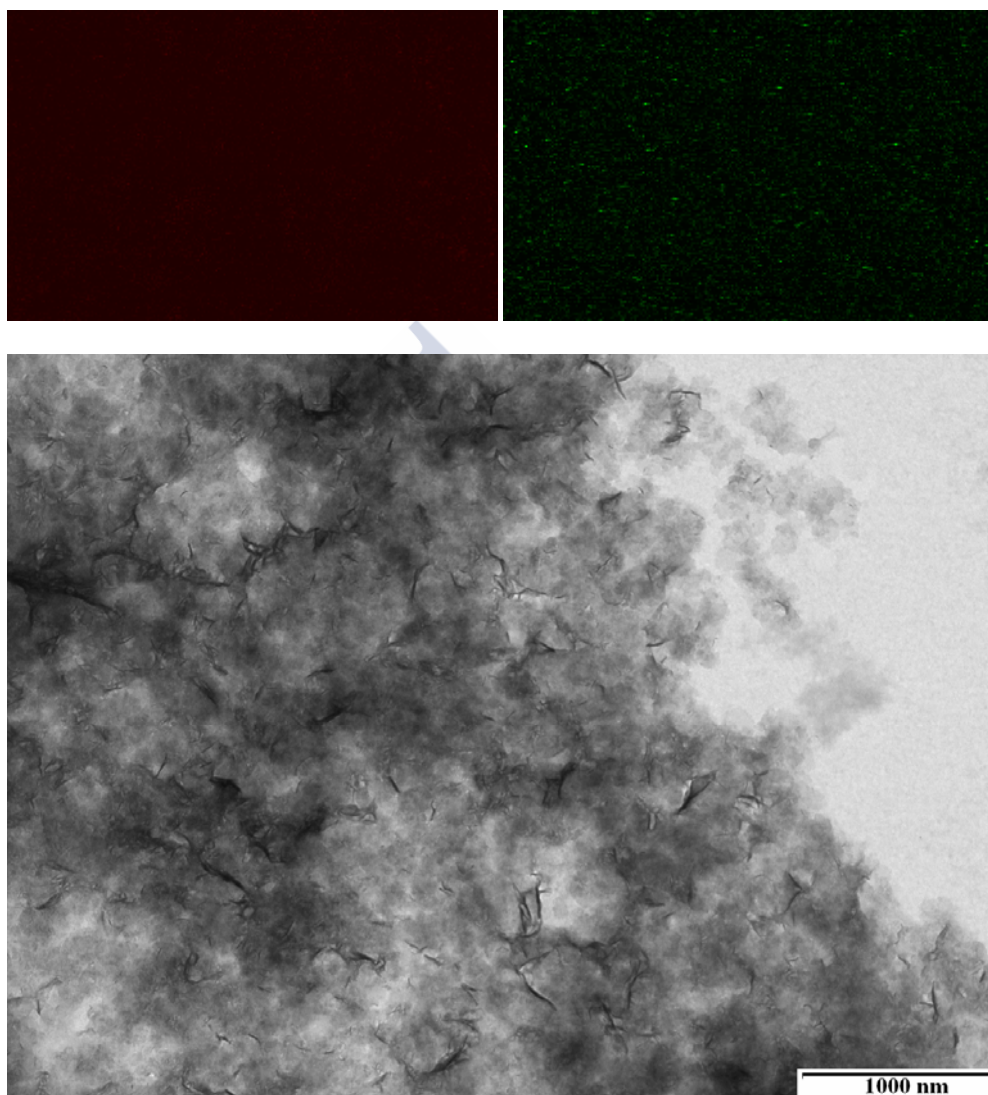


Figura 4.63. Imágenes de una disolución 5×10^{-3} M de amC_4 -TPPorphirina(Co) obtenidas mediante microscopía confocal con una fuente ultravioleta y filtros rojo y verde (arriba) y TEM (abajo).

A modo de resumen, merece la pena destacar los siguientes aspectos. Los problemas de solubilidad que presentaron este tipo de compuestos limitan el estudio a altas concentraciones. Todos los oligómeros muestran una evidente reducción de la tensión superficial en disoluciones acuosas. Con la excepción del amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico, no se detectado la *cac*. El valor mínimo de tensión superficial alcanzado dista del correspondiente a un surfactante clásico, que puede bajar de 40 mN/m. Así, en el caso de los trímeros la tensión superficial no baja de 55 mN/m y en los tetrámeros de 63 mN/m. Paradójicamente, las medidas de dispersión de luz láser (donde fue posible la utilización de esta técnica), así como las imágenes TEM, muestran procesos de agregación.

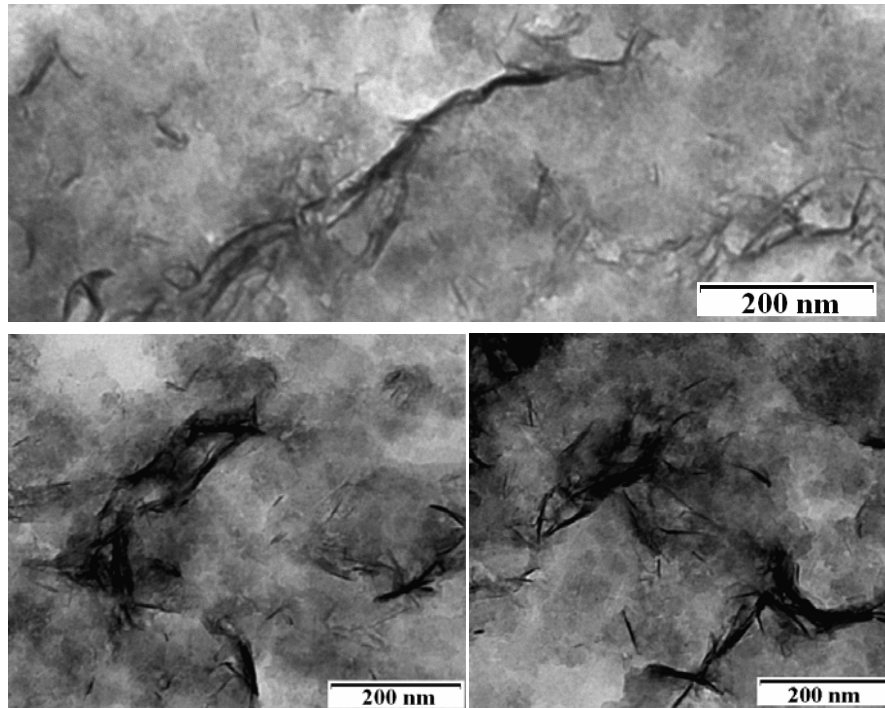


Figura 4.64. Imágenes TEM de una disolución 5×10^{-3} M de amC_4 -TPPorphirina(Co).

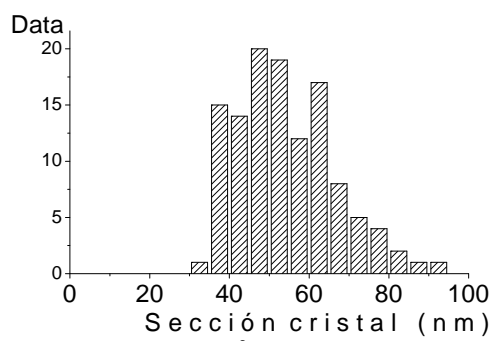
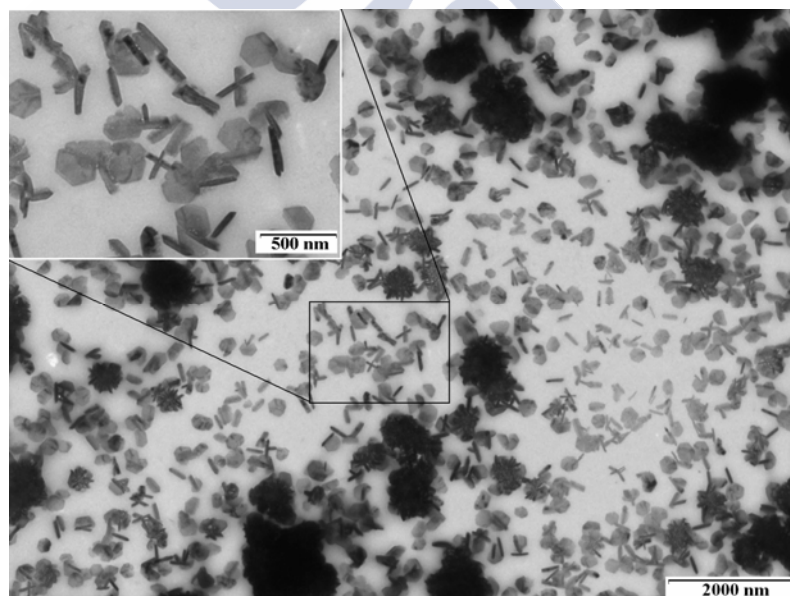


Figura 4.65. Imagen TEM de una disolución 5×10^{-3} M de amC_4 -TPPorphirina con $MgCl_2$ e histograma del tamaño de los cristales en forma de aguja.

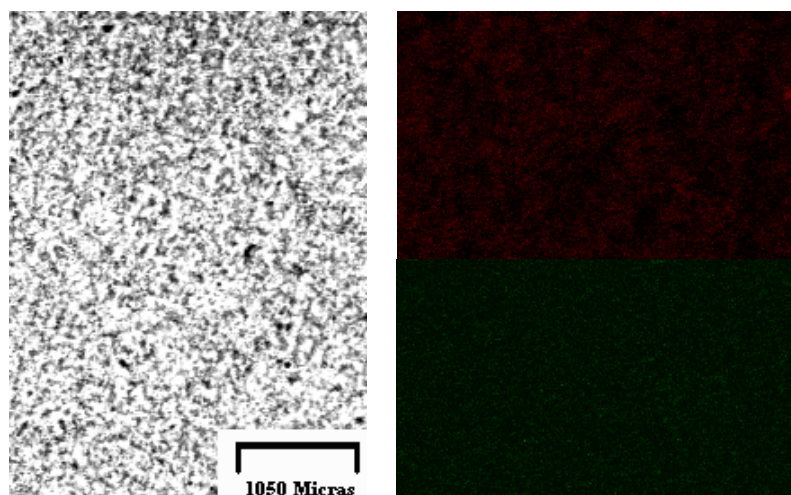


Figura 4.66. Imágenes de una disolución 5×10^{-3} M de amC_4 -TPPorfirina con $MgCl_2$ obtenidas mediante microscopía confocal con una fuente ultravioleta y con filtros rojo y verde.

En comparación con los dímeros del capítulo anterior, los trímeros y tetrámeros presentan un menor poder surfactante. En cambio, el trímero lineal C^{24} - amC^{24} - amC (estudiado con anterioridad en nuestro grupo)⁹ tiene una *cac* muy baja, de 3.4×10^{-6} M con una tensión superficial de 54 mN/m.

Bibliografía

- (1) Song, L. D.; Rosen, M. J. *Langmuir* **1996**, *12*, 1149.
- (2) Rosen, M. J.; Mathias, J. H.; Davenport, L. *Langmuir* **1999**, *15*, 7340.
- (3) Alvarez, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 6060.
- (4) Gouterman, M.; Hanson, L. K.; Khalil, G. E.; Buchler, J. W.; Rohbock, K.; Dolphin, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3142.
- (5) Hoshino, M.; Sonoki, H.; Miyazaki, Y.; Iimura, Y.; Yamamoto, K. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4850.
- (6) Angelini, N.; Micali, N.; Mineo, P.; Scamporrino, E.; Villari, V.; Vitalini, D. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 18645.
- (7) Liao, M.-S.; Scheiner, S. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 205.
- (8) Lin, W. C. *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 1114.
- (9) Antelo Queijo, A. *Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares, Tesis Doctoral, USC* **2008**.

CONCLUSIONES.

Los resultados presentados y su discusión nos llevan a proponer las siguientes conclusiones generales:

- **Primera:** Se ha demostrado que la obtención de nuevos derivados de sales biliares por el acoplamiento entre moléculas o por unión a diversas moléculas puente bi-, tri o tetra-dentadas, utilizando dietilcianofosfonato como activador, resulta muy efectiva para la obtención de derivados de sales biliares. El método también presenta algunos inconvenientes ya que las reacciones parásitas y la hidrólisis del enlace amida (en determinadas condiciones) disminuyen el rendimiento de la reacción y limitan las condiciones de trabajo. Sin embargo, es factible aprovechar ventajosamente tales reacciones paralelas, siendo la obtención de un dímero de ácido cólico con puente urea (*amC₂-urea*) un ejemplo representativo. Los hechos anteriores junto con la propia solubilidad de los productos (menor cuanto mayor el número de esteroides que contenga) hacen más complicada y costosa la purificación, empezando a ser crítica a partir de los tetrámeros.
- **Segunda:** Se han resuelto diversos cristales de los derivados sintetizados y, para el caso de los dímeros, se ha desarrollado un sistema de coordenadas internas que define con claridad la disposición de los restos de cada esteroide en la molécula. Se ha demostrado que cuando los restos biliares del dímero se disponen de un modo paralelo, como el caso del dímero *amC₂-urea*, se forma un cristal con una perfecta estructura de bicapa, con interdigitación entre los metilos y que deja grandes huecos donde se ubican moléculas huésped. Cuando la disposición relativa es entre perpendicular y paralela, la estructura cristalina se extiende en zigzag.
- **Tercera:** A partir de los parámetros estructurales derivados de la resolución de los cristales anteriores, mediante difracción de rayos-X, junto con una revisión exhaustiva de otros cristales publicados con anterioridad, se ha calculado el área promedio de la sección molecular del núcleo esteroide, así como de la cadena lateral y de varios residuos ligados a aquel. Los datos han sido utilizados para proponer la orientación del derivado en la interfase aire/agua (*vide infra*).
- **Cuarta:** Mediante medidas de tensión superficial se ha demostrado que los nuevos derivados son buenos surfactantes, si bien no siempre ha sido posible determinar la existencia de una concentración de agregación crítica, debido, en general, a problemas de solubilidad y formación de geles. El valor del área superficial por molécula en la interfase aire/agua, calculada mediante la isoterma de adsorción de Gibbs, y su comparación con el valor del área de la sección molecular, permitió proponer la orientación de las moléculas en dicha interfase.
- **Quinta:** Mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la medida de la dispersión de luz, se ha demostrado que los compuestos tienen una gran tendencia a agregarse. Los agregados observados tienen distinta naturaleza, dependiendo de la estructura del surfactante (número de residuos esteroides, número de grupos funcionales presentes en los mismos, estructura del puente, etc.) y de las condiciones experimentales. En numerosos derivados, los agregados evolucionan con el tiempo.

Así se han observado agregados con tamaños comprendidos en el intervalo 1.5-4 nm, que corresponden a estructuras micelares, agregados globulares en el intervalo 100-250 nm, pseudo-vesículas de diámetro entre 20-65 nm, y fibras de 40 nm de diámetro, así como la formación de geles (tendencia más notoria para los tetrámeros) o precipitados coloidales originados por la condensación de partículas de menor tamaño. En algún caso, se ha podido comprobar la formación de cristales líquidos.

- **Sexta:** La incorporación de metales pesados a las disoluciones de los surfactantes estudiados deja patente la influencia del contraión en los procesos de agregación de estos compuestos. El caso más sobresaliente corresponde al trímero derivado del ácido cólico con puente aminoisoftálico (C^{24}, amC_2 -aminoisoftálico) que, en presencia del Co^{2+} , forma tubos moleculares. Por otra parte, el complejo de Co^{2+} con un tetrámero con porfirina como puente (amC_4 -*TPPorfirina*) prueba que los orbitales moleculares del sistema tetrapirrólico quedan comprometidos con los orbitales atómicos del cobalto.





APENDICES

APENDICE A

SECCIÓN EXPERIMENTAL

A.1 SÍNTESIS DEL DÍMERO amC_2 -IMINODIACÉTICO.

(Ácido 4-{3-[2-({[17-(3-Carboxi-1-metil-propil)-7,12-dihidroxi-10,13-dimetil-hexadecahidro-ciclopenta[a]fenantren-3-ilcarbamoil]-metil}-amino)-acetilamino]-7,12-dihidroxi-10,13-dimetil-hexadecahidro-ciclopenta[a]fenantren-17-il}-pentanoico).

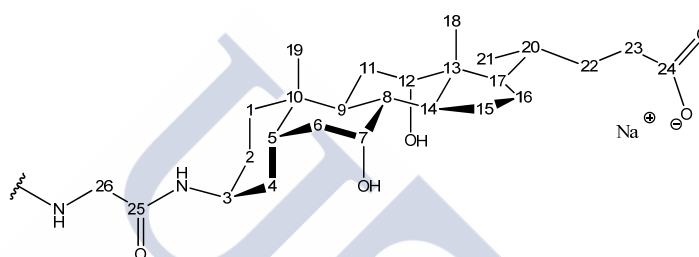


Figura A.01. Numeración de la molécula del compuesto amC_2 -iminodiacético.

En un balón de 100 mL de fondo redondo, seco, provisto de barra de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 4 g (9.5 mmol) de 3- β -aminocolato de metilo (obtenido de acuerdo con el método de Anelli *et al.*)² en 50 mL de DMF seca. Se adicionan 1.54 mL (9.1 mmol) de DEPC y una vez disuelto el sólido en suspensión, se añaden 0.94 g (5.5 mmol) de ácido iminodiacético (protegido el grupo amino con un grupo *t*-butilo) y se agita durante 10 minutos. Se enfría a 0 °C y se adicionan 3.43 mL (24 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez acabada la reacción, se precipita el crudo en 300 mL de agua, se filtra y el precipitado se lava con abundante agua y se seca en estufa de vacío. Se purifica por cromatografía de columna con una mezcla de elución 20:1 en acetato de etilo:metanol. El BOC se remueve de la siguiente forma: Se disuelven 2 g del compuesto en 50 mL de metanol y se burbujea HCl gaseoso durante 30 minutos. Posteriormente, se evapora el disolvente y se agregan 100 mL de agua y se neutraliza en baño de hielo con una disolución 1M de sosa hasta pH neutro. Se filtra y se lava con abundante agua. Se seca en estufa de vacío y se purifica el producto con una columna cromatográfica de gel de sílice empacada con una mezcla 9:1 acetato de etilo/metanol. La desprotección del grupo se realiza disolviendo 2.80 g de KOH en 50 ml de metanol, 1.38 g del dímero alifático calentando a reflujo durante 90 minutos. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente y se disuelve en agua añadiendo HCl hasta alcanzar un pH entre 5 y 6. Se filtra y se lava con agua y posteriormente se seca en la estufa. A continuación 0.228 g (25 mmol) del diácido se disuelven con dos equivalentes de NaOH (0.02 g) en la mínima cantidad de agua (aprox. 5 mL). Una vez disuelto el ácido, se le añaden 300 mL de acetona y se deja reposar a temperatura ambiente hasta la aparición de un precipitado. Se filtra y se seca en estufa a vacío a 60 °C. Rendimiento global \approx 35%.

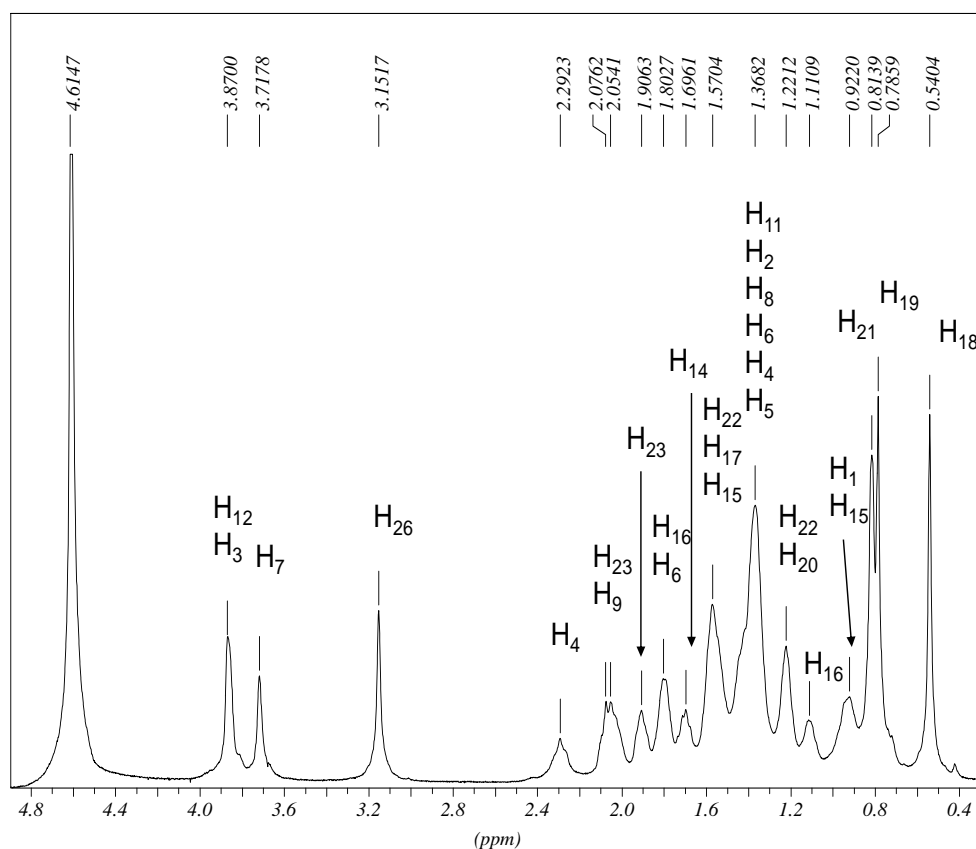


Figura A.02. Espectro de ^1H -RMN de la sal del compuesto amC_2 -iminodiacético.

amC_2 -iminodiacético: ^1H RMN (D_2O ; 500 MHz, δ/ppm): 3.87 (H3, H12); 3.15 (H26); 3.71 (H7); 0.81 (H21); 0.78 (H19); 0.54 (H18). ^{13}C RMN (D_2O ; 125 MHz, δ/ppm): 187.1 (O=C24-O-); 175.6 (O=C25NH); 75.8 (C12); 71.0 (C7); 54.5 (C26); 48.8 (C3); 26.1 (C19); 19.8 (C21); 15.4 (C18). Masas: (MALDI-TOF): $\text{M}+\text{Na}^+$: 934.56 g/mol; teórico: 933.22 g/mol.

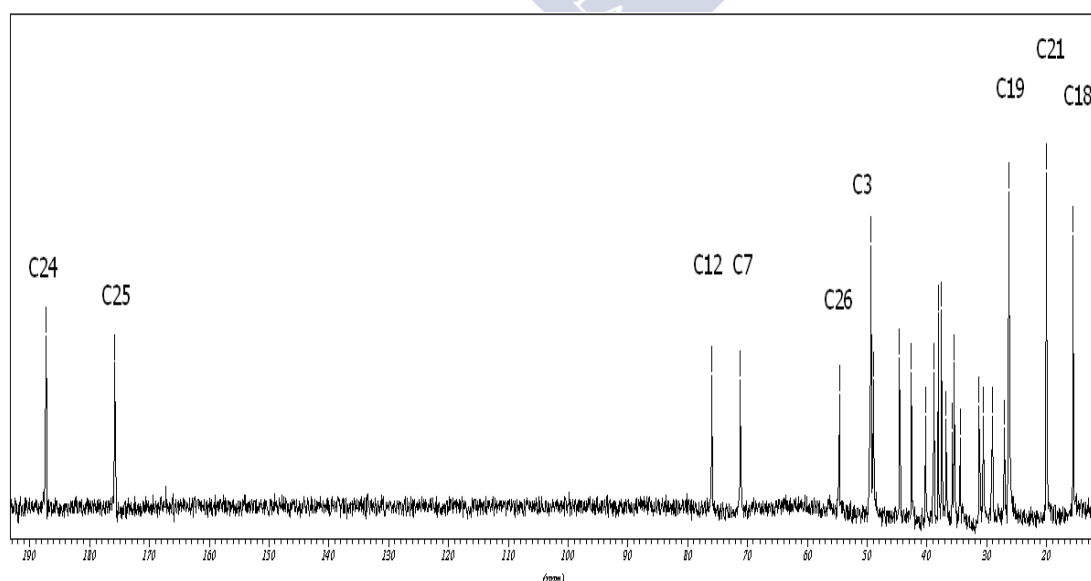


Figura A.03. Espectro de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto amC_2 -iminodiacético.

Tabla A.01.
Asignación de las señales del espectro ^{13}C basado en la interpretación de los espectros bidimensionales del compuesto *amC₂-iminodiacético*.

δ / ppm	CH ₃	CH ₂	CH	C
187.1				C ₂₄
175.6				C ₂₅
75.8			C ₁₂	
71.0			C ₇	
54.5		C ₂₆		
49.3			C ₁₇	
49.2				C ₁₃
48.8			C ₃	
44.4			C ₁₄	
42.4			C ₈	
40.1			C ₅	
38.7		C ₂₀		
37.9				C ₁₀
37.3		C ₂₃		
36.6		C ₆		
35.6		C ₄		
35.3		C ₂₂		
31.1		C ₁₁		
30.4		C ₁₆		
28.9			C ₉	
26.9		C ₂		
26.1	C ₁₉	C ₁₅ , C ₁		
19.8	C ₂₁			
15.4	C ₁₈			

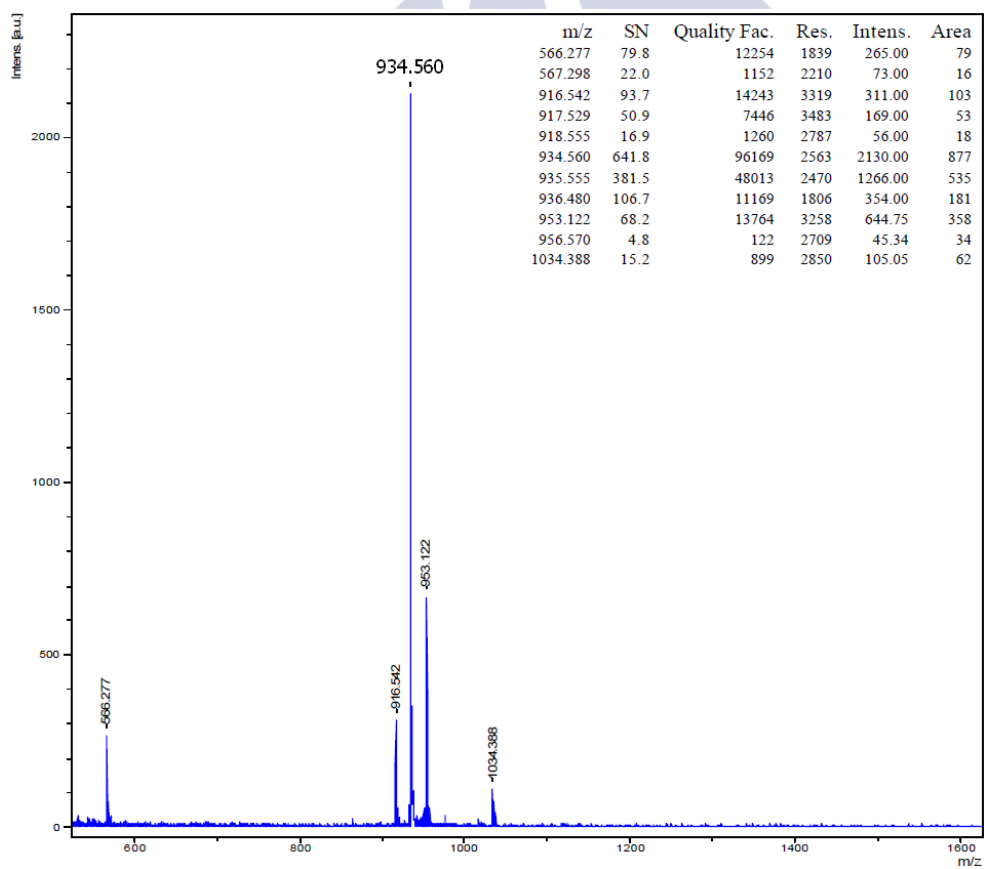


Figura A.04. Espectro de Masas (Maldi-TOF) de la sal del compuesto *amC₂-iminodiacético*.

A.2 SÍNTESIS DEL amC_2 -AMINOISOFTÁLICO.

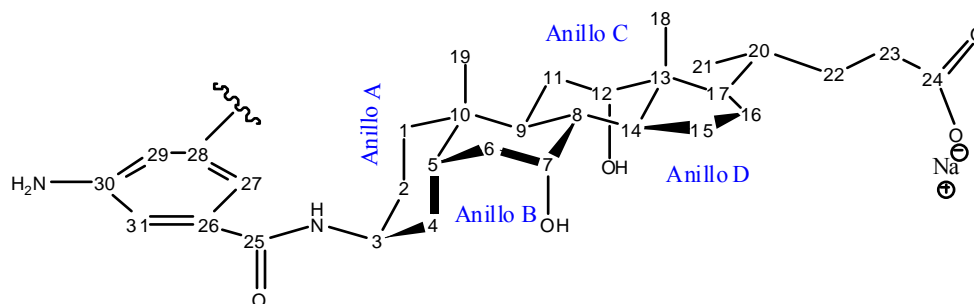


Figura A.05. Numeración de la molécula del compuesto amC_2 -aminoisofáltico.

En un balón de 100 mL de fondo redondo, seco, provisto de pastilla de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 4 g (9.5 mmol) 3- β -aminocolato de metilo en 15 mL de DMF. Se adicionan 1.54 mL (9.1 mmol) de DEPC y una vez disuelto el sólido en suspensión, se añaden 2.32 g (5.5 mmol) del puente (ácido 5-aminoisofáltico protegido en el grupo amino mediante BOC) y se agita durante 10 minutos. Se enfría a 0 °C y se adicionan finalmente, 2 mL (14 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 6 horas. Una vez acabada la reacción, se evapora la DMF a presión reducida y el crudo se disuelve en 200 mL de acetato de etilo. A continuación se lava con 3 porciones de 75 mL de agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra. Alternativamente, se puede precipitar el crudo en 300 mL de agua, se filtra y el precipitado se lava con abundante agua y se seca en estufa de vacío. Se purifica por cromatografía de columna con una mezcla de elución 20:1 en acetato de etilo:metanol. El BOC se remueve de la siguiente forma: Se disuelven 2 g de 182 en 50 mL de metanol y se burbujea HCl gaseoso durante 30 minutos. Posteriormente, se evapora el disolvente y se agregan 100 mL de agua y se neutraliza, en baño de hielo con una disolución 1M de sosa hasta pH neutro. Se filtra y se lava con abundante agua, se seca en estufa de vacío y se emplea sin purificación adicional para el siguiente paso de la secuencia. La desprotección del grupo ácido se realiza disolviendo 1.38 g del compuesto en 50 mL de metanol con KOH 1 N y calentando a reflujo durante una hora y media. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente y se disuelve en agua añadiendo HCl hasta alcanzar un pH entre 5 y 6. Se filtra y se lava con agua y posteriormente se seca en la estufa. A continuación 2 g (2 mmol) del diácido se disuelven con dos equivalentes de NaOH (0.16 g) en la mínima cantidad de agua (aprox. 5 mL). Una vez disuelto el ácido, se le añaden 300 mL de acetona y se deja reposar a temperatura ambiente hasta la aparición de un precipitado. Se filtra y se seca en estufa a vacío a 60 °C. Rendimiento global \approx 30%.

amC_2 -aminoisofáltico: 1H RMN (D₂O; 500 MHz, δ /ppm): 7.14 (HAr); 3.90 (H3); 3.76 (H12); 3.64 (H7); 0.79 (H21); 0.74 (H19); 0.48 (H18). ^{13}C RMN (D₂O; 125 MHz, δ /ppm): 187.3 (O=C24-O-); 172.0 (O=C25NH); 151.0; 138.4; 120.6 y 118.4 (CAr); 75.8 (C12); 71.1 (C7); 49.9 (C3); 26.3 (C19); 19.8 (C21); 15.5 (C18). Masas: (MALDI-TOF): M+Na⁺: 982.8 g/mol; teórico: 981.26 g/mol; M: 960.9 g/mol; teórico: 960.29 g/mol.

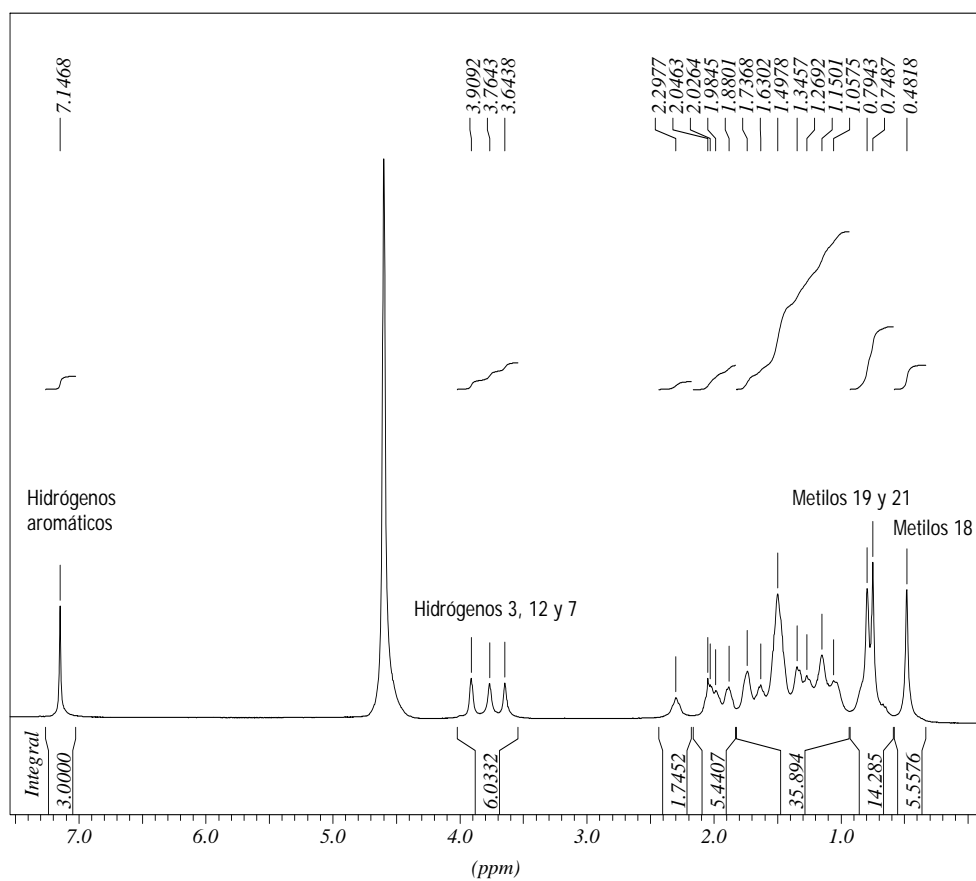


Figura A.06. Espectro de ^1H -RMN de la sal del compuesto *amC*₂-aminoisofthalico.

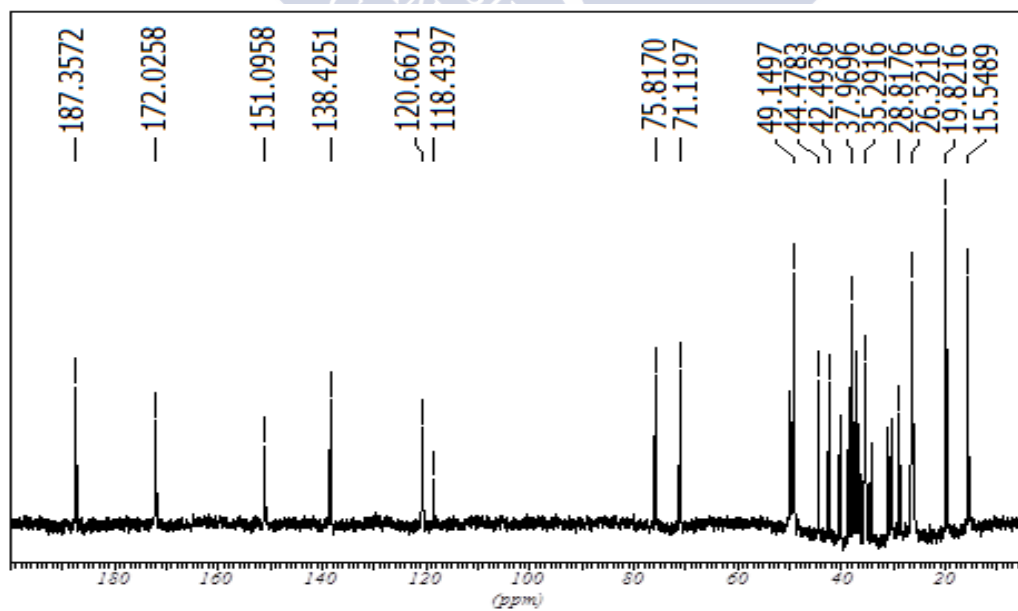


Figura A.7. Espectro de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto *amC*₂-aminoisofthalico.

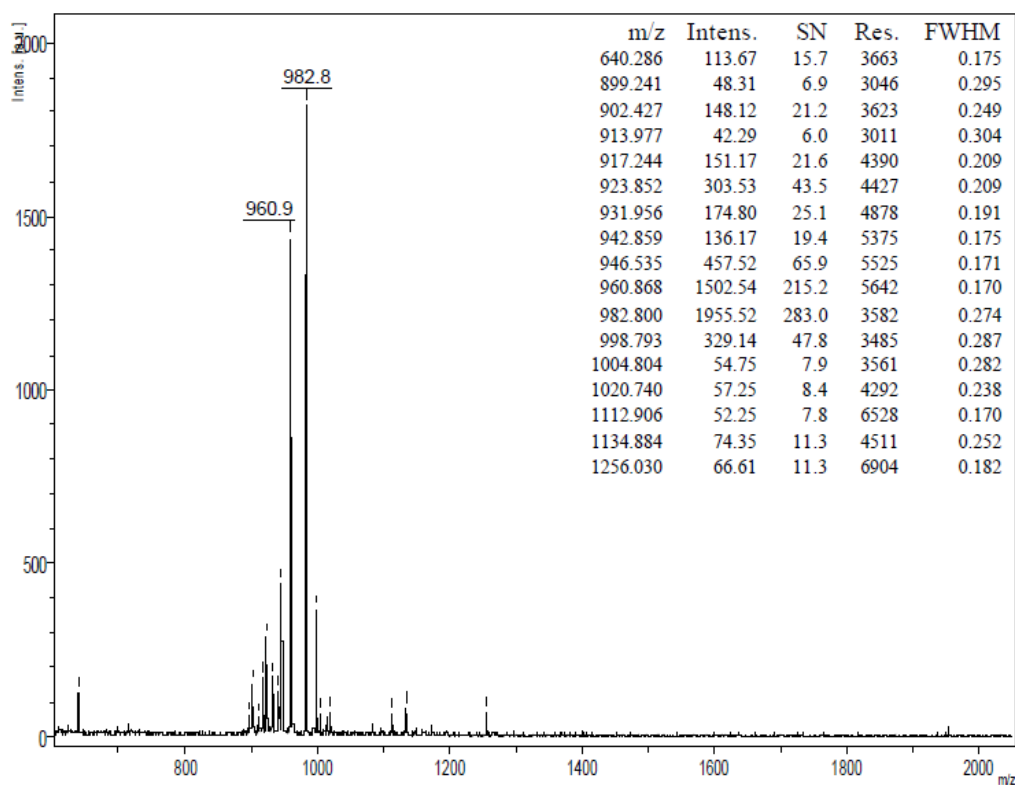


Figura A.08. Espectro de Masas (Maldi-TOF) de la sal del *amC₂-aminosulfónico*.

A.3 SÍNTESIS DEL DÍMERO *amC₂-PROTOPORFIRINA*.

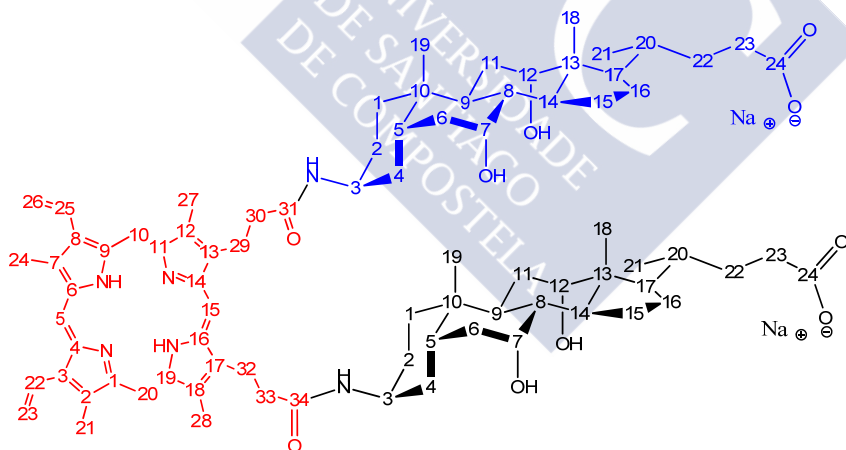


Figura A.09. Numeración de los carbonos de la molécula del compuesto *amC₂-protoporfirina*.

En un balón de 10 mL de fondo redondo, seco, provisto de pastilla de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 0.4 g (0.9 mmol) 3-β-aminocolato de metilo en 5 mL de DMF seca. Se adicionan 0.154 mL (0.9 mmol) de DEPC y una vez disuelto el sólido en suspensión, se añaden 0.226 g (0.4 mmol) de protoporfirina IX y se agita durante 10 minutos. Se enfría a 0 °C y se adicionan 0.343 mL (2.4 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se precipita el crudo en 300 mL de agua, se filtra y el precipitado se lava con abundante agua y se seca en estufa de vacío. Se purifica por cromatografía de columna con una mezcla de elución

8:2 en acetato de etilo: metanol. La desprotección del grupo ácido del compuesto se realiza disolviendo el dímero en 50 mL de una disolución 1 N de KOH (2.8 g) en metanol, y calentando a reflujo durante una hora. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente y se disuelve en agua añadiendo HCl hasta alcanzar un pH entre 5 y 6. Se filtra y se lava con agua y posteriormente se seca en la estufa. Para purificar por cromatografía de columna primero se usa una mezcla de elución ácida formada por una disolución 4:0.5:0.5:2.2 de diclorometano:acetato de etilo: ácido acético:metanol seguido de una fase móvil de metanol para la extracción del producto. Después de evaporar a presión reducida los disolventes más volátiles, el producto se precipita añadiendo agua, se filtra y se seca en una estufa a vacío. A continuación 0.5 g (0.37 mmol) del diácido se disuelven con dos equivalentes de NaOH (0.03 g) en la mínima cantidad de agua (aprox. 5 mL). Una vez disuelto el ácido, se le añaden 300 mL de acetona y se deja reposar a temperatura ambiente hasta la aparición de un precipitado. Se filtra y se seca en estufa a vacío a 30 °C.

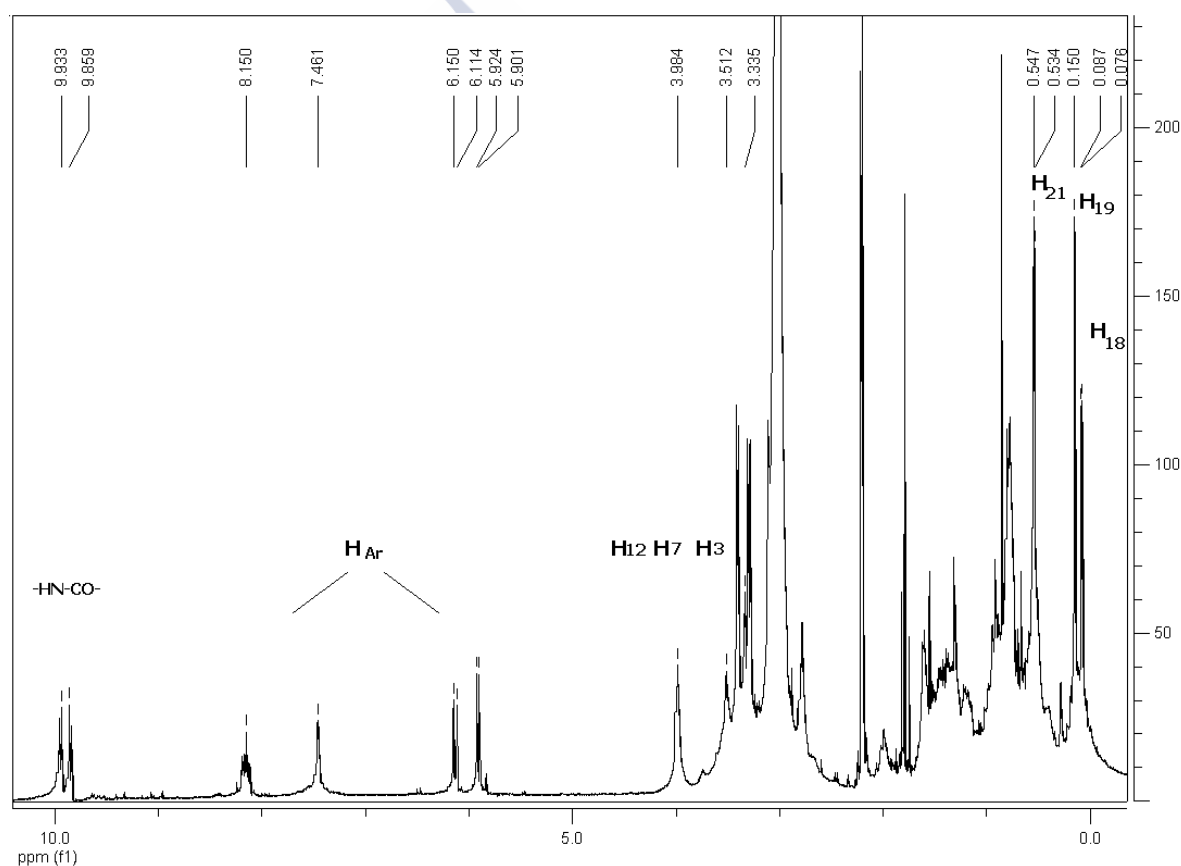


Figura A.10. Espectro de ^1H -RMN de la sal del compuesto *amC₂-protoporfirina*.

amC₂-protoporfirina: ^1H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 12.30 (O=C-OH); 8.41 y 8.12 (HAr); 4.00-3.50 (m H3, m H12 y m H7); 0.95 (m H27); 0.93 (d H21); 0.90 (m H28); 0.87 (m H19); 0.85 (m H21); 0.46 (s H18); 0.34 (s H24). ^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 750 MHz, δ /ppm): 174.4 (O=C24-O-); 172.7(O=C24-N-); 166.9 (O=C25-NH); 139.9; 136.5; 121.8 y 121.2 (CAr); 71.8 (C12); 67.1 (C7); 71.2 y 46.5 (C3); 23.5 (C19); 17.6; 17.8 (C21); 14.7 y 13.0 (C18). Masas: (MALDI-TOF): M: 1341.9 g/mol; teórico: 1341.8 g/mol. M+Na⁺: 1364.0 g/mol; teórico: 1363.78 g/mol.

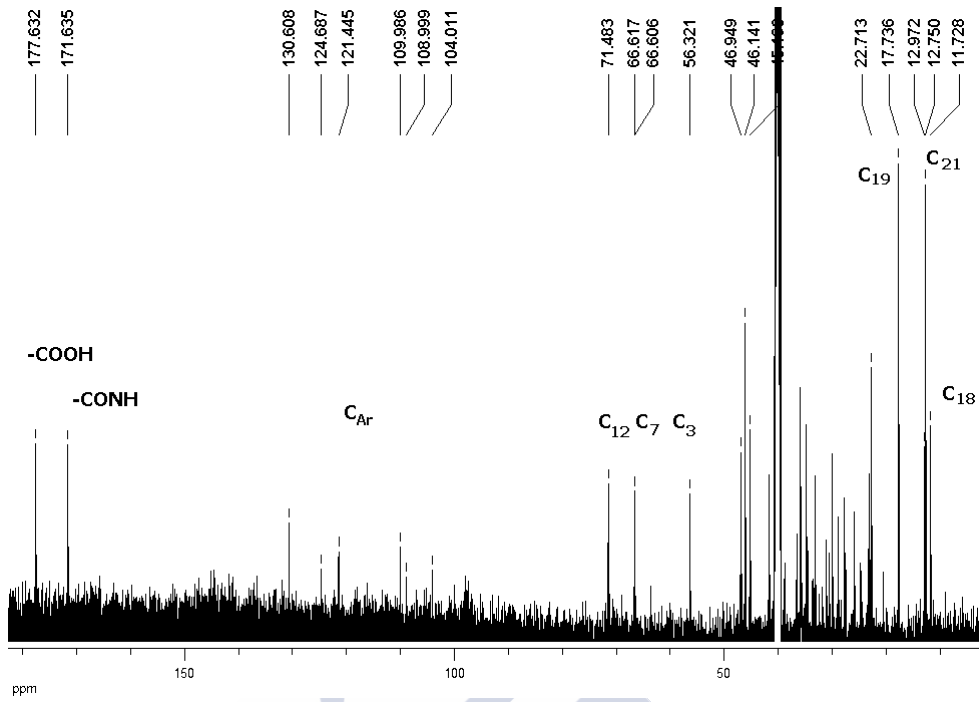


Figura A.11. Espectro de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto *amC₂-protoporfirina*.

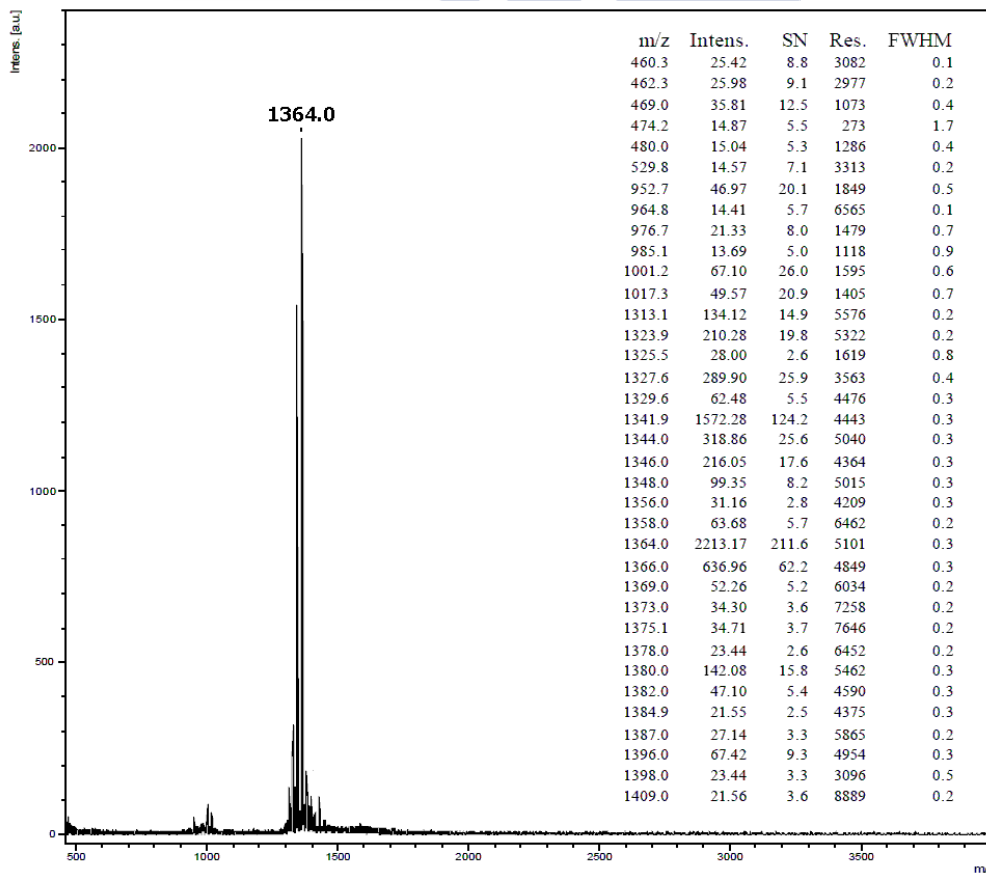


Figura A.12. Espectro de Masas (Maldi-TOF) de la sal del compuesto *amC₂-protoporfirina*.

A.4 SÍNTESIS DEL TRÍMERO C^{24} , amC_2 -AMINOISOFALTICO.

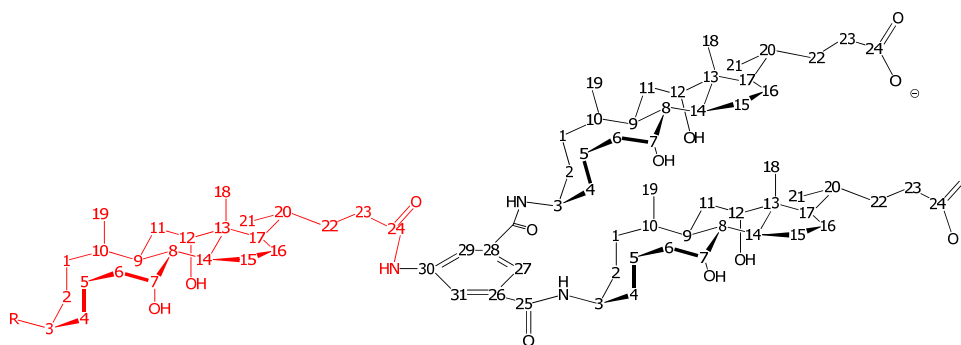


Figura A.13. Numeración de los compuestos C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico ($R = OH$) y amC^{24} , amC_2 -aminoisoftálico ($R = NH_2$).

En un balón de 100 mL de fondo redondo, seco, provisto de pastilla de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 1.43 g (2.5 mmol) del diéster del amC_2 -aminoisoftálico obtenido anteriormente y 2.52 g (6 mmol) de 3- β -aminocolato de metilo 30 en 25 mL de DMF seca. Una vez disuelto el sólido se enfría a 0 °C y se adicionan 1.10 mL (7 mmol) de DEPC y se agita durante 10 minutos. Se adicionan, finalmente, 4 mL (28 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez acabada la reacción, se evapora la DMF a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en 300 mL de acetato de etilo. A continuación se lava con 3 porciones de 50 mL de agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra para purificar por cromatografía de columna con una mezcla de elución 8:2 en acetato de etilo: metanol. El producto precipita, con alta pureza, de una mezcla 1:1 acetato de etilo: metanol. Rendimiento 22%.

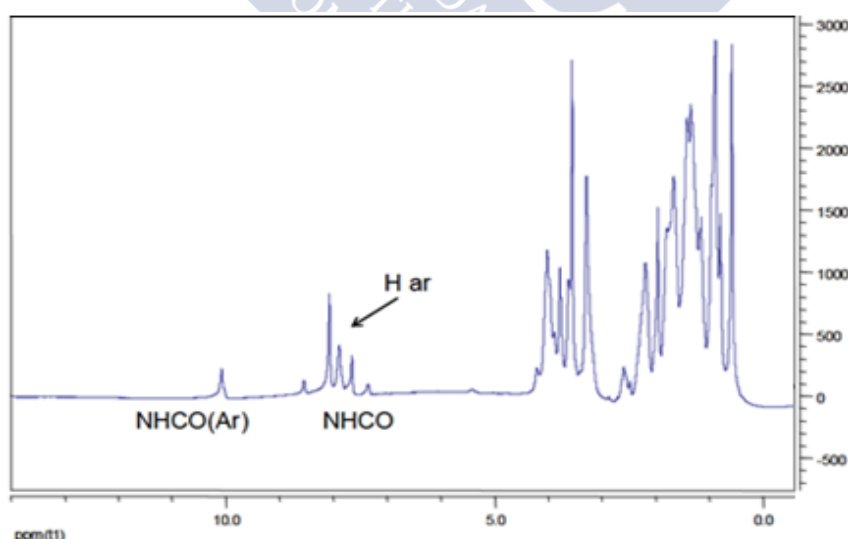


Figura A.14. Espectro de 1H -RMN de la sal del compuesto C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico.

C^{24} , amC_2 -aminoisoftálico: 1H RMN (DMSO- d_6 ; 300 MHz, δ/ppm): 10.15 (O=C-NH); 8.41 y 8.12 (HAr); 4.00-3.50 (m H3, m H12 y m H7); 0.87 (d H21); 0.78 (m H19); 0.60 (s H18). ^{13}C RMN; (DMSO- d_6 ; 750 MHz, δ/ppm): 174.4 (O=C24-O-); 172.7(O=C24-N-); 166.9 (O=C25-NH); 139.9; 136.5; 121.8 y 121.2 (CAr); 71.8 (C12);

67.1 (C7); 71.2 y 46.5 (C3); 23.5 (C19); 17.6; 17.8 (C21); 14.7 y 13.0 (C18). **Masas:** (MALDI-TOF): $M+Na^+$: 1372.7 g/mol; teórico: 1372.83 g/mol.

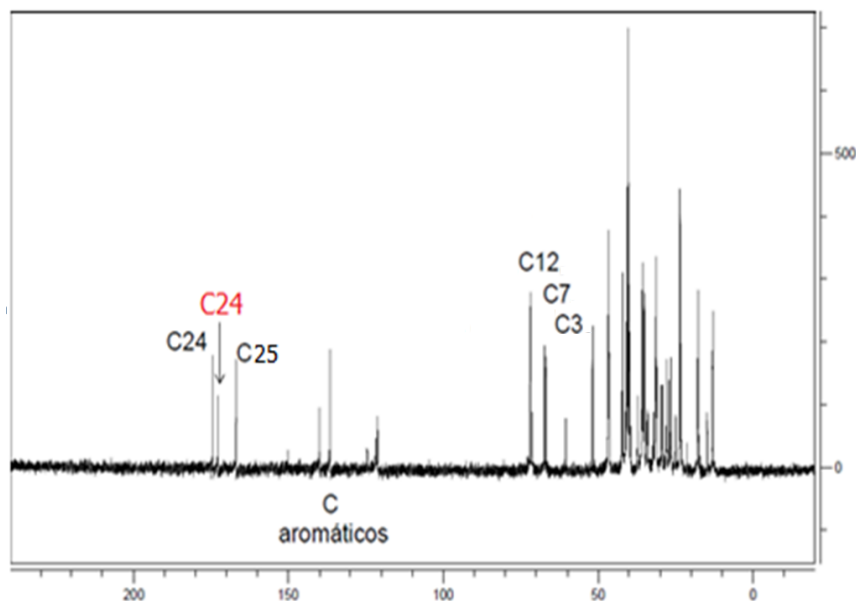


Figura A.15. Espectro de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto C^{24} , amC_2 -aminoisofthalico.

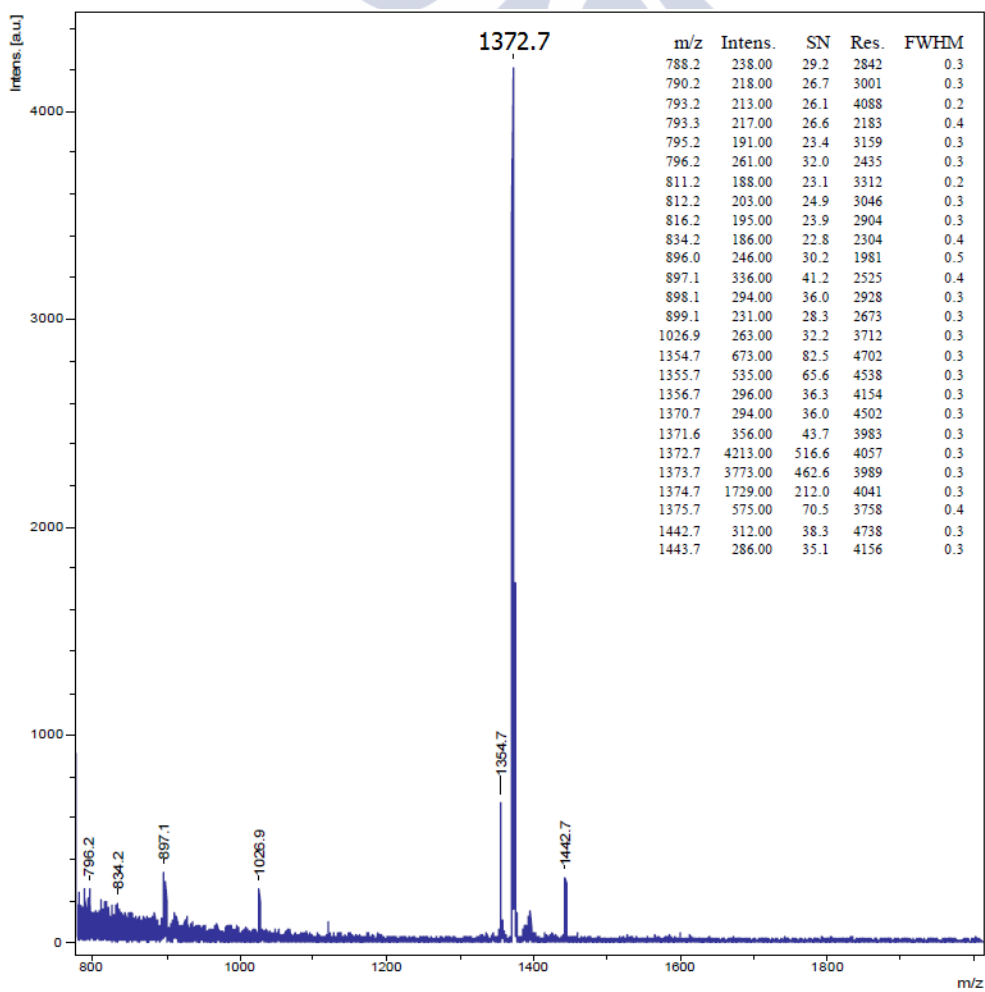


Figura A.16. Espectro de Masas de la sal del compuesto C^{24} , amC_2 -aminoisofthalico.

A.5 SÍNTESIS DEL TRÍMERO amC^{24}, amC_2 -AMINOISOFTÁLICO.

Se disuelven 1.3 g (2.5 mmol) del ácido 3- β -aminocolato protegido (BOC) y 0.6 mL de tri-*n*-butilamina en 15 mL de dioxano. Se enfría a 8 °C y se agregan 0.28 mL (2.6 mmol) de cloroformiato de etilo, agitando durante 15 minutos. Se disuelven 2.5 g (2.5 mmol) del compuesto amC_2 -aminoisofáltico esterificado (con los grupos ácidos protegidos) en 2 mL de dioxano. Se agrega esta disolución a la mezcla fría anterior y se agita durante 20 minutos a esta temperatura. Luego se remueve el baño y se calienta a 60 °C durante 2 horas. Las placas de capa fina se hacen en una mezcla 9:1 metanol:acetato de etilo, como eluyente. Cuando se determina que la reacción ha acabado, se evapora a sequedad y se purifica por columna con la misma mezcla de elución. Rf: 0.33. Rendimiento: 91%. El producto se hidrolizó para obtenerlo en su forma ácida de la manera anteriormente descrita y no se purificó para los siguientes pasos de la secuencia. El BOC se elimina disolviendo 2 g del producto anterior en 50 mL de metanol y se burbujea HCl gaseoso durante 30 minutos en un baño de hielo. Posteriormente, se evapora el disolvente y se agregan 100 mL de agua. Se neutraliza, en baño de hielo, con una disolución 1 M de sosa hasta pH neutro, se filtra y se lava con abundante agua. Se seca en estufa de vacío y se separa en una columna cromatográfica, primero con una mezcla eluyente 1:1 metanol:acetato de etilo y, posteriormente, en una 95:5 metanol:TEA. Rendimiento global 24%.

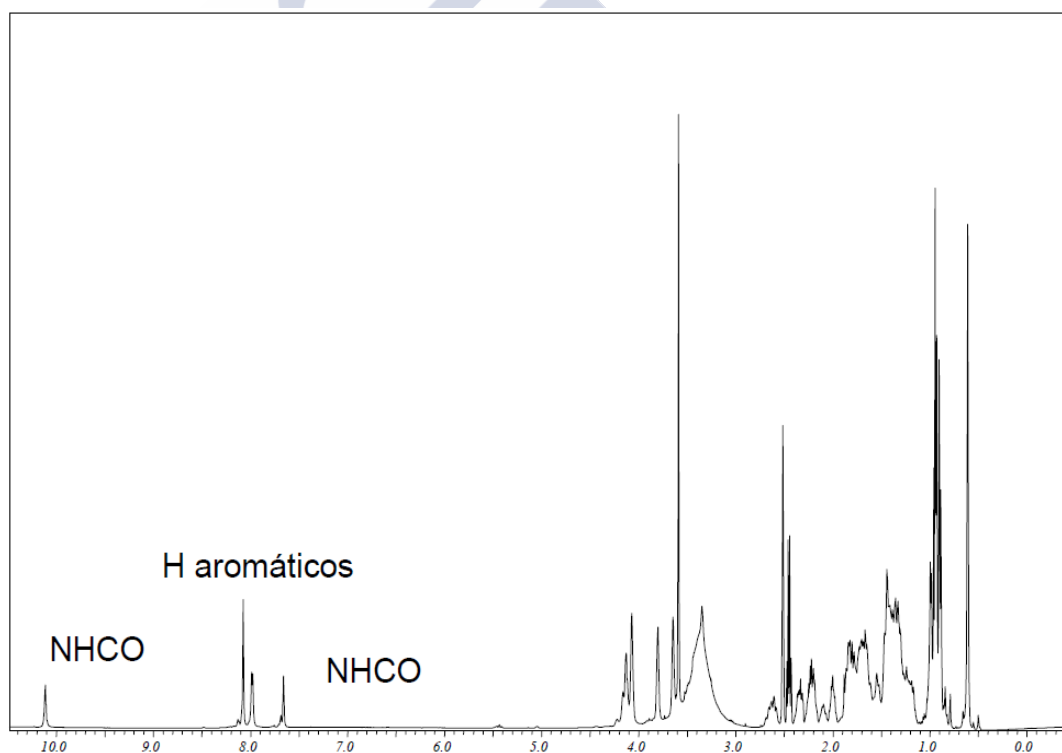


Figura A.17. Espectro 1H -RMN de la sal del compuesto amC^{24}, amC_2 -aminoisofáltico.

amC^{24}, amC_2 -aminoisofáltico: **1H RMN (DMSO- d_6 ; 300 MHz, δ /ppm):** 10.11 (O=C-NH); 8.07; 7.97; 7.66 (HAr); 4.20-3.00 (m H3, m H12y m H7); 0.87 (d H21); 0.78 (m H19); 0.60 (s H18). **^{13}C RMN (DMSO- d_6 ; 75 MHz, δ /ppm):** 174.2 (O=C24-O-); 172.4(O=C24-N-); 166.6 (O=C25-N-); 139.5 y 136.2; (CAr); 71.4 (C12); 66.7 (C7); 23.2 (C19); 17.3 (C21); 12.0 (C18). **Masas: (MALDI-TOF):** M+Na+: 1371.8 g/mol; teórico: 1371.8 g/mol. M+K+: 1387.83 g/mol; teórico: 1387.95 g/mol.

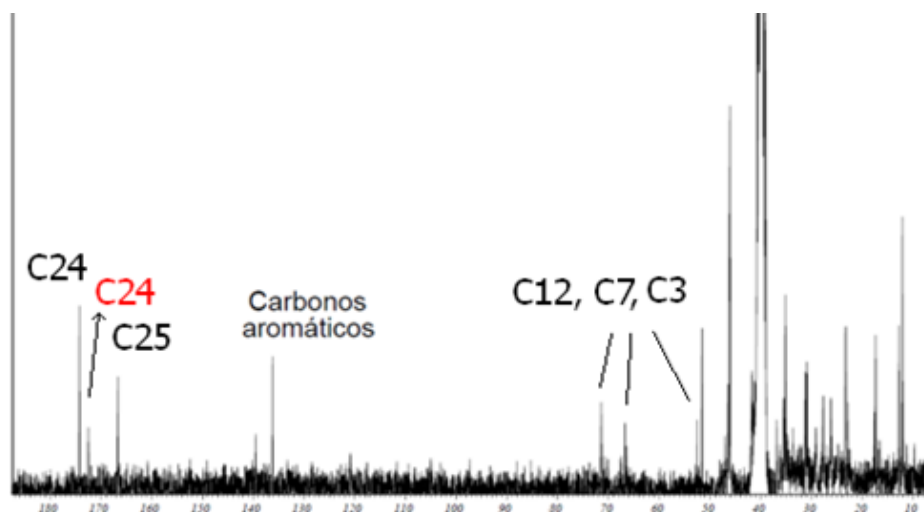


Figura A.18. Espectros de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto amC^{24} , amC_2 -aminoisofthalico.

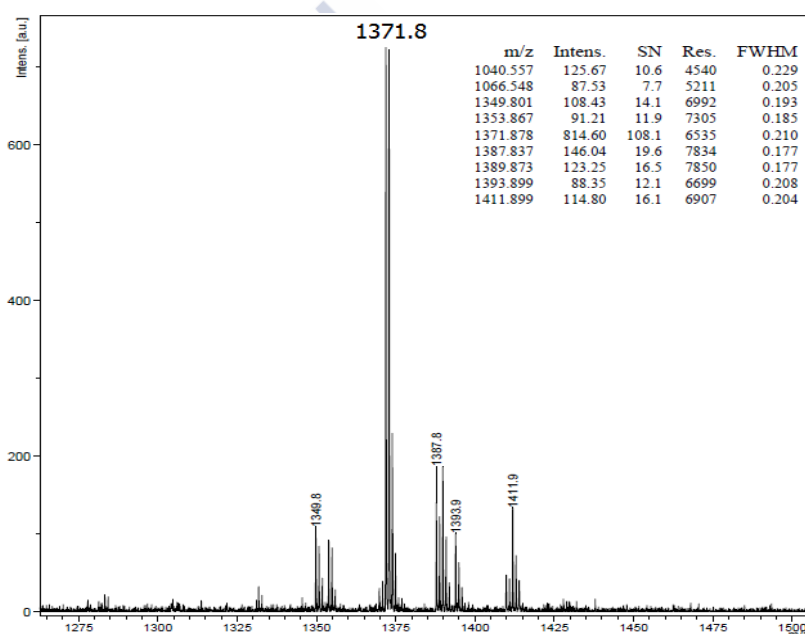


Figura A.19. Espectro de Masas de la sal del compuesto amC^{24} , amC_2 -aminoisofthalico.

A.6 SÍNTESIS DEL TETRÁMERO (amC_2 -AMINOISOFTÁLICO) $_2$ -TEREFTÁLICO.

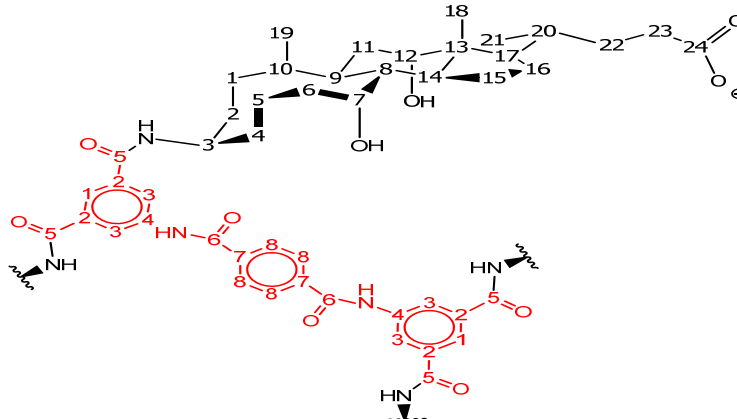


Figura A.20. Numeración de carbonos no equivalentes del compuesto $(\text{amC}_2\text{-aminoisofthalico})_2\text{-tereftalico}$.

En un balón de 100 mL de fondo redondo, seco, provisto de pastilla de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 1.43 g (2.5 mmol) del tetra-ácido y 2.52 g (6 mmol) de 3-β-aminocolato de metilo en 25 mL de DMF seca. Una vez disuelto el sólido se enfría a 0 °C y se adicionan 1.10 mL (7 mmol) de DEPC y se agita durante 10 minutos. Se adicionan, finalmente, 4 mL (28 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez acabada la reacción, se precipita el crudo de reacción dispersándolo gota a gota en 300 mL agua. A continuación se lava abundantemente y se seca a presión reducida. Para purificar por cromatografía de columna primero se usa una mezcla de elución 8:2 en acetato de etilo: metanol para extraer los productos no deseados. Seguidamente se cambia de mezcla de elución ácida formada por una disolución 4:0.5:0.5:2.2 de diclorometano:acetato de etilo: ácido acético:metanol seguido de una fase móvil de metanol para la extracción del producto. Se evaporan a presión reducida los disolventes más volátiles y el producto se precipita añadiendo agua. El filtrado se lava con abundante agua y se seca en una estufa a vacío.

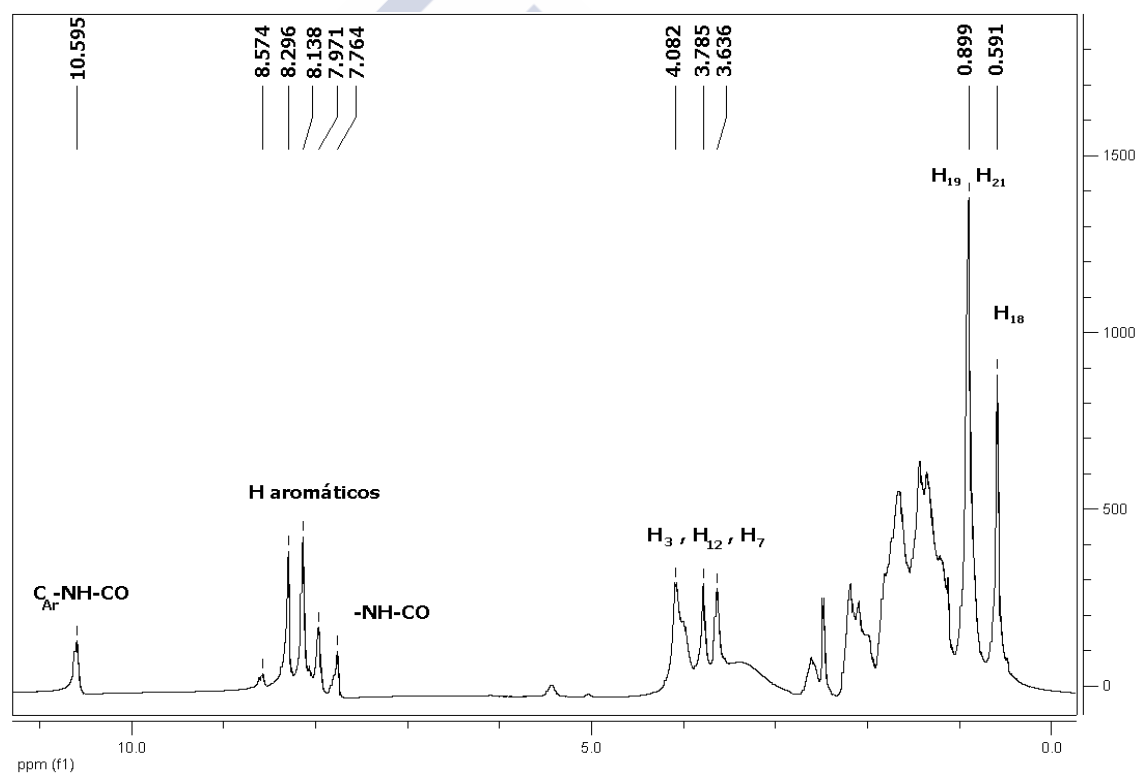


Figura A.21. Espectro de ^1H -RMN de la sal del compuesto $(\text{amC}_2\text{-aminoisofthalico})_2\text{-tereftalico}$.

$(\text{amC}_2\text{-aminoisofthalico})_2\text{-tereftalico}$: ^1H RMN (DMSO- d_6 ; 300 MHz, δ/ppm): 10.59 (O=C-NH); 8.29-7.97 (HAr); 4.08-3.78-3.63 (m H3, m H12 y m H7); 0.89 (m H19 y H 21); 0.59 (s H18). ^{13}C RMN; (DMSO- d_6 ; 750 MHz, δ/ppm): 175.41 (O=C24-O-); 166.64(O=C5-N-); 165.37 (O=C6-NH); 139.19; 137.63; 136.27; 136.23; 128.27 y 122.32 (CAr); 71.53 (C12); 66.79 (C7); 46.57 (C3); 23.33 (C19); 17.41 (C21); 12.78 (C18). Masas: (MALDI-TOF): $\text{M}+\text{Na}^+$: 2073.3 g/mol; teórico: 2072.66 g/mol.

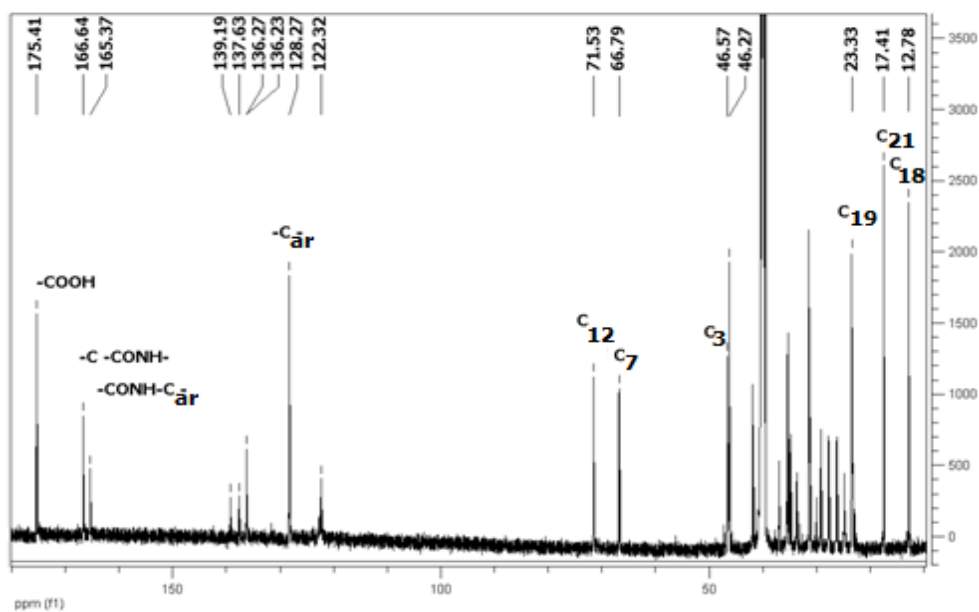


Figura A.22. Espectros de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto $(\text{amC}_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$.

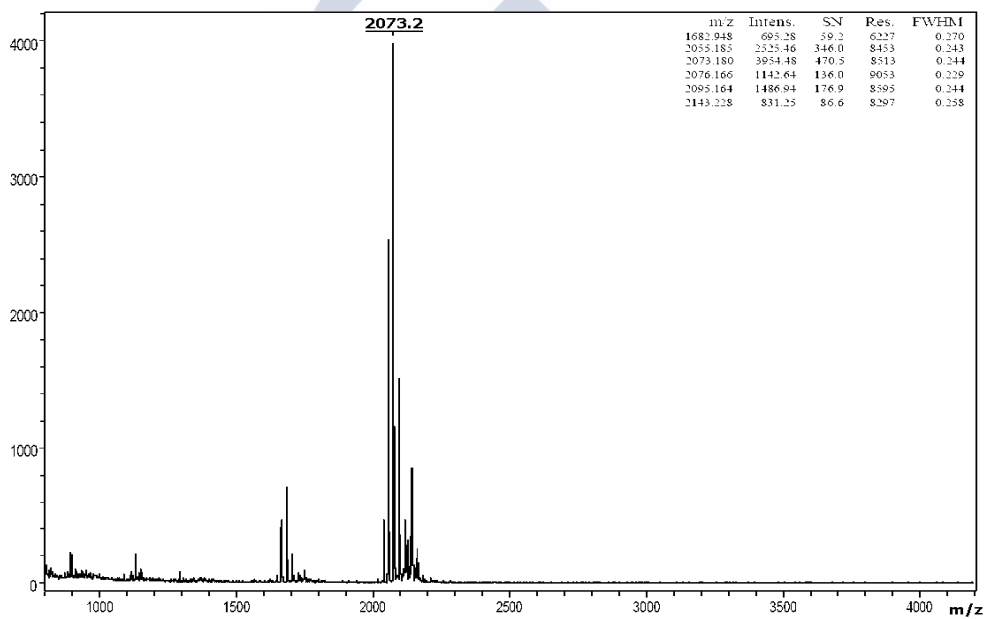


Figura A.23. Espectro de Masas de la sal del compuesto $(\text{amC}_2\text{-aminoisoftálico})_2\text{-tereftálico}$.

A.7 SÍNTESIS DEL TETRÁMERO $\text{amC}_4\text{-TPPORFIRINA}$.

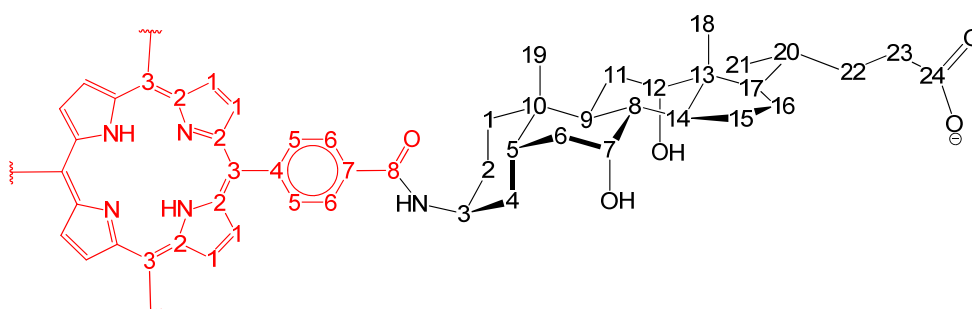


Figura A.24. Numeración de carbonos no equivalentes considerando la aromaticidad del esqueleto de la porfirina del compuesto $\text{amC}_4\text{-TPPporfirina}$.

En un balón de 100 mL de fondo redondo, seco, provisto de pastilla de agitación y atmósfera de argón, se dispersan 0.36 g (4.4 mmol) de meso-Tetra(4-carboxifenil)porfirina y 0.8 g (6 mmol) de 3-β-aminocolato de metilo en 20 mL de DMF seca. Una vez disuelto el sólido se enfría a 0 °C y se adicionan 1.1 mL (7 mmol) de DEPC y se agita durante 10 minutos. Se adicionan, finalmente, 2 mL (14 mmol) de TEA, gota a gota. El baño se deja durante 45 minutos y se remueve para dejar agitando la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez acabada la reacción, se precipita el crudo de reacción dispersándolo gota a gota en 300 mL agua. A continuación se lava abundantemente y se seca a presión reducida. Para purificar por cromatografía de columna primero se usa una mezcla de elución 8:2 en acetato de etilo: metanol para extraer los productos no deseados. Seguidamente se cambia de mezcla de elución ácida formada por una disolución 4:0.5:0.5:2.2 de diclorometano:acetato de etilo: ácido acético:metanol seguido de una fase móvil de metanol para la extracción del producto. Se evaporan a presión reducida los disolventes más volátiles y el producto se precipita añadiendo agua. El filtrado se lava con abundante agua y se seca en una estufa a vacío.

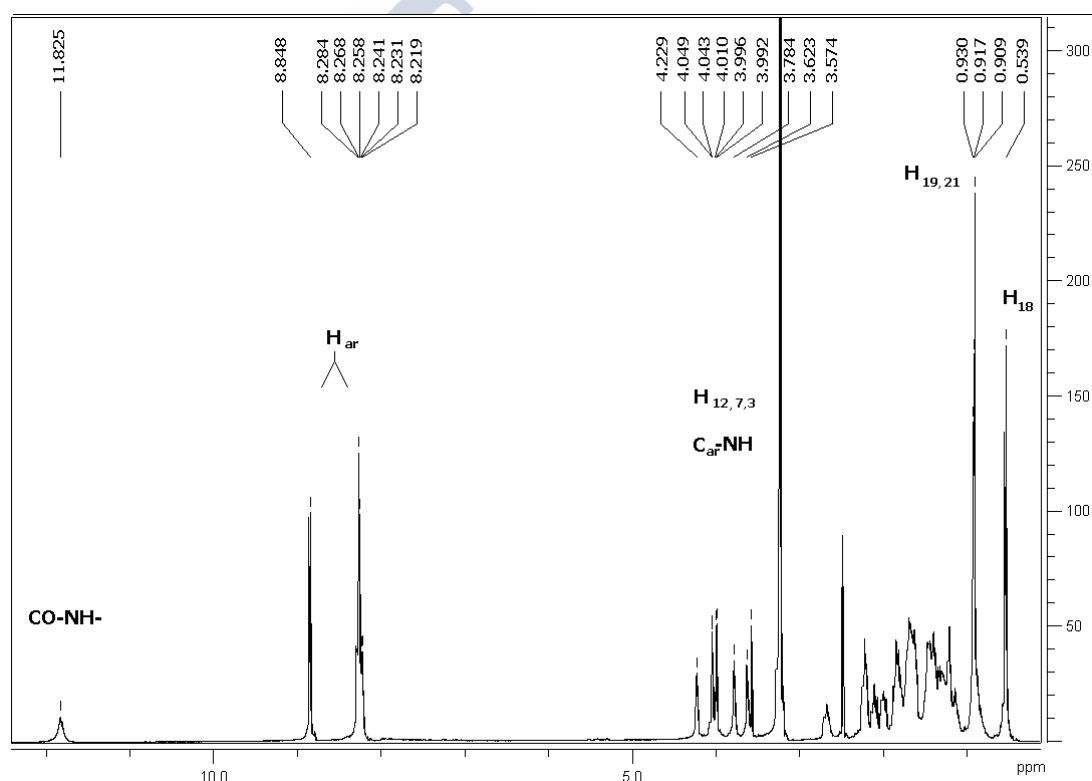


Figura A.25. Espectro de ^1H -RMN de la sal del compuesto *amC₄-TPPorfirina*.

amC₄-TPPorfirina: ^1H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 11.82 (O=C-NH); 8.87-8.21 (H_{Ar}); 4.22-3.57 (m H3, m H12, m H7 y HN- C_{Ar}); 0.90 (m H19 y H 21); 0.53 (s H18). ^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 750 MHz, δ /ppm): 175.30 (-C24OOH); 166.85 (O=C-NH); 143.98; 135.42; 134.29; 126.69; 126.67 y 122.00 (C_{Ar}); 71.59 (C12); 66.87 (C7); 46.62 (C3); 23.20 (C19); 17.45 (C21); 12.74 (C18). Masas: (MALDI-TOF): M: 2348.5 g/mol; teórico: 2349.66 g/mol.

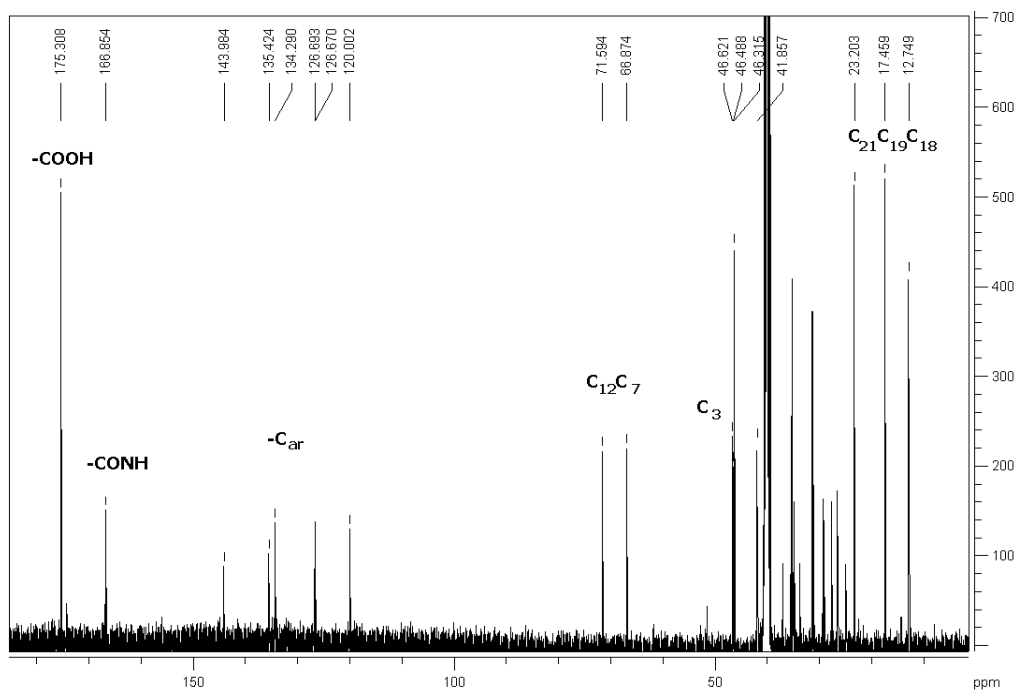


Figura A.26. Espectros de ^{13}C -RMN de la sal del compuesto amC_4 -TPPorphirina.

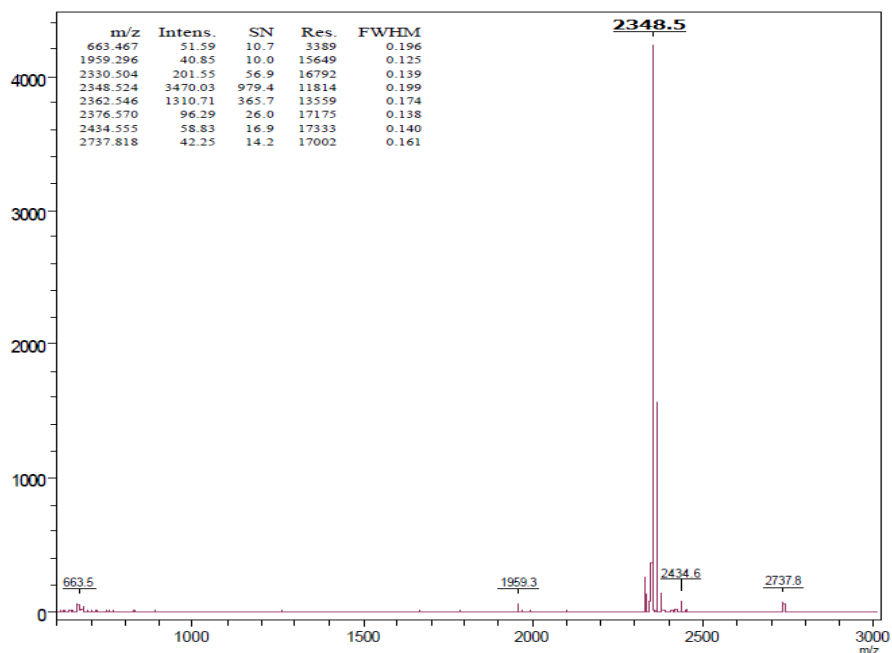


Figura A.27. Espectro de Masas de la sal del compuesto amC_4 -TPPorphirina.

Bibliografía

- (1) Victor Hugo Soto Tellini, *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares*, Tesis Doctoral, USC, 2006.
- (2) Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Uggeri, F. *Synth. Commun.* **1998**, 28, 109

APENDICE B

TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

En la realización de la presente Tesis Doctoral se han empleado diversas técnicas instrumentales que han permitido la caracterización de los nuevos productos obtenidos desde diferentes ángulos (estructurales, termodinámicos, supramoleculares). En los casos en los que las medidas han sido realizadas por el autor se hará una breve revisión de las técnicas en cuestión. Su utilización o fundamentos teóricos ya están perfectamente descritos en la bibliografía científica y docente por lo que se facilitaran referencias para una profundización más minuciosa en cada campo. En todas aquellas medidas realizadas por servicios técnicos generales (fundamentalmente, RIAIDT de la USC) al alcance, se ha preferido dar datos técnicos de los aparatos empleados y un breve listado de referencias, en lugar de hacer un resumen de los fundamentos teóricos de las técnicas dado que esto no conlleva ninguna novedad. Solo en el caso de la espectrometría de masas y en microscopia de fuerza atómica (medidas no realizadas por el autor) se hará una excepción.

B.1 TENSIÓN SUPERFICIAL.

B.1.1 Introducción.

Ya se ha mencionado el hecho de que los surfactantes presentan, como principal característica, la capacidad de modificar la actividad superficial de un sistema. La tensión superficial, propiedad termodinámica de los sistemas de un componente fluido separados por una fase, se define como el trabajo que debe realizar el sistema, líquido-líquido o líquido-gas, para aumentar en una unidad el área de separación de los dos fluidos.

En el estudio realizado en este proyecto tiene lugar un fenómeno de adsorción líquido-gas debido a la presencia de moléculas de surfactante (sal biliar) en la superficie de la fase acuosa, el cual modifica la tensión superficial del sistema. El estudio de esta variación nos proporcionará información importante sobre el estado termodinámico de la disolución y sus componentes.

La adsorción superficial se define como la concentración preferente de una especie en la interfase existente entre dos fases en contacto. Esta adsorción puede ser química (existe una interacción química con transferencia electrónica entre adsorbente y sustrato) o física (se genera por fuerzas intermoleculares tipo van der Waals).

En cada uno de estos casos, el proceso podrá ser descrito mediante un modelo termodinámico que conduce a la obtención de ecuaciones matemáticas (isotermas de adsorción) que analizaremos en este apartado.

Tensión Superficial de Equilibrio.

La adsorción es un fenómeno dinámico y como tal evoluciona con el tiempo. Así, se pueden realizar dos tipos de estudios de la tensión superficial, Estudio dinámico de la tensión superficial (DST) y Estudio de la tensión superficial de equilibrio (EST).

Se abordará el análisis del método EST ya que se han estudiado sistemas en equilibrio. En la bibliografía están descritos métodos asequibles para la medida de la

tensión superficial de equilibrio.¹ Ésta, se obtiene básicamente por medio del control del comportamiento de la tensión dinámica de una disolución, esperando a que alcance un valor constante.

Las curvas típicas de tensión superficial DST pueden dividirse en cuatro etapas:²

- Región de inducción
- Región de caída rápida
- Región de meso-equilibrio
- Región de equilibrio

Estos resultados no han sido todavía relacionados en modelos de transferencia de masa entre interfase y el seno de la disolución pero podemos observar claramente que la tensión superficial es independiente del tiempo y que el sistema tarda en alcanzar un estado de equilibrio. Este tiempo dependerá de las características del sistema objeto de estudio.

En algunas ocasiones, los surfactantes pueden estar contaminados debido a la presencia en disolución de otros compuestos. Si estas impurezas son muy activas superficialmente, puede distorsionar el estudio realizado, aun cuando estén presentes en cantidades mínimas. Por otro lado, la presencia (incluso masiva) de impurezas de escasa actividad superficial no es tan decisiva. El trabajo más importante sobre el efecto de las impurezas en la tensión superficial fue llevado a cabo por Mysels *et al.*,³ los cuales desarrollaron criterios y procedimientos de purificación ciertos y seguros para un variado grupo de surfactantes. La tensión superficial de equilibrio decrece de forma continua al aumentar la concentración del surfactante permaneciendo prácticamente constante por encima de la *cmc*. La presencia de un mínimo en la curva tensión superficial-concentración es indicativa de la existencia de impurezas superficiales activas. Sin embargo la ausencia de este mínimo no asegura que el surfactante se encuentre puro.³⁻⁴

Una representación típica de la tensión superficial *vs* el logaritmo neperiano de la concentración (γ *vs* $\ln c$) para una disolución diluida de un surfactante se muestra en la *Figura B.01*. Un cambio brusco en la pendiente de la curva es indicativo de que se ha alcanzado 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.

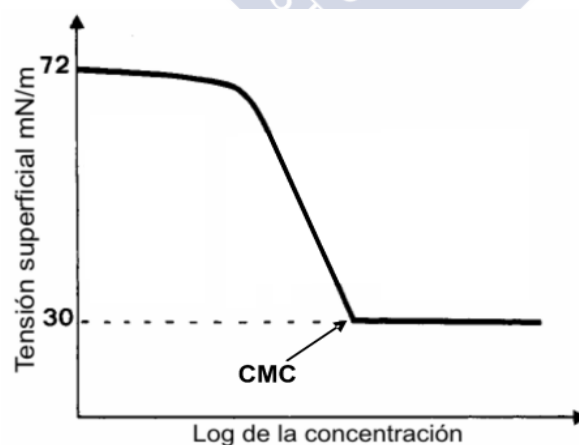


Figura B.01. Representación de la tensión superficial frente al logaritmo de la concentración en la fase acuosa para una disolución de surfactante.

Por encima de la *cmc*, comienza la formación de agregados que, para la mayoría de los sistemas, no presentan actividad superficial. 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*.

B.1.2 Isotermas de Adsorción y Ecuaciones Superficiales de Estado.

Los modelos termodinámicos que se utilizan para describir el proceso de la adsorción de un surfactante en una interfase, son variados y dependen de diversos factores.¹ Entre ellos, el principal es el hecho de que la adsorción puede ser de tipo físico o bien de tipo químico. En cada uno de estos modelos se obtiene una ecuación denominada *isoterma de adsorción*, que será más compleja y contendrá mayor número de parámetros cuanto más se separe el sistema del comportamiento ideal. A continuación se analizan algunas de las isotermas de uso más frecuente.

B.1.2.1 La ecuación de adsorción de Gibbs.⁵

La ecuación termodinámica que describe el proceso de la actividad superficial es la ecuación de adsorción de Gibbs y relaciona la variación en la tensión superficial de equilibrio con la variación del potencial químico de todos los solutos a temperatura constante:

$$d\gamma = -\sum_{i=1}^{n-1} \bar{\Gamma}_i^{(disolvente)} d\mu_i \quad [\text{B.01}]$$

Para concentraciones de surfactante menores que la *cmc*, se define el parámetro característico de la adsorción $\bar{\Gamma}$, denominado concentración superficial en la interfase o superficie en exceso, y $\bar{\Gamma}_i^{(disolvente)}$ es la densidad de superficie en exceso algebraica de cada componente (i) con respecto al disolvente. Teniendo en cuenta que $\bar{\Gamma}_{disolvente}^{(disolvente)} = 0$, la superficie en exceso de cada especie *i* se puede calcular independientemente. Para una disolución ideal, el potencial químico se expresa como:

$$\mu_i = \mu_i^0 + \mathfrak{R}T \ln c_i \quad [\text{B.02}]$$

Donde μ_i^0 es el potencial químico estándar, \mathfrak{R} es la constante de los gases ideales, *T* la temperatura absoluta y c_i es la concentración molar. La sustitución de las ecuaciones anteriores relaciona la variación de la tensión superficial con la concentración en una disolución ideal como una función de las densidades de superficie en exceso:

$$d\gamma = -\mathfrak{R}T \sum_{i=1}^{n-1} \bar{\Gamma}_i d \ln c_i \quad [\text{B.03}]$$

Para disoluciones diluidas de moléculas muy activas superficialmente, la densidad de superficie en exceso es casi idéntica a la densidad de superficie adsorbida. Esto se cumple para surfactantes no iónicos, mientras que para los iónicos no tanto. En principio la ecuación B.15 permite calcular la superficie en exceso o densidad superficial de cada componente a partir de datos de tensión superficial frente a la concentración.

Cuando se aplican estas ecuaciones a surfactantes iónicos fuertes, de ν_+ iones libres positivos y ν_- iones libres negativos de carga z_+ y z_- respectivamente, se considera que la disociación en el seno de la disolución es completa aunque no necesariamente en la superficie o en las micelas. Es aquí donde el pH de trabajo juega un papel importante en la completa ionización del compuesto. Si se parte de:



R^- es el surfactante ionizado y X^- el anión del electrolito inerte añadido. El superíndice S indica la procedencia de la sal inerte añadida. Para simplificar se suele trabajar con el mismo contraión M^+ en la sal inorgánica y el surfactante iónico como por ejemplo Na^+ . La presencia de cationes de distinta naturaleza y carga complica los cálculos al tener que introducir más factores en la ecuación de Gibbs. Si aplicamos la ecuación B.03 a todas las especies en disolución (B.04) se obtiene que:

$$d\gamma = -\mathcal{R}T(\bar{\Gamma}_{M^+} d \ln c_{M^+} + \bar{\Gamma}_{R^-} d \ln c_{R^-} + \bar{\Gamma}_{X^-} d \ln c_{X^-}) \quad [B.05]$$

Si se tiene en cuenta que las concentraciones de iones no son independientes y se considera el principio de electroneutralidad, esto se traduce en que:

$$\begin{aligned} C_{R^-} &= \nu_- C & \Gamma_{R^-} &= \nu_- \Gamma \\ C_{X^-} &= \nu_-^S C_S & \Gamma_{X^-} &= \nu_-^S \Gamma_S & C_{M^+} &= \nu_+ C + \nu_+^S C^S \end{aligned} \quad [B.06]$$

Combinando las ecuaciones B.06 con B.05 se llega a:

$$d\gamma = -\mathcal{R}T\{\bar{\Gamma} d \ln [c^{\nu_-} (\nu_+ C + \nu_+^S C_S)^{\nu_+}] + \bar{\Gamma}_S d \ln [c_S^{\nu_-^S} (\nu_+ C + \nu_+^S C_S)^{\nu_+^S}]\} \quad [B.07]$$

Está demostrado que $\bar{\Gamma}_S \approx 0$ lo que hace reduce la ecuación anterior a un único término.⁵ Teniendo esto en cuenta, al desarrollar la ecuación B.07 y se despejar la superficie en exceso del surfactante se obtiene que:

$$\bar{\Gamma} = \frac{-1}{nRT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C} \right)_{C_S} \quad n = \left(\nu_- + \frac{\nu_+^2}{\nu_+ + \nu_+^S \frac{C_S}{C}} \right) \quad [B.08]$$

El factor n es una función que depende por un lado del número de especies que constituyen el surfactante y que se adsorben en la interfase, y por el otro, de la fuerza iónica total del medio. Únicamente la valencia del co-ión ν_-^S (el anión de la sal inorgánica) no interviene en esta función. En ausencia de electrolito inorgánico, $n = (\nu_+ + \nu_-)$ y la densidad de superficie en exceso es inversamente proporcional al número total de iones libres en disolución. Por otro lado, cuando la concentración del electrolito inorgánico es alta, el término que contiene ν_+ se convierte en despreciable, y la superficie en exceso es inversamente proporcional únicamente al número de iones del surfactante (ν_-).

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 \AA^2 , se calcula a partir de la concentración de exceso superficial de la relación

$$a^s = \frac{10^{20}}{N_A \Gamma} \quad [\text{B.09}]$$

donde N_A es el número de Avogadro, Γ en mol/cm^2 y 10^{20} un factor de conversión de unidades.

Para completar este apartado se mencionara que 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:

B.1.2.2 Isoterma de Henry.

Para sistemas de un solo componente la isoterma más simple es la Isoterma de Henry (o ley de isoterma de Henry):

$$\Gamma = K_H \cdot C \quad [\text{B.10}]$$

La constante de adsorción de equilibrio K_H , es un parámetro importante, ya que es una medida de la actividad superficial del surfactante, y también representa el espesor de la interfase. Esta constante tiene dimensiones de longitud.

Para muchos sistemas, la isoterma de Henry resulta demasiado simple y falla al describir el comportamiento de sistemas no ideales.

B.1.2.3 Isoterma de Langmuir.

La isoterma no lineal más usada comúnmente, es la isoterma de Langmuir:

$$\Gamma = \Gamma_m \frac{K_L c}{1 + K_L c} \quad [\text{B.11}]$$

donde Γ_m es la concentración superficial máxima y K_L es la constante de equilibrio de adsorción de Langmuir. El parámetro Γ_m es un límite teórico, que no puede medirse experimentalmente porque para observarlo se necesitaría trabajar a concentraciones excesivamente elevadas a las que, o bien se alcanza la *cmc*, o bien 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 reduce a la isoterma de Henry donde $K_H = K_L \Gamma_m$. El término $1/K_L$ (concentración por debajo de la cual se hace esta aproximación) proporciona una medida útil de la actividad del surfactante.

La ecuación anterior fue, históricamente hablando, la primera que se dedujo teniendo en cuenta argumentos cinéticos, pero puede también ser obtenida basándose en la termodinámica de sistemas de equilibrio.

B.1.2.4 Isoterma de Frumkin.

Esta isoterma considera las interacciones soluto-disolvente en una superficie no ideal. Esta isoterma sigue en complejidad a la de Langmuir y es, en general, apropiada para tensioactivos no iónicos:

$$c = \frac{1}{K_F} \frac{\Gamma}{\Gamma_m - \Gamma} \exp\left(-A \frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right) \quad [\text{B.12}]$$

K_F es la constante de adsorción de equilibrio de Frumkin y el parámetro A es una medida de la no idealidad de mezclas en la capa interfacial. Cuando A tiende a 0, la superficie se considera con comportamiento ideal, y la isoterma de Frumkin se reduce a la isoterma de Langmuir.

B.1.2.5 Ecuaciones de Estado.

Las ecuaciones de estado de los sistemas que presentan actividad superficial, se obtienen mediante la combinación de la ecuación de Gibbs (ecuación [B.01]) para una disolución ideal en la que no hay agregación con las diferentes isotermas de adsorción mencionadas anteriormente. Las ecuaciones resultantes en las que $\Pi = \gamma - \gamma_0$ (γ_0 = la tensión superficial del disolvente puro) se exponen a continuación:¹

- Ecuación de estado superficial para la isoterma de Henry:

$$\Pi = nRTK_H C = nRT\Gamma \quad [\text{B.13}]$$

-Ecuaciones de estado superficial para la isoterma de Langmuir:

a) Ecuación de estado de Szyszkowski.

$$\Pi = nRT\Gamma_m \ln(1 + K_L c) \quad [\text{B.14}]$$

b) Ecuación de estado de Frumkin.

$$\Pi = -nRT\Gamma_m \ln\left(1 - \frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right) \quad [\text{B.15}]$$

- Ecuaciones de estado superficial para la isoterma de Frumkin:

$$\Pi = -\frac{1}{2}nRTA\Gamma_m \left(\frac{\Gamma}{\Gamma_m}\right)^2 \quad [\text{B.16}]$$

De todas ellas, las ecuaciones de estado superficial para la isoterma de Langmuir son las más comunes. Los parámetros Γ_m y K_L , que aparecen en la ecuación de Szyszkowski, se han determinado para muchos surfactantes. En la tabla B.01 se recogen algunos valores relevantes, entre los que se encuentran algunas sales biliares, determinados por varios autores.¹

B.1.3 Medida de la tensión superficial.

Existen diferentes métodos que se pueden utilizar para la determinación experimental de la tensión superficial. Las diferentes técnicas que aparecen en la bibliografía pueden ser englobadas dentro de tres grupos: métodos de fuerza, métodos de presión y métodos de gota o burbuja. El método más adecuado para cada ocasión depende de si se pretende medir la tensión superficial de equilibrio (EST), o la evolución de la tensión superficial con el tiempo (DST) ya que en algunos métodos la medida no es instantánea, por lo que no resultan adecuados para el seguimiento de la tensión superficial en periodos cortos de tiempo. Otra consideración a tener en cuenta es si se realizan medidas dinámicas a tiempos bajos, es el estado de movimiento de la subfase del fluido debido a que se necesita conocer si se transportan grandes cantidades de masa sólo por difusión o también por convección.

Tabla B.01.

Parámetros característicos de la ecuación de estado de Szyszkowski para varias disoluciones acuosas de algunos surfactantes comunes.¹ a: Temperatura ambiente.

Surfactante	Temperatura (°C)	$\Gamma_m \cdot 10^6$ (mol/m ²)	K_L (m ³ /mol)
n-propanol	a	7.1	5.5×10^{-3}
n-butanol	a	6.0	2.1×10^{-2}
n-pentanol	a	7.0	6.0×10^{-2}
n-hexanol	a	6.0	2.7×10^{-1}
n-heptanol	a	9.4	3.5×10^{-1}
n-octanol	a	7.5	2.5
1,2-octanoldiol	22	2.9	5.6×10^{-1}
1,8-octanodiol	22	2.5	2.9×10^{-1}
1,9-nonanodiol	a	2.7	1.3
1,10-decanoldiol	22	2.5	3.6
Acido adípico	22	2.2	2.7×10^{-2}
Acido pimélico	22	2.5	7.1×10^{-2}
Acido dicarboxílico	a	2.7	1.0
Acido dodecanodioico	22	2.4	2.6×10^1
Dodecanodiato sódico	22	2.5	4.0×10^1
Colato sódico	22	1.8	2.0×10^1
Desoxicolato sódico	22	2.2	6.3×10^1
Litolato sódico	22	2.1	3.7×10^2
Dodecilsulfato sódico	25	10	1.1×10^{-1}
Laurato sódico	22	4.0	3.4
Miristato sódico	22	4.1	3.4×10^1
Decanoato sódico	22	3.0	2.6×10^{-1}

B.1.3.1 Métodos de Fuerza.

Los métodos de fuerza se basan en las fuerzas de adherencia, que están íntimamente ligadas al fenómeno de la tensión superficial. Para la realización de las medidas presentadas en este trabajo se ha empleado un tensiómetro digital K10TS (KRÜSS) (<http://www.kruss.info/>). El equipo que está formado una pieza, generalmente metálica, que cuelga de una balanza digital de precisión que contiene un mecanismo de bajada y subida (*Figura B.02*). Al poner en contacto con la superficie de la disolución con esta pieza metálica, generalmente de platino, 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 y de la forma de la pieza metálica introducida en la disolución. Por otro lado la toma de las medidas debe hacerse a temperatura constante (este parámetro influye notablemente sobre la tensión superficial) por lo que el equipo requiere un sistema de termostatación.

Generalmente se utilizan dos diseños experimentales, el plato de *Wilhelmy* y el anillo de *Du Noüy*. Se centrará la atención sobre el primero, dado que es el empleado para la obtención de las medidas, ya que el anillo de *Du Noüy* es más adecuado para el estudio de interfases líquido-líquido en lugar de líquido-gas. Además, se ha estimado que este último diseño introduce errores sistemáticos cercanos al 30% en la medida de la tensión superficial.⁶

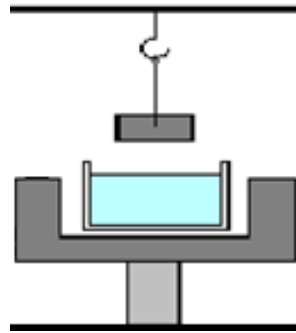


Figura B.02. Esquema de un tensiómetro de fuerza.

B.1.3.2 El plato de Wilhelmy.

La medición de la tensión superficial de una disolución mediante este método, está basado en el establecimiento de un equilibrio de fuerzas que se ejerce sobre una lámina metálica rectangular que se encuentra en contacto con la superficie de la disolución. El proceso de medida se basa en que cuando el plato toca la superficie de la disolución se establece una fuerza tangencial al mismo por parte de las moléculas que forman esta superficie y 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. La electrobalanza de precisión ejerce una fuerza tangencial en sentido contrario realizando la medida de la tensión superficial cuando ambas fuerzas se equilibran (*Figura B.03*):

$$F = \gamma \cdot P \cdot \cos \theta_r \quad [B.17]$$

Conociendo exactamente las dimensiones del plato y asumiendo un ángulo de contacto próximo a cero ($\cos\theta \approx 1$), la tensión superficial del sistema se obtiene directamente.

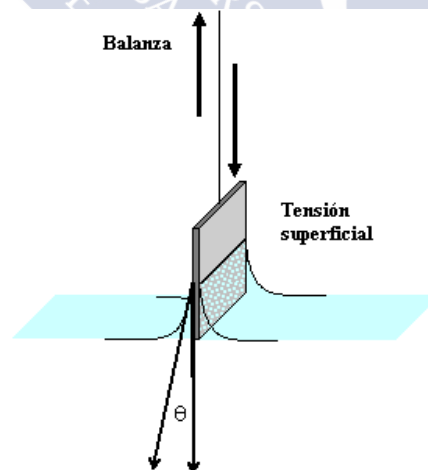


Figura B.03. Esquema del plato de Wilhelmy tocando una superficie.

Este método proporciona resultados seguros siempre que el plato se mantenga equilibrado en el momento de la realización de la medida (con el equipo perfectamente nivelado ese ángulo es de 90°) y si la fuerza se mide de forma continua con una balanza eléctrica lo suficientemente sensible. El método es válido tanto para medidas dinámicas como estáticas de la tensión superficial, y tiene la ventaja de dar directamente la medida de la tensión superficial sin necesidad de transformaciones matemáticas posteriores.

B.1.4 Método de adición-extracción.

La medida de una propiedad física a diferentes concentraciones de un soluto en un disolvente es uno de los procedimientos más empleados en un gran número de experimentos en química. Normalmente este tipo de experimentos se realizan mediante dilución de una disolución inicial (madre) de concentración superior a la máxima necesaria para el experimento. Rara vez se preparan una serie de disoluciones a diferentes concentraciones para medir directamente. Los distintos errores de pesada (del sólido a disolver) y, sobre todo, la medida del volumen final, pueden introducir errores sistemáticos. Jover *et al* describen un procedimiento de dilución secuencial que ha sido empleado para la obtención de los resultados de medidas de la tensión superficial en el presente trabajo. El método resulta sencillo, limpio y es muy útil para ilustrar las diferencias entre error aleatorio y sistemático.⁷

El procedimiento consiste en dos simples pasos:

1. Se añaden v mililitros de disolvente a V mililitros de disolución de concentración molar C_0 . Donde se habla de disolvente se incluyen aquellas disoluciones reguladoras con tampón (Buffer) y disoluciones de sales inorgánicas con el fin de mantener constante tanto el pH como la fuerza iónica. Aceptando que el efecto de volumen de disoluciones diluidas es despreciable, la concentración resultante será:

$$C_1 = C_0[1 - v/(V + v)] \quad [B.18]$$

2. Se extraen v mililitros de la disolución que ahora tiene una concentración molar C_1 .

De la posterior repetición secuencial de los dos pasos anteriores se obtiene una disolución de concentración que sigue una progresión geométrica. Se define un factor de volumen no dimensional de la ecuación B.18:

$$V_F = 1 - v/(V + v) \quad [B.19]$$

La concentración después de n diluciones, de esta progresión geométrica, se deduce fácilmente:

$$C_n = C_0 V_F^n \quad [B.20]$$

Simplemente con la teoría de propagación de errores se puede estimar el error en la concentración y el factor de volumen tras n ciclos de dilución-extracción:

$$\Delta C_n = C_0 n V_F^{n-1} \Delta V_F \quad \Delta V_F = \frac{(V^2 \Delta v^2 + v^2 \Delta V^2)^{1/2}}{(V + v)^2} \quad [B.21]$$

El error relativo (B.22) está claramente relacionado con el número de ciclos de adición-extracción:

$$\Delta C_n / C_n = n \Delta V_F / V_F \quad [B.22]$$

En los resultados obtenidos en medidas de tensión superficial que se presentan en este trabajo, se ha empleado este método mediante el empleo de micro-pipetas previamente calibradas. El volumen empleado en la cubeta de la balanza (V) fue de 10 mL y el volumen de adición-extracción (v) de 3 mL en todos los casos.

B.2 DISPERSIÓN DE LUZ

B.2.1 Introducción.

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. De esta interacción es posible obtener información sobre la estructura y la dinámica molecular del sistema en estudio gracias a técnicas tales como: dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS), dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS, small-angle neutron scattering) y dispersión de luz estática y dinámica (LS, static and dynamic light scattering). Estas técnicas de dispersión de luz son métodos no invasivos que aporta datos interesantes sobre tamaño y forma de macromoléculas en disolución.⁸⁻⁹

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*. 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.

Los parámetros estructurales que se obtienen según las técnicas varían por lo que se debe definir tres tipos distintos de radios de partícula. El primero, el radio geométrico R_s (*Figura B.04*), es el radio que se obtiene de partículas sólidas mediante el análisis de imágenes. Del análisis de *Difusión de Luz Dinámica* (DLS) se obtiene el radio hidrodinámico (R_h) al comparar la partícula con el coeficiente de difusión traslacional medido. Si por ejemplo consideramos una partícula con un núcleo sólido cuya superficie esté cubierta por polímeros o surfactantes de cadena larga que se orientan hacia la disolución, el radio es significativamente más grande que el correspondiente al núcleo sólido de la partícula. Si la partícula posee moléculas ionizadas en su superficie, el R_h considera también la esfera de solvatación que rodea al agregado. Por último, de las medidas de *Difusión de Luz Estática* (SLS) se obtiene el radio de giro (R_g) el cual está relacionado con la forma de la partícula. En el caso del R_h se asume la forma esférica del agregado mientras que con el R_g no hay ninguna presunción de forma. Cuando la relación entre R_g/R_h tiene un valor por ejemplo de 0,77 sugiere una forma de partícula esférica

mientras que un valor de 1,54 sugiere la forma de un polímero de cadena larga en disposición aleatoria.

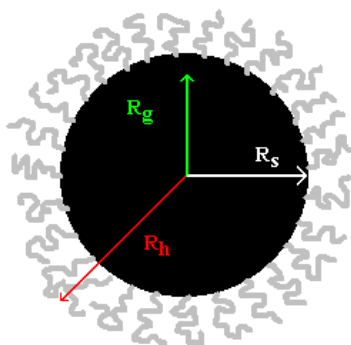


Figura B.04. Esquema que representa los diferentes tipos de radio de una partícula.

A continuación se entrara en detalle, únicamente, en DLS por ser la técnica empleada en el análisis de tamaño de partículas en disolución en el transcurso del presente trabajo de investigación.

B.2.2 Difusión Dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS).

Las partículas coloidales en disolución sufren movimiento aleatorio (browniano) que permite múltiples colisiones con las moléculas del disolvente debido a la agitación térmica. La luz es dispersada por la interacción de los electrones con la radiación incidente. El campo eléctrico oscilante causa una vibración en los electrones convirtiéndolos en dipolos oscilantes y 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). La intensidad de la luz dispersada por estas partículas en movimiento fluctúa con el tiempo ya que las distancias que existen entre el detector y las partículas difusoras varían por el movimiento browniano. La luz difundida puede interferir constructiva o destructivamente dependiendo de la distancia que viaja hasta el detector y como resultado se obtiene, en consecuencia, un valor medio de la intensidad difundida sobre la que se superponen una serie de fluctuaciones. Los tiempos de relajación de las fluctuaciones están relacionados con el coeficiente de difusión, y en consecuencia, con los tamaños de las partículas. Cummins *et al* fueron los primeros en hacer medidas de la dependencia temporal de la dispersión de luz para determinar el coeficiente de difusión translacional (D_T) para una disolución diluida de esferas de poliestireno.¹⁰ Las partículas pequeñas presentan unos tiempos de relajación más cortos debido que se mueven más rápido que las partículas grandes. 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, simplemente el fotomultiplicador está conectado a un correlador. Dado que el número de fotones registrados del pequeño volumen de muestra se multiplica con los que llegan con desfase, para poder administrar toda esta información se cuenta con correladores digitales con un gran número de canales (por encima de 500) que permiten tomar medidas en tiempos muy cortos (inferiores a las centésimas de μs). Al mismo tiempo, el correlador logra reducir drásticamente la potencia necesaria del laser y la duración del experimento.

La ecuación B.23 describe la media en el tiempo de la intensidad de luz dispersada $\langle I(q) \rangle$ en términos de parámetros de partícula (Fig.B.05).

$$\langle I(q) \rangle = K N M^2 P(\Theta) B(c) \quad [B.23]$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\Theta}{2}\right) \quad [B.24]$$

donde q es la magnitud del vector de dispersión, Θ es el ángulo de dispersión, λ_0 es la longitud de onda del laser en el vacío y n es el índice de refracción de la disolución. K es una constante óptica, N el número de partículas que dispersan, M es la masa de la partícula, $B(c)$ es un factor de concentración y $P(\Theta)$ es el factor de forma de la misma. Cabe mencionar que los términos M^2 y $P(\Theta)$ son factores determinantes para la determinación del tamaño de distribución.¹¹

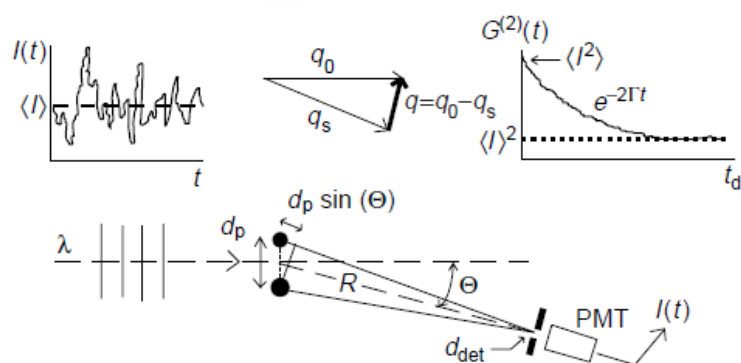


Figura B.05. Ilustración esquemática de los principios en que se basa el DLS. Arriba: variación de la intensidad de la luz difundida con el tiempo (Izda.), vector de dispersión (Centro), función de autocorrelación con el tiempo de decaimiento (Dcha.). Abajo: ejemplo de dos partículas dispersantes.¹¹

El concepto general en que se basa la DLS es el siguiente: la difusión de las partículas dispersantes (movimiento browniano) causa que la fase de dispersión cada una de ellas cambie con el tiempo. La intensidad total de luz dispersada fluctúa con el tiempo debido a interferencias constructivas y destructivas. Al incidir un haz de luz laser, de longitud de onda λ , sobre dos partículas idénticas pero separadas una cierta distancia se obtendrá una diferencia de fase entre las longitudes de onda proveniente de cada partícula al llegar al detector (Figura B.05). La diferencia de fase viene dada por $d_p \text{sen}(\Theta)$. Cuando este valor es un múltiplo de λ , la interacción se vuelve constructiva y la intensidad resultante es el doble de la correspondiente a una sola partícula. Cuando el valor de la diferencia de fase es $\lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2, \dots$ ambas ondas están fuera de fase. Esta interacción destructiva hace que la intensidad de luz dispersada sea cero.

En un experimento típico de DLS, el detector mide la intensidad de luz dispersada en un determinado periodo de tiempo en intervalos de tiempo del orden de los 10^{-7} 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 (Figura B.05). Para poder encontrar patrones repetitivos dentro de una señal, en este caso de fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada, resulta de gran utilidad la función de autocorrelación. En estadística la autocorrelación es una técnica muy recurrida en el procesamiento 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. El desplazamiento temporal o desfase se conoce como τ (Figura B.06). No es necesaria la calibración ya que en DLS la escala es absoluta.

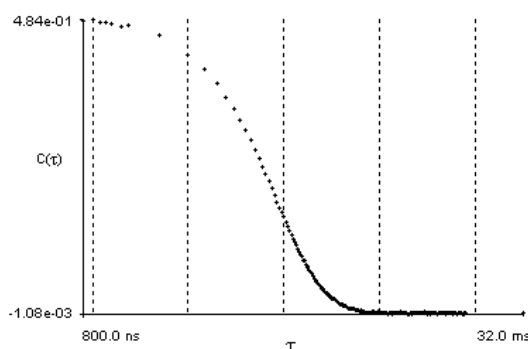


Figura B.06. Función de autocorrelación de un experimento por DLS.

La función de correlación se construye multiplicando el número de fotones de dos intervalos sucesivos y almacenando el resultado. Este proceso se repite numerosas veces, unas 10^5 - 10^6 , dando lugar a una buena aproximación de la medida.

$$C(q, \tau) = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(q, t) I(q, t + \tau) dt = \langle I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \rangle \quad [B.25]$$

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} C(q, \tau) = \langle I(q, 0) \rangle^2 \quad [B.26]$$

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} C(q, \tau) = \langle I(q) \rangle^2 \quad [B.27]$$

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. 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 $\langle I(q, 0) \rangle^2$ hasta $\langle I(q) \rangle^2$. De este modo se obtiene una función de autocorrelación normalizada:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t) \cdot I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q) \rangle^2} \quad [B.28]$$

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.

$$g_2(q, \tau) = \langle I(q) \rangle^2 + b \cdot g_1(\tau) \cdot \langle I(q, 0) \rangle^2 \quad [B.29]$$

donde b es una constante instrumental que refleja desviaciones de una posible correlación ideal, $b=1$.

Como ejemplo, en el caso de un sistema formado tanto por partículas pequeñas monodispersas como por grandes agregados esféricos monodispersos, la función de autocorrelación $g_1(\tau)$ es un decaimiento monoexponencial hasta llegar a una línea base.

$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma\tau) = \exp(-D_0 q^2 \tau) \quad [B.30]$$

donde la constante de decaimiento viene determinada por el coeficiente de difusión D_0 de la partícula. Es así como a través de la variación de la intensidad con el tiempo producido por el movimiento aleatorio de las partículas se relaciona con el coeficiente de difusión y con ello se logra determinar el tamaño de las partículas.

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 ovillos 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:

$$D_0 = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad [\text{B.31}]$$

siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura, η 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.

Para sistemas polidispersos, la ecuación debe ser integrada para todos los tamaños posibles ya que cada partícula contribuye con su propio coeficiente de difusión:

$$g_i(q, \tau) = \int_0^\infty G(q, \Gamma) \cdot \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad [\text{B.32}]$$

$G(q, \Gamma)$ es la función de distribución y puede ser evaluada de distintas formas mediante diferentes algoritmos. Existen distintos métodos de análisis de los datos de la función de autocorrelación para la obtención de la distribución de tamaños de partícula para cada población.¹² Estos métodos procesan los datos de forma distinta al tomar cada uno diferentes suposiciones. El correlador (TurboCorr) utilizado en las medidas de DLS incluye aplicaciones en el software que permiten el cálculo del tamaño de partícula por análisis de cumulantes, NNLS, CONTIN, muestreo exponencial y doble exponencial.¹³⁻¹⁵ Brevemente se comentaran los métodos empleados sin analizarlos en detalle, dado los extensos desarrollos matemáticos que conllevan.

NNLS (Non-negatively Constrained Least Squares: multiple pass): es una adaptación de una rutina de análisis de datos de un método anterior, un algoritmo derivado del trabajo original de Lawson y Hanson (1974).¹⁶ Desarrollado para distribuciones multimodales, este algoritmo posee la ventaja de que, con el tiempo de cálculo suficiente, se obtienen resultados satisfactorios que no requieren de parámetros de corte (límites).

CONTIN (Non-negatively Constrained Least Squares: regularized): este método utiliza como punto de partida el NNLS pero incorpora otra estrategia de normalización. Cuando se aplica la inversa de la transformada de Laplace se conoce como CONTIN y fue desarrollado por Provencher.¹⁷⁻¹⁸ Este análisis es ideal para sistemas polidispersos que no se pueden resolver con el método de los cumulantes. La resolución para separar dos partículas diferentes es aproximadamente un factor de 5 o superior y las diferencias entre dos poblaciones diferentes debe de ser inferior a $1/10^{-5}$.

B.2.3 Equipo de dispersión de luz utilizado.

Para las medidas DLS se ha utilizado un equipo de la casa Brookhaven modelo BI-200SM con un correlador TurboCorr con 522 canales y un detector modelo BI-APD de 195.3 VDC. (http://www.brookhaveninstruments.com/products/light_scattering/p_LS_BI-200SM.html). La fuente utilizada es un láser CVI Melles Griot (HeNe) de 75 mW que

opera a una longitud de onda de 632.8 nanómetros. La *Figura B.08* muestra un esquema del mismo.

Aprovechando que la *decalina* tiene un *índice de refracción* muy cercano al del vidrio, se usa como líquido en el baño termostático que contiene la muestra, habitualmente a la temperatura de 25.0 ± 0.4 °C. El brazo rotante que contiene el fotomultiplicador se situó a un ángulo de 90° con respecto al haz del laser (*Figura B.07*) en todas las medidas que se muestran.

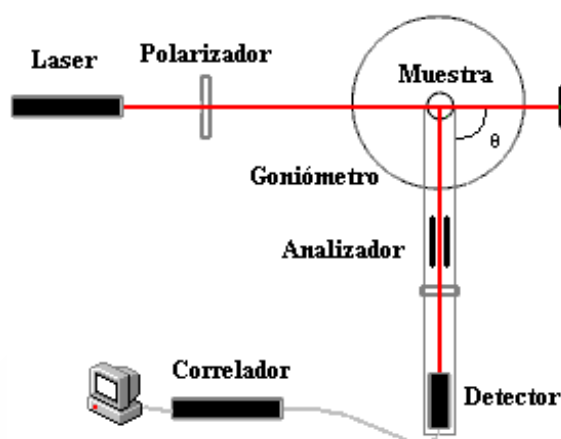


Figura B.07. Esquema del montaje del dispositivo para la determinación de la variación de intensidades de luz dispersada empleado.

B.3 MICROSCOPIA

B.3.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. En su trayecto es dirigido y focalizado mediante lentes electromagnéticas.¹⁹ Este proceso se realiza en el interior de una columna en condiciones de alto vacío (*Figura B.08*), de forma que los electrones acelerados sigan 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 unos sean absorbidos por el objeto y otros reboten perdiendo velocidad y variando su trayectoria. Los electrones que atraviesan la muestra se proyectan sobre una pantalla fluorescente, placa fotográfica o CCD de una cámara, formando imágenes aumentadas reales de la muestra. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta un millón de veces. Las zonas que aparecerán más oscuras en la imagen son aquellas que más desvían los electrones.

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.

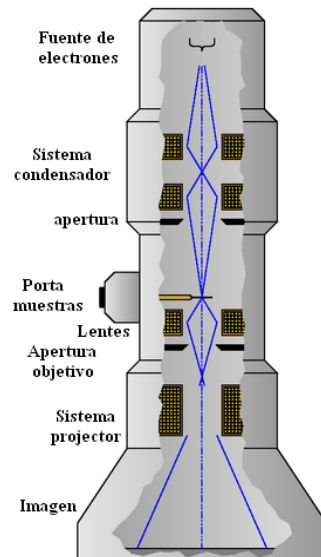


Figura B.08. Esquema del montaje del microscopio de transmisión electrónica empleado.

La preparación de las muestras consiste en depositar una gota de la disolución a estudiar sobre una rejilla de Cobre provista de una película de Formvar. Conocido también como polivinilo formal, hoy parece ser la película de soporte para rejillas TEM más ampliamente usada en todo el mundo. Formvar es un nombre comercial compuesto de una familia de polímeros formados del alcohol y formaldehído de polivinilo como copolímeros con acetato de polivinilo; otra descripción es "resinas de acetato de polivinilo modificado". Este material es un poco más fuerte que los otros productos para la formación de película de soporte, permitiendo usar rejillas con menor malla nominal (cuadrados de rejilla mayores) que con otras películas de soporte. La capacidad de la película de soportar efectos de calentamiento no es tan buena pero este efecto no preocupa en este estudio. Formvar puede ser disuelto en una variedad de solventes con dicloruro de etileno, dioxano o cloroformo, que son los dos más populares.

En menos de un minuto, tras depositar la muestra en la rejilla, se retira el exceso de líquido absorbiéndolo mediante papel de filtro dado que en muchos casos hay riesgo de exceso de muestra que no permitiría una observación clara. Se deja secar al aire la rejilla durante unos minutos antes de poder observarlas en el microscopio.

El microscopio electrónico de transmisión empleado es un modelo JEOL JEM-1011. Voltaje de aceleración: 40 a 100 kV. Magnificación: 800x a 600000x en 30 pasos. Baja magnificación de 50x a 1000x en 14 pasos. Portamuestras para dos especímenes. Sistema automático de fotografía en película con negativos de 6.5×9 cm. La fotografía digital se obtiene mediante cámara MEGA VIEW III (SIS).

B.3.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

La técnica AFM (Atomic Force Microscopy) mide la fuerza de Van der Waals entre la sonda y la superficie, la cual puede ser una fuerza repulsiva de corto alcance (medida en el denominado modo de contacto) o bien una fuerza atractiva de largo alcance (que se mide en el denominado modo de no-contacto). Hasta su aparición, las técnicas de microscopía electrónica eran las únicas para la obtención de imágenes detalladas de estructuras subcelulares y capaces de alcanzar resolución atómica sobre materiales inorgánicos. Aunque estas técnicas se caracterizan por su potencial de resolución presentan la desventaja de necesitar muestras con conductividad electrónica y operar en vacío, lo que hace perder en resolución en muestras "blandas" y la restricción en los

medios a trabajar. Una de las ventajas más destacadas de AFM es que se trabaja casi en contacto con la muestra y la posibilidad de medir propiedades físicas de la muestra en tiempo real, especialmente cuando son blandas y deformables.²⁰⁻²¹

Como ya se ha indicado, la técnica AFM mide las interacciones atractivas y repulsivas (del orden de 10^{-9} N) entre los átomos de una superficie y los átomos de la sonda la cual está sujeta al extremo de una palanca (cantilever), y cuya deflexión y/o torsión va a ser proporcional a la fuerza neta de interacción. Una fuerza repulsiva desplaza el dispositivo hacia arriba, desplazamiento que se mide mediante un punto láser que se refleja en un fotodetector, lo que permite calcular la fuerza (*Figura B.09*). Al mantener la fuerza constante mientras rastrea la punta sobre la superficie, el movimiento vertical de la punta sigue el perfil de la superficie y se graba como la topografía de la superficie.

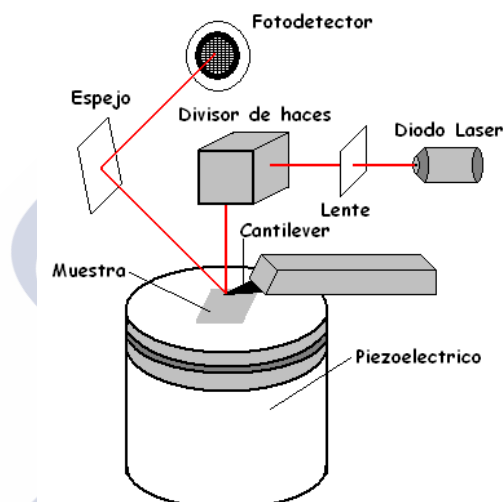


Figura B.09. Sistema de detección óptico del movimiento del cantilever en AFM.

El cantilever porta una aguja minúscula y de diferentes geometrías que va recorriendo a cierta distancia la superficie del material. En la cabeza del microscopio se encuentra el sistema óptico de detección de la deflexión en el cantilever. Consta de un haz láser que incide sobre el cantilever, un espejo ajustable que dirige este haz sobre un dispositivo de fotodetectores los cuales, a su vez, darán información del desplazamiento del haz a medida que la punta barre la superficie. Estos desplazamientos del haz amplifican los movimientos angulares del cantilever y, finalmente, esta señal se traduce en términos de alturas. Existen varios modos de rastreo: de contacto, de altura constante, sin contacto y de contacto intermitente.

B.3.2.1 Modo de contacto.

Este modo de barrido, la deflexión del cantilever (y, por lo tanto, la fuerza) se mantiene constante. Ello se consigue mediante un proceso de retroalimentación. De la intensidad de la retro-alimentación se mide la altura. El contacto sonda/superficie tiene lugar a través de la capa de fluido adsorbida. En condiciones ambientales el intervalo de fuerzas se encuentra comprendido entre nN y μ N, aunque en líquidos pueden ser incluso menores ($<0,1$ nN). Este es el modo más común de barrido.

En modo de contacto AFM, las fuerzas interatómicas de van der Waals se vuelven repulsivas cuando se acerca la punta AFM a la superficie de la muestra. Generalmente, están presentes otras dos fuerzas de interacción de van der Waals. Estas fuerzas incluyen la fuerza de capilaridad de una delgada capa de agua atmosférica, y la fuerza mecánica del propio cantilever como palanca que es. La fuerza capilar se debe al hecho de que

puede encontrarse agua alrededor de la punta, causando que ésta se pegue a la superficie de la muestra. La magnitud de la fuerza capilar varía con la distancia de la muestra de la punta. La fuerza mecánica resultante del cantilever es similar a la fuerza de un resorte comprimido y su magnitud y signo (repulsivo o atractivo) son dependientes de la deflexión del cantilever y su constante como resorte.

B.3.2.2 Resolución.

Al realizarse los rastreos se producen una serie de defectos o errores en la determinación de la verdadera forma de la superficie. Entre ellos cabe comentar los de ensanchamiento que aparecen cuando el objeto es aproximadamente del mismo tamaño que el radio de curvatura, o bien cuando el lateral de la sonda entra en contacto con el objeto antes que la propia punta de la sonda. Del mismo modo, grietas pronunciadas y verticales aparecerán distorsionadas debido a que la sonda no puede “leer” la pared perfectamente vertical. Finalmente, debe tenerse también en cuenta que las fuerzas existentes entre la muestra y la sonda pueden deformar a la propia muestra.

Las imágenes que se muestran en este trabajo fueron obtenidas mediante un equipo Topometrix, modelos Explorar y Discoverer. El escaneo fue realizado en modo de contacto y las muestras se prepararon sobre una superficie de grafito.

B.4 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

B.4.1 *Desorción láser asistida por matriz (Maldi).*

Maldi es una técnica laser por desorción, de ionización suave, que no requiere una vaporización previa de la muestra. Para conseguir un proceso de ionización eficiente y suave han de cumplirse tres requisitos básicos:

- La longitud de onda del laser usado debe ser adecuada para conseguir la excitación electrónica o vibracional de la molécula de estudio (ionización resonante). Para esto se pueden utilizar láseres con emisión en el ultravioleta remoto o en el infrarrojo remoto.
- El punto caliente producido debe ser de muy corta duración, para evitar la descomposición térmica de la muestra. Esto se consigue empleando un laser con pulsos de corta duración (de 1 a 100 ns).
- Las muestras, normalmente moléculas orgánicas pequeñas, deben dispersarse previamente en una matriz líquida o sólida. El analito queda así aislado entre sí y rodeado de un gran número de moléculas de matriz para evitar la asociación de moléculas de la muestra que daría lugar a la formación de complejos de pesos moleculares muy altos, difíciles de desorber y analizar. Al mismo tiempo, la matriz absorbe el exceso de energía, consiguiendo un proceso de ionización extremadamente suave. Al mezclar el analito con la matriz tiene lugar un proceso de cristalización por evaporación del disolvente.

El analizador que se emplea en esta técnica es de tiempo de vuelo, se denomina TOF (time of flight) y los principios en que se basa son sencillos. Una vez introducida la muestra, con la matriz, en una placa de *Maldi* se expone a la fuente de luz laser. Los pulsos intensivos de disparos laser de longitud de onda corta provocan la ionización del analito. Conseguida la ionización y confinados todos los iones en la fuente, se aplica un voltaje de extracción de modo que todos los iones salen de la fuente simultáneamente. Atravesan un campo electrostático acelerador, con lo que se adquiere una gran energía cinética, que los impulsa en la dirección del tubo de vuelo hacia el detector. El tiempo

empleado por los iones en alcanzar el detector depende de la longitud del tubo de vuelo y de la relación m/z de los iones (suponiendo a todos la misma carga). A mayor longitud del tubo de vuelo, mayor es la capacidad para diferenciar las diferentes masas de los iones pero la variación de este parámetro implicaría unas dimensiones del equipo poco prácticas para su construcción por lo que no es una solución para mejorar la resolución de la técnica. Aunque la resolución es una de las limitaciones de los sistemas TOF, esta se puede mejorar disminuyendo la dispersión de energías que se originan como resultado de la formación en diferentes regiones o planos de los iones sometidos a desorción por laser. Esta dispersión de energías produce una dispersión en velocidades y en consecuencia de tiempos de vuelo. Se mejora pues la resolución compensando esta dispersión a través del empleo de un Reflectron. Este dispositivo reenfoca los iones de las misma masa sobre el detector.

La técnica Maldi se emplea en análisis de proteínas, glicoproteínas, polinucleótidos, oligosacáridos, glicolípidos y, en general, biopolímeros. La elección de la matriz depende de la naturaleza del compuesto de estudio. El DITHRANOL (1,8,9-Trihidroxiantraceno) es una matriz indicada para análisis de polímeros y es la que se ha empleado en la caracterización de los compuestos sintetizados en este trabajo. La dificultad que muchos presentaron para disolverse, incluso en disolventes orgánicos, se ha superado mediante el empleo de Maldi-Tof con esta matriz y en modo Reflector obteniéndose buenos resultados.

B.4.2 Equipo de espectrometría de masas empleado.

Equipo MALDI-TOF modelo AUTOFLEX da casa Bruker.

Características:

- Analizador lineal de 122 cm. Para análisis de iones de carga positiva e negativa.
- Sistema de detección con MCP (Micro Chanel Plate) de muy alta sensibilidad y rango dinámico alto.
- Fuente de alimentación de alto voltaje de +25/-20 kv para la aceleración de iones.
- Láser N_2 de muy larga duración.
- Fuente SCOUT™, con formato para placas microtiter. Porta-muestras con óptica de observación.
- Sistema de concentración de muestra AnchorChip™, para elevar la sensibilidad propia del equipo entre 10 y 100 veces.
- Reflector electrostático de iones para mayor resolución y exactitud en modo de trabajo de extracción pulsada de iones (PIE) y un segundo detector especial de alta sensibilidad de tipo MCP.
- Módulo FAST (Fragmentation Analysis and Structural TOF-MS). Accesorio para experimentos PSD (Post-SourceDecay).

B.5 OTRAS TÉCNICAS EMPLEADAS.

B.5.1 Resonancia magnética nuclear.

Equipos empleados:

- *Espectrómetro Varian Inova 750*, 17.61 T (750 MHz resonancia 1H)

Descripción:

Sonda de detección inversa $^1H/^{13}C/^{15}N$ (5 mm) con triple gradientes X,Y,Z.

Sonda $^1H/^{13}C/^{31}P$ (5 mm) con triple gradientes X,Y,Z.

Equipado para experimentos de triple resonancia (tres canales).

Tres generadores de forma de onda para pulsos selectivos.

- *Espectrómetro Bruker DRX-500*, 11.74 T (500 MHz resonancia ^1H)

Descripción:

Sonda de detección inversa $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ (5 mm) con gradiente Z.
Sonda de detección inversa $^1\text{H}/\text{X}$ multinuclear (5 mm) con gradiente Z.
Sonda multinuclear X / ^1H (10 mm).
Equipado para experimentos de triple resonancia (tres canales)
Dos generadores de forma de onda para pulsos selectivos.
Dispositivo de enfriamiento con N_2 líquido para experimentos a baja temperatura.
Software de control Top Spin v. 1.3 patchlevel 8 bajo sistema Operativo Linux Red-Hat Enterprise 5.1.

- *Espectrómetro Varian Mercury 300*, 7.04 T (300 MHz resonancia ^1H)

Descripción:

Sonda autoconmutable $^1\text{H}/^{19}\text{F},^{31}\text{P},^{13}\text{C}$ (5 mm) para experimentos de doble resonancia con gradiente Z.
Accesorio intercambiador de muestras
Software de control VNMRj 1.1D bajo sistema Operativo Linux Red-Hat Enterprise.

Experimentos:

1D: ^1H , PRESAT, ^{13}C , DEPT, APT, ^{31}P , ^{19}F .

Homonuclear 2D: COSY, NOESY, TOCSY, gdcosy, DQCOSY, ROESY, gCOSY.

Heteronuclear 2D: HMQC, HMBC, HSQC, ghmbc, gHMQC, gHSQC.

B.5.2 Rayos X.

Equipos empleados:

- *Bruker Kappa-APEX II* equipado con:

Goniómetro de cuatro círculos
Generador con tubo sellado de Mo.
Detector bidimensional APEX II.
Accesorio para medidas a baja temperatura (100-300K).

- *Nonius FR591-KappaCCD2000* equipado con:

Goniómetro de cuatro círculos
Generador con ánodo rotatorio de 6Kw de máximo.
Detector bidimensional KappaCCD2000.
Accesorio para medidas a baja temperatura (100-300K).

Pueden verse notas adicionales de varias de las técnicas anteriores en los servicios generales de investigación RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela (<http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/index.html>).

Bibliografía

- (1) Chang, C.-H.; Franses, E. I. *Colloids Surfaces, A* **1995**, 100.
- (2) Rosen, M. J. *Surfactants and interfacial phenomena* **1989**, 2nd Ed., Wiley, New York.
- (3) Mysels, K. J.; Florence, A. T. *J. Colloid. Interface Sci.* **1973**, 43, 577.
- (4) Weiner, N. D.; Flynn, G. L. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 22, 2480.

- (5) Prosser, A. J.; Franses, E. I. *Colloids Surfaces, A* **2001**, 178, 1.
- (6) Harkins, W. D.; Jordan, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, 52, 1751.
- (7) Jover, A.; Meijide, F.; Mosquera, V.; Vázquez Tato, J. *J. Chem. Educ.* **1990**, 67, 530.
- (8) Murphy, R. M. *Current Opinion Biotech.* **1997**, 8, 25.
- (9) Chu, B. *Laser Light Scattering* **1974**, Academic Press, London.
- (10) Cummins, H. Z.; Knable, N.; Yeh, Y. *Phys. Rev. Lett.* **1964**, 12, 150.
- (11) Tscharnuter, W. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2000**, 5469.
- (12) P. Johnson, P.; Brown, W. *Laser Light Scattering in Biochemistry*, S. E. Harding, D.B. Sattelle y V. A. Bloomfield eds **1992**, Capitulo 11, Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
- (13) Grabowski, E. F.; Morrison, I. D. *Measurement of suspended particles in quasielastic in Light Scattering* **1983**, B.E Dahneke, Ed., Wiley, New York., 199.
- (14) Chen, D.; Plemmons, R. J. A. Bultheel y R. Cools ed. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* **2010**, *The birth of numerical analysis*, 109.
- (15) Cichocki, A.; Zdune, R. *Lecture Notes in Computer Science* **2007**, 4493, 793.
- (16) Lawson, C. L.; Hanson, B. J. *SIAM Review* **1976**, 18, 518.
- (17) Provencher, S. W. *Computer Phys. Commun.* **1982**, 27, 213.
- (18) Provencher, S. W. *Computer Phys. Commun.* **1982**, 27, 229.
- (19) Egerton, R. F. *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM, and AEM* **2005**, Springer.
- (20) Schmassmann, A.; Angellotti, M. A.; Clerici, C.; Hofmann, A. F.; Ton-Nu, H. T.; Schteingart, C. D.; Marcus, S. N.; Hagey, L. R.; Rossi, S. S.; Aigner, A. *Gastroenterology* **1990**, 99, 1092.
- (21) Ikai, A. *Surface Sci. Reports* **1996**, 26, 261.