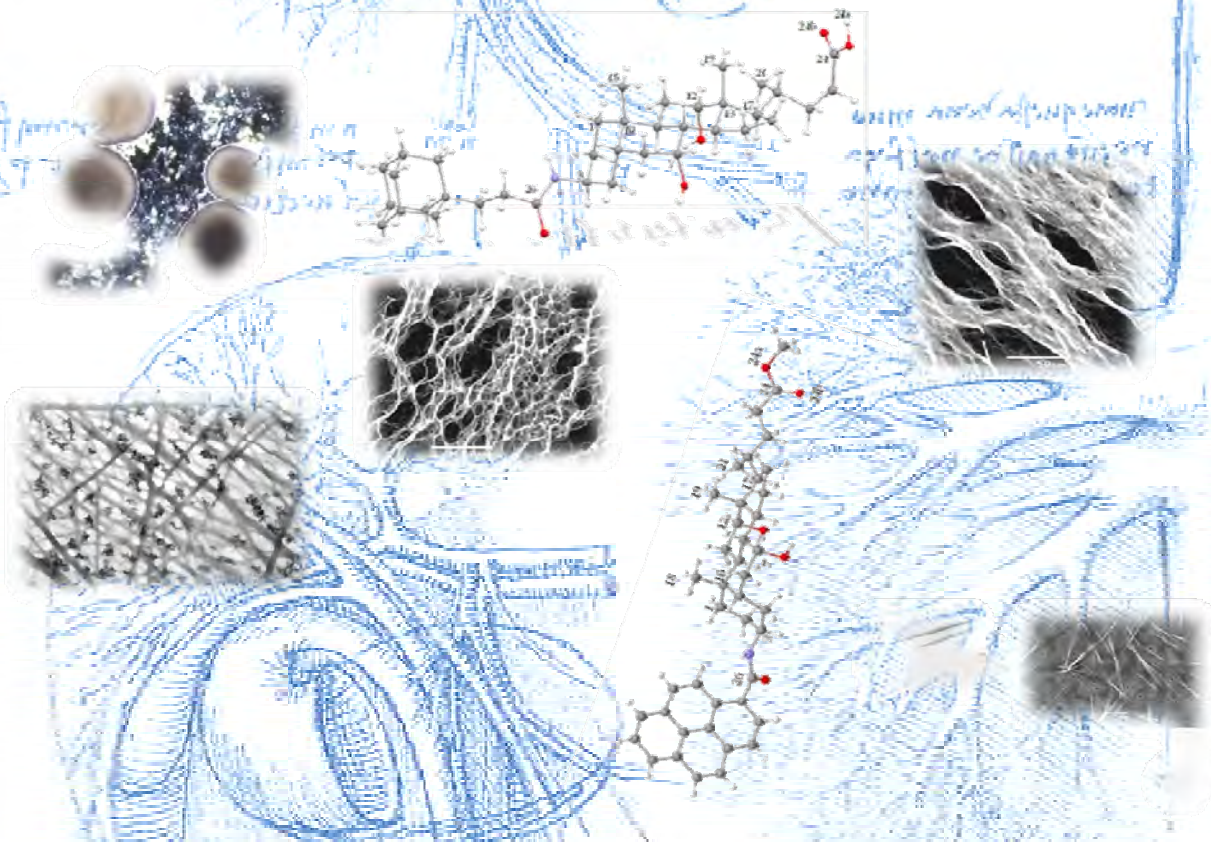


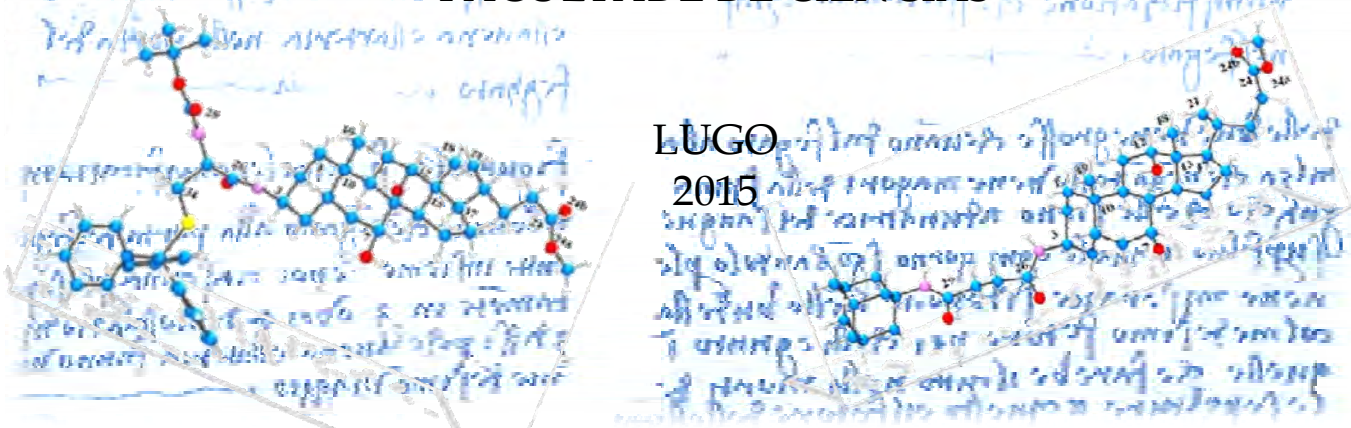
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES DERIVADOS DE SALES BILIARES, ADAMANTANOS, NORBORNANOS, TIOLES, NANOPARTÍCULAS DE AU Y RESINAS EPOXI



Javier Miragaya Otero

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA Y FÍSICA APLICADA
FACULTAD DE CIENCIAS

LUGO
2015



ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN

1.1	QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	3
1.2	ÁCIDOS Y SALES BILIARES	9
1.3	AGREGACIÓN EN SOLUCIONES	15
1.3.1	AGREGACIÓN EN AGUA	19
1.3.2	AGREGACIÓN EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	23
1.3.3	ESTADO CRISTALINO	25
1.4	NANOPARTÍCULAS DE ORO	27
1.4.1	PROPIEDADES ÓPTICAS Y ELÉCTRICAS DE LOS COLOIDES METÁLICOS	28
1.4.2	PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS SUPERFICIES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	29
1.4.3	PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	30
1.5	RESINAS EPOXI	30
1.5.1	CARACTERÍSTICAS DE LAS RESINAS EPOXI	31
1.5.2	SÍNTESIS Y APLICACIONES DE LAS RESINAS EPOXI	32
1.5.3	AGENTES RETICULANTES	33
1.6	PLANTEAMIENTO	35
1.7	BIBLIOGRAFÍA	37

CAPÍTULO 2 - ESTUDIO DEL ESTADO CRISTALINO DE DERIVADOS DEL ÁCIDO CÓLICO

2.1	INTRODUCCIÓN	45
2.2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	46
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
2.3.1	AdCH ₂ CA	85
2.3.1.1	ENANTIOSELECTIVIDAD ENTRE AdCH ₂ CA/2-butanol	100
2.3.1.2	COMPLEJO DE INCLUSIÓN AdCH ₂ CA/Acetofenona	105
2.3.2	NbCH ₂ CA	109
2.3.3	AdCH ₂ CH ₂ CA	125
2.3.4	AdSuccCOOMe	136
2.3.5	BocCys(Trt)COOMe	143
2.3.6	PyrCOOMe	149
2.3.7	AdCA y AdCOOMe	154
2.4	COMENTARIOS ADICIONALES	163
2.5	BIBLIOGRAFÍA	167

ÍNDICE

CAPÍTULO 3 - ESTADO DE AGREGACIÓN EN SOLUCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO

3.1	INTRODUCCIÓN	173
3.1.1	SOLUBILIDAD EN AGUA	174
3.1.2	SOLUBILIDAD EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	175
3.1.3	CÁLCULO DEL EXCESO DE CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL	175
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	183
3.2.1	AdCH ₂ CA	
3.2.1.1	SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE	184
3.2.1.2	ESTUDIO DE LA DENSIDAD	185
3.2.1.3	ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL	186
3.2.1.4	ESTUDIO DE FLUORESCENCIA	187
3.2.1.5	ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ	188
3.2.1.6	DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO	198
3.2.1.7	ESTUDIO MEDIANTE TEM	199
3.2.2	NbCH ₂ CA	
3.2.2.1	SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE	202
3.2.2.2	ESTUDIO DE LA DENSIDAD	204
3.2.2.3	ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL	204
3.2.2.4	ESTUDIO DE FLUORESCENCIA	205
3.2.2.5	ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ	206
3.2.2.6	DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO	219
3.2.2.7	ESTUDIO MEDIANTE TEM	220
3.2.3	AdSucCA	
3.2.3.1	SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE	222
3.2.3.2	ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL	223
3.2.3.3	ESTUDIO DE FLUORESCENCIA	224
3.2.3.4	ESTUDIO DE ESPECTROMETRÍA DE DICROISMO CIRCULAR	225
3.2.3.5	ESTUDIO DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	231
3.2.3.6	ESTUDIO MEDIANTE TEM	232
3.2.4	AdGlutCA	
3.2.4.1	SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE	238
3.2.4.2	ESTUDIO DE LA DENSIDAD	239
3.2.4.3	ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL	239
3.2.4.4	ESTUDIO DE FLUORESCENCIA	240
3.2.4.5	ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ	241
3.2.4.6	DISPERSIÓN DE RAYOS-X A BAJO ÁNGULO	251
3.2.1.7	ESTUDIO MEDIANTE TEM	251
3.3	COMENTARIOS ADICIONALES	253
3.4	BIBLIOGRAFÍA	254

ÍNDICE

CAPÍTULO 4 - DERIVADO DE ÁCIDO CÓLICO CON TIOLES. RESINAS EPOXI Y NANOPARTICULAS DE AU. MEZCLAS CATANIÓNICAS.

4.1 DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO CON TIOLES	
4.1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO	257
4.1.2 DERIVADOS DE SB CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	262
4.1.3 PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS COLOIDES METÁLICOS	263
4.1.4 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS SUPERF. DE NPs METÁLICAS	264
4.1.5 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS NPS METÁLICAS	265
4.1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.6.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU	265
4.1.6.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU CON CITRATO SÓDICO	266
4.1.6.3. SÍNTESIS DE NPs DE AU CON BOROHIDRURO SÓDICO	271
4.1.7 DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO CON GRUPOS TIOL	
4.1.7.1. DÍMERO DE AC CON PUENTE DE AEDT	275
4.1.7.2. SÍNTESIS DEL COMPUESTO TioGlyCNa	276
4.1.7.3. SÍNTESIS DEL COMPUESTO MerProCNa	276
4.1.7.4. SÍNTESIS DEL COMPUESTO BOC-Cys-TrtCNa	276
4.1.8 SÍNTESIS DE NPs DE AU CON LOS DERIVADOS DE SB.	277
4.2 NANOCOMPOSITES EPOXI CON NPs DE ORO	282
4.2.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CURADO	283
4.2.2 OPTIMIZACIÓN SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DA AU	284
4.2.3 FABRICACIÓN DEL NANOCOMPOSITE	285
4.2.4 AJUSTE CINÉTICO	285
4.3 ESTUDIO DE NANOCOMPOSITES MEDIANTE DEA	287
4.3.1 ANÁLISIS DIELECTRICO	287
4.3.2 FABRICACIÓN DEL NANOCOMPOSITE	290
4.3.3 ANÁLISIS DIELECTRICO DE LAS MUESTRAS	291
4.4 MEZCLAS CATANIÓNICAS	
4.4.1 INTRODUCCIÓN	292
4.4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.4.2.1. SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE	296
4.4.2.2. ESTUDIO DE TENSION SUPERFICIAL	297
4.4.2.3. ESTUDIO MEDIANTE TEM	299
4.5 COMENTARIOS ADICIONALES	303
4.6 BIBLIOGRAFÍA	304
5 CONCLUSIONES.	309
6 APÉNDICE A - SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.	315



TESE DE DOUTORAMENTO

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
SURFACTANTES DERIVADOS DE SALES
BILIARES, ADAMANTANOS,
NORBORNANOS, TIOLES,
NANOPARTÍCULAS DE AU Y RESINAS
EPOXI**

Javier Miragaya Otero

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA Y FÍSICA
APLICADA
FACULTADE DE CIENCIAS

LUGO
2015

AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE

D. José Vázquez Tato, Catedrático do Departamento de Química Física e D. Francisco Fraga López, Profesor Titular do Departamento de Física Aplicada.

Como Directores da tese de Doutoramento titulada

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES DERIVADOS DE SALES BILIARES, ADAMANTANOS, NORBORNANOS, TIOLES, NANOPARTÍCULAS DE AU Y RESINAS EPOXI”

Presentada por D. Javier Miragaya Otero

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 Fraga López

**Síntesis y caracterización de
surfactantes derivados de**

sales biliares, éteres corona, adamantanos y cadenas hidrocarbonadas

RESUMO

Esta Tese de doutoramento aborda aspectos da Química supramolecular, Biomimetismo molecular e Fisicoquímica de coloides. O estudo implica o deseño, síntese e caracterización en disolución acuosa de moitos compostos, entre os cales sobresaen derivados de sales biliares; grupos hidrófobos, como adamantanos, norbornanos e derivados con grupos tioles. En comparación cos surfactantes convencionais, algún dos novos compostos presentan unha mellora na capacidade surfactante, e por riba da súa concentración de agregación crítica forman agregados de xeometría variable coma tubos moleculares, vesículas, micelas, xeles, etc. Algúns derivados sintetizados mostran unhas potenciais propiedades para a complexación de ións metálicos. Nalgúns casos, foi posible resolver as estruturas cristalinas dos compostos sintetizados en diferentes disolventes posibilitando comparativas entres as moléculas, hóspedes e estruturas xeneradas. Sintetizáronse derivados de sales biliares con grupos tioles potencialmente activos na estabilización de nanopartículas metálicas como o caso do Au. Tamén se estudou a interacción dos sistemas de nanopartículas de Au con resinas termoestables tipo epoxi abrindo a posibilidade a novas rutas de investigación.

PALABRAS CHAVE

Surfactantes, sales biliares, adamantanos, norbornano, hidroxelos, mezclas catiónicas, nanopartículas, resinas epoxi.

RESUMEN

Esta Tesis doctoral abarca aspectos relacionados con la Química supramolecular, el Biomimetismo molecular y la Fisicoquímica de Coloides. El estudio ha implicado el diseño, síntesis y caracterización en disolución acuosa de muchos compuestos, entre los cuales debemos de destacar derivados de sales biliares, con grupos hidrófobos como adamantanos, norbornanos y con grupos tioles. En comparación con los surfactantes convencionales, algunos de los nuevos compuestos presentan mejoras en cuanto a la capacidad surfactante, por encima de su concentración de agregación crítica forman agregados de geometría variable como puede ser el caso de tubos moleculares, vesículas, micelas, geles, etc. Algunos de los derivados sintetizados muestran potenciales propiedades para la

complejación de iones metálicos. En algunos casos, fue posible resolver las estructuras cristalinas de los compuestos sintetizados en diferentes disolventes posibilitando la realización de comparativas entre las diferentes moléculas, huéspedes y estructuras generadas. Se han sintetizado derivados de sales biliares con grupos tioles potencialmente activos en la estabilización de nanopartículas metálicas como es el caso del Au. También se ha estudiado la interacción de los sistemas de nanopartículas de Au con resinas termoestables tipo epoxi, abriendo la posibilidad a nuevas rutas de investigación.

PALABRAS CHAVE

Surfactantes, sales biliares, adamantanos, norbornano, hidrogeles, mezclas catiónicas, nanopartículas, resinas epoxi.

ABSTRACT

This thesis covers aspects of Supramolecular Chemistry, Molecular Biomimeticism and Physical Chemistry of Colloids. The Study involves the design, synthesis and characterization (in aqueous solution) of derivatives of bile salts, hydrophobic groups such as adamantane, norbornane and thiol groups. Compared to conventional surfactants, any of the new compounds show a better surfactant ability and above their critical aggregation concentrations form aggregates of different geometries as molecular tubes, vesicles, micelles, gels, etc. Some derivatives of the derivatives synthesized show potential properties for metal ion complexation. In some cases it was possible to solve the crystal structures in various solvents enabling performing comparisons between different molecules, hosts and generated structures. Derivatives of bile salts with potentially active thiol groups in stabilizing metal nanoparticles such as Au were synthesized. The interaction of Au nanoparticles and thermosetting epoxy resins was studied allowing new avenues of research.

KEYWORDS

Surfactants, bile salts, adamantane, norbornane, hydrogel, cationic mixture, nanoparticle, epoxy resin.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a los profesores Dr. José Vázquez Tato y Dr. Francisco Fraga López, por su constante ayuda y por sus continuas aportaciones a lo largo de los años que han pasado desde el inicio de esta tesis, cada día ha sido una enseñanza.

Quisiera dar las gracias también a los profesores de la Facultad de Ciencias de Lugo, al Dr. Francisco Meijide del Río, Dr. Julio Antonio Seijas Vázquez, Dra. M^a Pilar Vázquez Tato y Dra. Aida Jover Ramos, por su gran disposición a la hora de colaborar conmigo.

Quisiera agradecer de una manera muy especial al profesor de la Universidad de La Sapienza en Roma, Dr. Luciano Gallantini, por haberme enseñado tantas cosas dentro y fuera del laboratorio, por enseñarme su país durante el tiempo que disfruté allí, por su amabilidad y hospitalidad en todo momento.

También quiero agradecerle a los profesores de la Universidad de La Sapienza en Roma Dr. Viorel Pavel y Claudia Leggio por su acogimiento y enseñanzas durante todo el tiempo que estuve en sus laboratorios.

Y al profesor de la Universidad de Costa Rica Dr. Victor Hugo Soto Tellini, que decir de él, un gran amigo.

Asimismo quiero agradecer a los que fueron mis compañeros de laboratorio durante tanto tiempo, Juan, Santi, Cris, Álvaro y Mercedes ya que con ellos el día a día en el laboratorio se hizo más llevadero y con muchos buenos momentos y recuerdos que perdurarán siempre al igual que el lazo de amistad que nos une.

A toda la gente que conocí en Roma, y que entre pizza y reuniones hicieron que mis estancias allí fueran como estar más cerca de casa.

No debo olvidar a todos los compañeros que han estado en la antigua tercera planta de la Facultad de Ciencias, Laura, Bea, Dani, Belén,... con los que he compartido muchos años de investigación y del día a día, en especial a Ángeles, así como también a aquellos alumnos que han realizado el proyecto fin de carrera en el laboratorio de Química-Física y Física Aplicada, en especial a Adrian, Jesica, Alba y Hugo. También me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que en menor o mayor medida me han ayudado a la realización de este trabajo. Del mismo modo merece mi reconocimiento la RIAIDT de la USC por las facilidades ofrecidas para la obtención de los diferentes espectros e imágenes de microscopía electrónica.

Por último agradezco al Fondo social Europeo y 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-2005-010193) asociada al proyecto de investigación MAT2004-0460.

GLOSARIO

AcOEt	Acetato de etilo
Ad	Adamantano (adamantilo)
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
ar	Aromático
BADGE	Diglicil éter de bisfenol A
BOC	t-butoxicarbonil
CA / AC	Ácido Cólico
<i>cac</i>	Concentración de agregación crítica
<i>cmc</i>	Concentración micelar crítica
CONTIN	Non-negatively constrained least squares: regularized
DC/CD	Dicroísmo Circular
DCA/ADC	Ácido desoxicólico
DEA	Análisis dieléctricos
DEPC	Dietilcianofosfonato
Dh	Diámetro hidrodinámico
DIAD	Di-isopropil azo dicarboxilato
DIBOC	Di-t-Butiloxocarbonil
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DLS (QELS)	Dispersión de luz dinámica
DMA	Análisis dinamomecánico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI-FIA-TOF	<i>Electrospray ionization-flow injection analysis- Time Of Flight</i>
FAB	Bombardeo con Átomos Rápidos
HLB	Balance hidrofília lipofília
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>
m-XDA	metaxililenediamina
m/z	Relación masa/carga
NaC	Colato sódico
NaCDC	Quenodesoxicolato sódico
NaDC	Desoxicolato sódico
n_{ag}	Número de agregación
NNLS	Non-negatively constrained least squares: multiple pass
PPh ₃ (TPP)	Trifenilfosfina
R _h	Radio hidrodinámico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TA	Temperatura Ambiente
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
SB	Sal Biliar
σ_{90}	Polidispersidad a un ángulo de 90°
TEA	Trietilamina

TEM
THF
TLC
TS

Microscopía Electrónica de Transmisión
Tetrahidrofurano
Cromatografía en capa fina
Tensión Superficial



A mi hijo Anxo
(Eres mi luz).

A mis padres Digna M^a y Jesús
(Gracias por vuestro apoyo incondicional y creer en mí).

Festina lente, apresúrate con calma.
(Suetonio)

1

Introducción

Este capítulo trata sobre el tema central de esta tesis. Parte de una breve introducción a la Química supramolecular y los ácidos biliares, para posteriormente ahondar en la agregación de las sales biliares y sus derivados, centrándose principalmente en la formación de cristales, geles y estructuras micelares. También se dedicarán dos apartados a las resinas epoxi y nanopartículas de Au, que serán empleadas conjuntamente con los derivados biliares. Como moléculas funcionales de referencia, tomaremos, fundamentalmente, el ácido cólico y algunos de sus derivados, que nos ayudaran a la comprensión del comportamiento y características de los nuevos compuestos sintetizados en la presente tesis.

Siempre parece imposible hasta que se hace
(Atribuida a Nelson Mandela)

1.1 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

La Ciencia, del latín *scientia*, de *scire*, “conocer” es el conjunto de conocimientos obtenidos mediante la observación y el razonamiento, sistemáticamente estructurados y de los que se deducen principios y leyes generales; los científicos, nos hemos servido de ella a lo largo del tiempo para el entendimiento de la naturaleza, de la que hemos encontrado una fuente continuada de inspiración.

La Química, como ciencia de la estructura, propiedades y transformación de la materia, se encuentra en una posición privilegiada para poder profundizar en este conocimiento y dar respuestas a las preguntas fundamentales a las que la *Química Supramolecular*, como Jean-Marie Lehn¹ ha hecho notar, intenta dar respuesta:

¿Cuáles son los procesos y pasos que conducen desde una partícula elemental a un organismo complejo e inteligente?

¿Cómo hace la materia para volverse compleja?

¿Qué otras formas de materia compleja pueden llegar a crearse?

El término “*supramolecular*” ha sido empleado durante años en el contexto de las estructuras biológicas complejas, sin embargo el empleo de esta terminología para describir interacciones a escala molecular se remonta al discurso del premio nobel Jean-Marie Lehn, en 1987, que la introdujo como la “*química más allá de la molécula*” o “*la química de los enlaces intermoleculares*” allá por el año 1978. Otros términos generalmente empleados para referirnos a la química supramolecular son: los fenómenos de inclusión, la química huésped-receptor o el reconocimiento molecular.²

El nacimiento de este nuevo campo de la Química surge en los años 60, con los trabajos del ya mencionado Jean-Marie Lehn en el campo de los criptandos y de los científicos norteamericanos Charles J. Pedersen y Donal J. Cram en los campos de los éteres corona y los esferandos, trabajos por los cuales recibieron conjuntamente el Premio Nobel de Química en el año citado.

Pero este nuevo campo se basa en tres conceptos establecidos con anterioridad por otros tres brillantes científicos como fueron el entomólogo estadounidense Paul R. Ehrlich (Novel de Medicina en 1908 - Química inmunológica), el químico alemán Hermann E. Fisher (Novel de Química en 1902 - síntesis del grupo de la purina) y el químico suizo Alfred Werner (Novel de Química en 1903 - acoplamiento de átomos en las moléculas), a los que se les atribuyen los conceptos de *ensamblaje (receptor)*, el *reconocimiento* y la *coordinación*, respectivamente.

De la observación detallada de los seres vivos, encontramos el hecho incontestable de que los *sistemas biológicos poseen estructuras supramoleculares*, pudiendo identificarse algunos *rasgos comunes* de este tipo de estructuras en la naturaleza:

- 1- Los sistemas están formados por varios tipos de moléculas.
- 2- Poseen estructuras de autoensamblaje en ocasiones coordinadas con un orden jerarquizado a nivel nanométrico o a mayor escala.
- 3- Usan interacciones integradas y sinérgicas que contienen múltiples rutas de reacción para una misma señal.
- 4- Son capaces de cambiar dinámicamente su reactividad.
- 5- Las interacciones débiles, como las hidrófobas, poseen una gran importancia para la supervivencia del sistema.

El concepto de química supramolecular alcanza cada vez mayor relevancia al incluir el acto implícito del diseño, ya sea en el uso de moléculas existentes, la síntesis de nuevas moléculas o el ensamblaje de moléculas para la obtención de moléculas con características apropiadas y propiedades específicas y deseables.³

La *Química supramolecular* es única desde el punto de vista de que es una química de integración, no de reducción³, en la cual las fuerzas intermoleculares no-covalentes juegan un papel fundamental, al ser las responsables directas de la formación de los sistemas de organización polimoleculares, como se ha comentado anteriormente. Por ello, a diferencia de la química molecular, la cual está basada fundamentalmente en el enlace covalente, la química supramolecular tiene como objetivos las asociaciones moleculares y los enlaces intermoleculares (Figura 1.1).

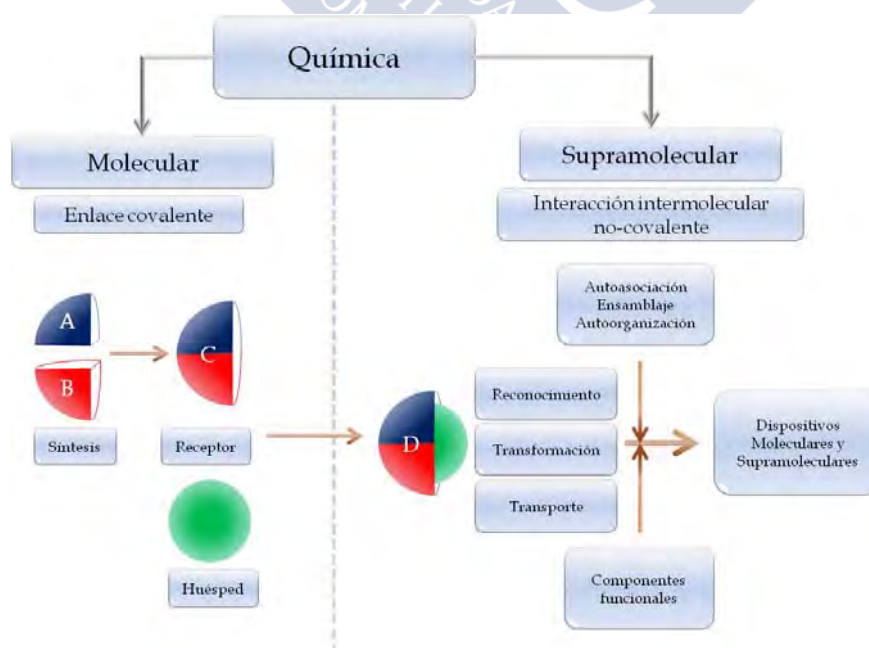


Fig.1.1 - Comparación entre la Química Molecular y Supramolecular.

Durante los años 90, el progreso en la *Química Supramolecular* cobra una gran relevancia al dirigirse hacia el nuevo campo de la *Arquitectura Supramolecular*, tratando de imitar a los sistemas supramoleculares naturales. Así, los nuevos métodos sintéticos basados en la química supramolecular han creado novedosas estructuras ramificadas, cíclicas, entrecruzadas, en estrella, dendríticas (Figura 1.2), etc. Estas nuevas arquitecturas macromoleculares se caracterizan porque son principalmente construidas por interacciones inter- e intramoleculares.³

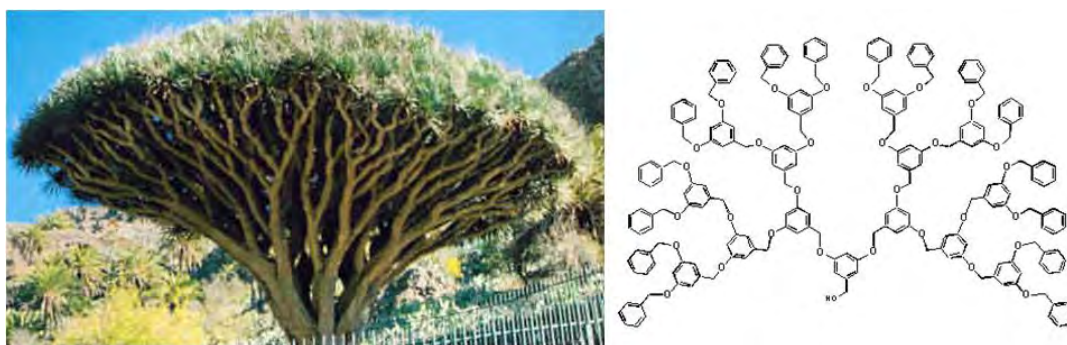


Fig. 1.2 - Similitud entre un árbol y una estructura dendrítica.

Mediante la manipulación de estas interacciones, este campo de la química está evolucionando hacia la *Química de la Información Molecular*; implicando el almacenamiento de información a nivel molecular, su recuperación, transferencia y procesado a nivel supramolecular. Para ello, opera a través de sucesos de reconocimiento molecular basados en interacciones bien definidas (de enlaces de hidrógeno, secuencias de grupos donantes/aceptores, etc.).

Un buen ejemplo del impacto de la investigación supramolecular en este campo, lo encontramos en el diseño y la síntesis de moléculas que responden a analitos determinados, ya que existen un gran número de procesos biológicos vitales que se basan en el reconocimiento y transporte de aniones determinados como sulfatos, fosfatos, carbonatos y cloruros. Como es el caso del movimiento de fosfolípidos mediante el reconocimiento de los grupos de cabeza de fosfatidilserina cargados negativamente. Así la búsqueda de un receptor adecuado para un analito, se puede considerar como un ejercicio propio dentro de la química supramolecular⁴ (Figura 1.3).

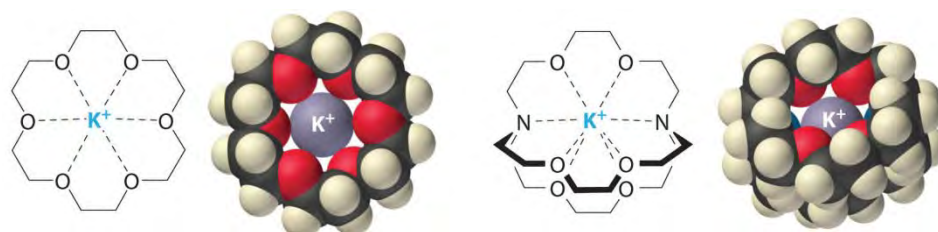


Fig. 1.3 - Complejos éter corona y criptando con iones K^+ .

La *Química Supramolecular* será pues la encargada del estudio del reconocimiento, coordinación y fijación de especies moleculares e iónicas, entendiéndose por reconocimiento molecular a los procesos que conducen a la unión de dos o más entidades (moléculas, iones, átomos) por fuerzas no covalentes (electrostáticas, interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals, enlace de hidrógeno, efecto hidrófobo, etc.). También se ocupará del estudio de estas estructuras complejas.

Desde un punto de vista termodinámico, deben considerarse las contribuciones de la entalpía y la entropía a la estabilidad y formación de las estructuras supramoleculares. En particular, la liberación de moléculas de agua estructurales de un determinado sistema molecular es un fenómeno ampliamente estudiado en sistemas hidrófobos que incrementa la entropía del sistema.³

La creación de ensamblajes entre moléculas mediante fuerzas intermoleculares es una de las posibilidades más factibles para la construcción de arquitecturas supramoleculares. Un buen ejemplo es la química de las ciclodextrinas, muy representativa de esta área de investigación, y que han sido ampliamente usadas como un modelo apropiado de enzimas artificiales. Los fenómenos interfaciales como la formación de bicapas lipídicas y micelas en moléculas tensioactivas, han sido también extensamente estudiados. El tamaño y escala de los ensamblajes moleculares han ido en aumento a lo largo de estos últimos años, por lo que la Química Supramolecular se encuentra una situación privilegiada para su desarrollo en el campo de los biomateriales.

A continuación (Tabla 1.1) se muestra un resumen de los conceptos y estructuras adoptadas para diferentes arquitecturas supramoleculares²:

Arquitectura	Descripción	Ejemplo
Ensamblaje molecular mediante química huésped-hospedador	Complejos organizados mediante interacciones intermoleculares entre moléculas con una estructura definida	
Moléculas inter-bloqueadas	Moléculas físicamente bloqueadas o atrapadas como los rotaxanos, catenanos o knots (nudos)	
Películas Langmuir-Blodgett - liposomas	Arquitecturas de dos o tres dimensiones via interacciones hidrofobas (lipófilas) entre compuestos surfactantes	
Cristales líquidos	Estado líquido-cristalino alcanzado por compuestos mesogénicos o asociaciones moleculares	
Membranas de ensamblaje auto-organizado (SAM)	Monocapas organizadas derivadas de la interacción de la superficie con los grupos terminales de las moléculas	
Micelas poliméricas	Asociación cerrada de polímeros por interacciones inter- o intramoleculares en disolución	
Estructuras de microfases separadas	Separación de fases originada por la inmiscibilidad inter- o intramolecular de copolímeros, mezclas de polímeros para inducir microestructuras	
Estructuras gel enlazadas	Redes poliméricas entrecruzadas tridimensionalmente que contienen disolventes, y redes mutuamente enlazadas	
Membranas alternativas de absorción	Estructuras capa por capa producidas con dos o más componentes por repetición de diferentes absorbentes	
Dendrímeros y fullerenos	Moléculas con grandes estructuras ordenadas construidas mediante enlaces covalentes	
Moléculas biológicas	Proteínas, ácidos nucleicos, etc. que tienen estructuras tridimensionales ordenadas y sus asociaciones.	

Tabla 1.1 – Resumen de arquitecturas supramoleculares.

En nuestro continuo proceso de aprendizaje, observamos que la naturaleza sabe aprovechar al máximo las ventajas de las estructuras supramoleculares. Una molécula de ADN soporta toda la información unidimensional sobre el cuerpo humano, el cual posee arquitectura tridimensional. La información transportada por el ADN, es heredada por el ARN y trasladada mientras todavía posee estado unidimensional. Finalmente, estas moléculas unidimensionales realizan varias funciones para la formación de estructuras tridimensionales ordenadas.

Las proteínas poseen también estructuras moleculares primarias unidimensionales, estructuras secundarias, llamadas α -hélices o β -láminas, estructuras terciarias las cuales son formadas por el ensamblaje de las estructuras secundarias, y estructuras cuaternarias. Estas estructuras jerarquizadas son formadas principalmente por interacciones no-covalentes y enlaces disulfuro; de ahí *la importancia de que determinados grupos funcionales y/o residuos estén ordenados espacialmente en posiciones concretas dentro de estas estructuras tridimensionales*. Este es un *factor clave* para el *reconocimiento específico* de la estructura química de la sustancia.³

Otro papel importante de la *estructura supramolecular* en la naturaleza es su *carácter dinámico*. Desde el *reconocimiento*, por parte de las enzimas de los sustratos a través de interacciones no covalentes, los sustratos pueden disociarse después de las reacciones, y los enzimas liberados, pueden actuar de nuevo sobre otros sustratos. Algunas proteínas cambian sus estructuras tridimensionales para tener diferentes actividades mediante fosforilación. Estos cambios de actividad son reversibles en respuesta a procesos de fosforilación/desfosforilación en zonas específicas de las proteínas, esta *reversibilidad* constituye una de las características básicas de las acciones biológicas.

La división celular puede ser realizada debido a que las membranas plasmáticas están formadas mediante interacciones hidrófobas débiles de fosfolípidos. Las unidades óseas formadas de fibras de colágeno con cristales de hidroxiapatita producen la reabsorción del hueso y osteogénesis. Estas actividades no pueden ser realizadas si hablamos de enlaces covalentes debido a que su fortaleza dificultaría su disociación bajo condiciones fisiológicas. Además, los organismos vivos necesitan estructuras supramoleculares para la realización de funciones complejas que no pueden ser realizadas mediante enlaces covalentes. Por tanto, la estructura supramolecular se presenta como indispensable para la formación de estructuras tridimensionales utilizando información unidimensional.²

La Química Supramolecular ha alcanzado, absorbido y unificado aspectos de la química-física, química orgánica, bioquímica, química inorgánica y la química de polímeros, las cuales eran consideradas hasta no hace mucho como especialidades científicas independientes.

1.2 ÁCIDOS Y SALES BILIARES

La formación de bilis es esencial para una digestión normal, la absorción de lípidos a nivel intestinal, la homeostasis del colesterol y para la excreción hepática de xenobióticos solubles en grasas, los fármacos y los metales pesados.

La bilis secretada por el hígado, está compuesta principalmente por ~67% de sales biliares, fosfolípidos, colesterol, proteínas y agua. Así la composición de la secreción biliar (0.5-1L/día) constaría mayoritariamente de los siguientes componentes: electrolitos iónicos y aniones inorgánicos como el Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , ácidos biliares, bilirrubina, lípidos como la lecitina, colesterol, proteínas, y péptidos y aminos como el glutatión, el glutamato, el aspartato y la glicina.

Los ácidos biliares son compuestos esteroideos anfipáticos, derivados del colesterol mediante catálisis enzimática en el hígado.

Su síntesis, puede ser dividida en una ruta clásica y otra alternativa (véase la Figura 1.4).

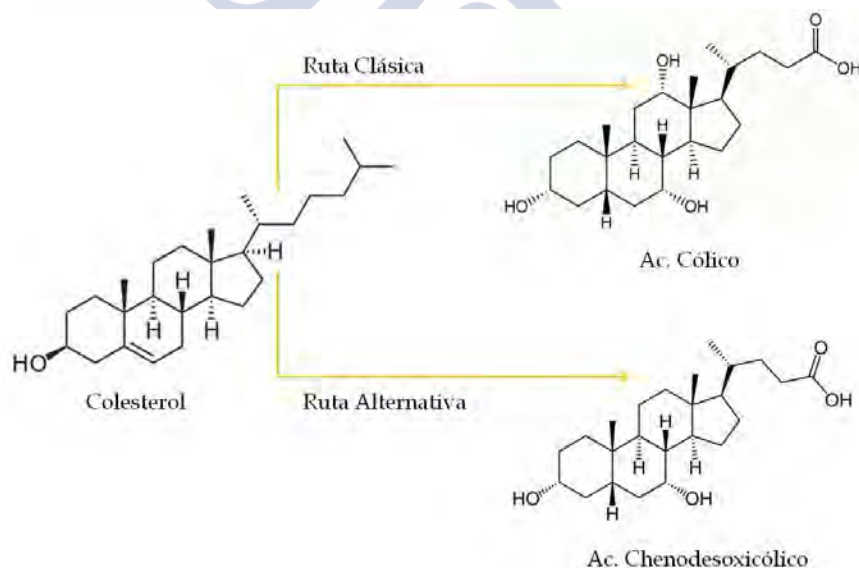


Fig. 1.4 - Formación de ácidos biliares primarios a partir del colesterol.

La ruta clásica, conduce a la formación de ácido cólico a partir de colesterol en un 90%, mientras que la ruta alternativa, conduce principalmente a la formación de ácido chenodesoxicólico. Por ello, en el cuerpo humano los ácidos biliares principales son el ácido cólico (ácido 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colanoico) en un 70% junto con sus metabolitos y el ácido chenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colanoico) que completa el 30% restante. Estos ácidos biliares primarios son sintetizados en los hepatocitos (células del hígado) y conjugados en el grupo carboxílico terminal (C₂₄) con

los aminoácidos taurina y glicina dando lugar a sus correspondientes derivados (véase la Figura 1.5).

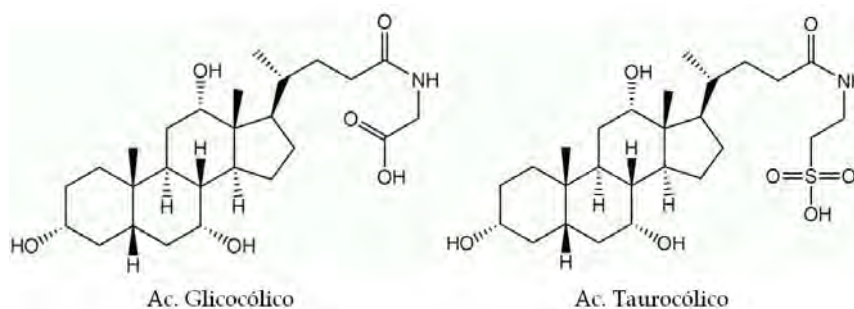


Fig. 1.5 - Glico y Tauro derivados del ácido cólico

Esta amidación, aumenta el carácter anfipático y disminuye la constante de ionización de los ácidos biliares, proporcionándoles un mayor carácter hidrófilo y una mayor facilidad para ser excretados en la bilis. Los glicoconjugados, que son predominantes en los humanos, y los tauroconjugados, predominantes en los roedores, poseen valores de pK_a de 4 y 2 respectivamente, existiendo al pH fisiológico, en sus formas de sales aniónicas, a estas especies se las conoce como *sales biliares primarias*. Las restantes sales biliares, se obtienen a partir de estas dos mediante diferentes procesos químicos a lo largo del aparato digestivo, denominándose las *sales biliares secundarias* (véase la Figura 1.6).

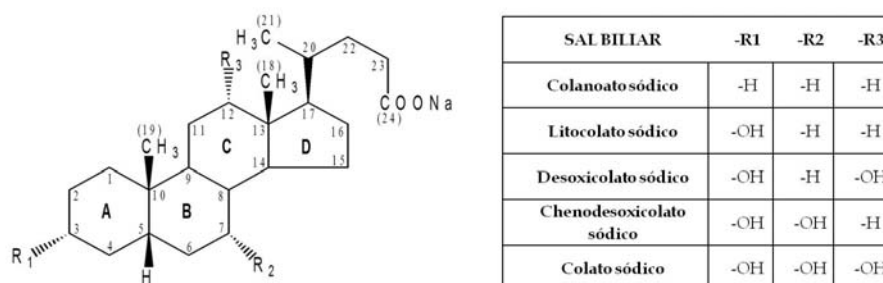


Fig. 1.6 - Sales biliares primarias y secundarias

Las sales biliares son el mayor soluto orgánico en la bilis, y su secreción a la sangre, representa la mayor fuerza estimuladora para la formación de bilis hepática. Aunque la bilis es isoosmótica con el plasma, las sales biliares se encuentran más concentradas en ésta, por lo que se necesita un transporte activo en los hepatocitos contra este gradiente de concentración. A modo de ejemplo nos encontramos con que en la vesícula biliar la concentración de sales biliares se sitúa entre 10-50 mM y fuera de esta es inferior a 4 mM.²¹

Después de su secreción, las sales biliares viajan a través de una serie de conductos biliares para ser almacenadas en la vesícula biliar, la cual, en respuesta a un estímulo

por la presencia de alimentos en el duodeno, vacía su contenido en el mismo, donde las sales biliares jugarán un papel muy importante en la digestión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas, como las vitaminas A, D, E y K. La mayoría de estos componentes de los jugos digestivos son reabsorbidos a lo largo de todo el tracto intestinal pasando por el duodeno, el yeyuno y siendo absorbidos mayoritariamente en el ileón. Es en esta parte baja del intestino delgado, donde ciertos microorganismos producen la biotransformación de los ácidos biliares primarios y de sus glico o tauro derivados. Estos procesos consisten básicamente en la ruptura de los enlaces amida que unen los aminoácidos taurina y glicina, la deshidroxilación de la posición 7 α y la oxidación de la posición 12, (véase las Figura 1.6 y 1.7).⁵

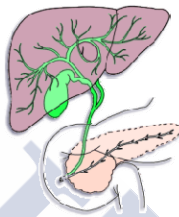


Fig. 1.7 - Imagen del hígado, vesícula biliar, conductos biliares e intestino delgado.

Las propiedades de detergencia de las sales biliares ayudan a la solubilización de fosfolípidos biliares y del colesterol, mediante la formación de micelas mixtas. Se cree que el colesterol y la lecitina son secretados por las células hepáticas, en forma de vesículas unilamelares termodinámicamente metaestables, mientras que las sales biliares anfifílicas son liberadas independientemente por rutas diferentes. Estas vesículas secretadas son después solubilizadas parcialmente por las sales biliares para la formación de las ya mencionadas micelas mixtas (Figura 1.8). Además, el agua es absorbida por la bilis durante este proceso y su efecto en la concentración ayuda a la transformación de las vesículas en micelas.⁶

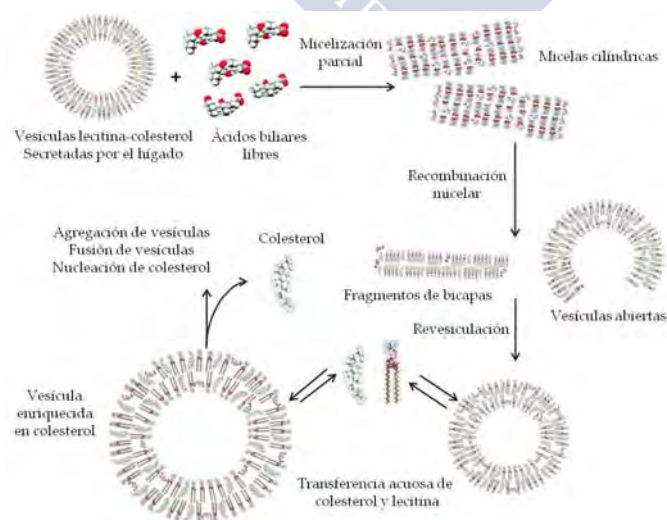


Fig. 1.8 - Hipotético proceso de formación de micelas mixtas.

Las sales biliares intraduodenales regulan las secreciones pancreáticas y la liberación de péptidos gastrointestinales. La gran mayoría de las sales biliares son eficientemente reabsorbidas a través de una combinación de absorciones mediante diferentes mecanismos independientes o dependientes de equilibrios con el Na^+ a lo largo del intestino delgado.⁷ Las sales biliares absorbidas son devueltas al hígado mediante la circulación portal y secretadas de nuevo a la bilis. Este flujo continuo de sales biliares, que está limitado a los hepatocitos, conductos biliares, el intestino y la sangre portal, es denominado *circulación enterohepática* (Figura 1.9). Esta eficiente circulación enterohepática asegura que del total de sales biliares de un humano adulto (3-4 g), que circulan de 6-8 veces cada 24 h a través de la ruta enterohepática, únicamente se pierdan en torno a 0,5 g de sales biliares por día mediante excreción fecal, representando un 5% del total. Esta pérdida es compensada por la síntesis de nueva sal biliar hepática a partir del colesterol, representando ésta solo un 3% de la sal biliar secretada con la bilis hepática y situándose como una ruta importante para la eliminación de colesterol del cuerpo.⁸

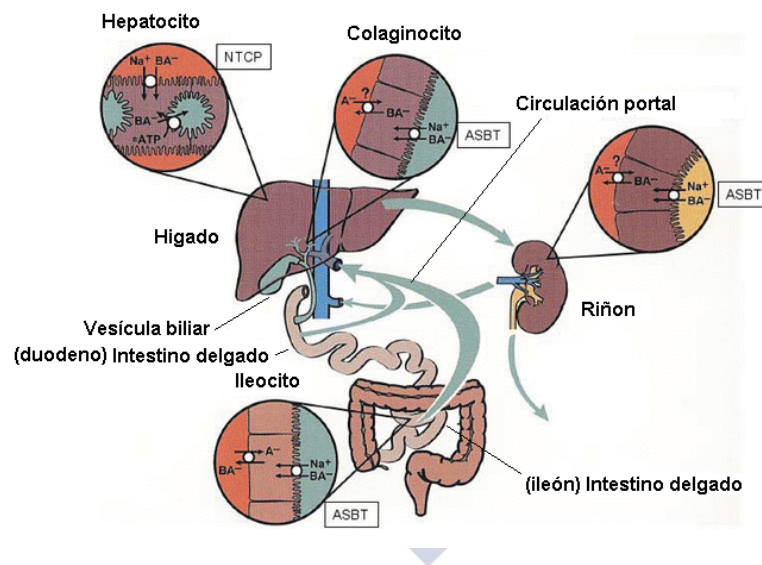


Fig. 1.9 - Circulación enterohepática de sales biliares.

La adición de colesterol a las vesículas de lecitina reduce drásticamente su salida y aumenta la cantidad de sal biliar necesaria para la completa solubilización de la vesícula. También se observa que *las sales biliares más hidrófobas* regulan la metaestabilidad vesicular del colesterol mediante la modulación de la hidrofobia de fosfolípidos en las vesículas. *Inducen* pues, *al crecimiento vesicular* y a unas *relaciones más bajas de sal biliar/lecitina*.⁹ Diferentes estudios demuestran que los balances hidrofilia-lipofilia de mezclas de sales biliares pueden afectar directamente en los primeros momentos de la formación de cálculos biliares de colesterol. Si en un sistema ternario sal biliar-lecitina-agua se añade colesterol, el diagrama de fases del mismo cambia

drásticamente, pudiendo sobrepasar la solubilidad micelar crítica, lo que conduciría a la aparición de cristales de colesterol (Figura 1.10). También se cree que las vesículas ricas en colesterol tienden a agregarse y a fundirse en la bilis formando rápidamente núcleos de cristales de colesterol monohidratados.¹⁰

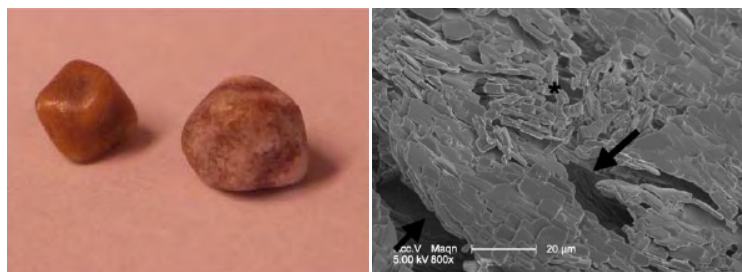


Fig. 1.10 - Cálculo biliar e imagen SEM donde las flechas y el asterisco indican láminas de cristales de colesterol¹¹.

Teniendo en cuenta todos los aspectos vistos hasta este momento, el significado fisiológico de la secreción de las sales biliares puede resumirse en los siguientes puntos:

- Su síntesis y excreción fecal representa una *vía muy relevante de excreción de colesterol* corporal en exceso.
- Las sales biliares y la lecitina en la bilis solubilizan el colesterol biliar, *evitando que precipite el colesterol* en la vía biliar.
- *Facilita la digestión de lípidos dietéticos* (triglicéridos) junto al jugo pancreático.
- *Facilitan la absorción de vitaminas liposolubles*.

También hay que tener en cuenta que debido a su gran poder surfactante, las sales biliares pueden volverse potencialmente tóxicas, ya que todas las membranas biológicas están compuestas de una gran cantidad de fosfolípidos y colesterol, que pueden llegar a ser solubilizados por las sales biliares, produciendo una pérdida en la capacidad de permeabilización de las membranas. Los daños causados por las sales biliares juegan un papel importante en una variedad de enfermedades que van desde desajustes *colestásicos* (obstrucción del flujo de la bilis) en el hígado y *colecistitis* (presencia de cálculos biliares) a *pancreatitis* (inflamación del páncreas por problemas en las vías biliares entre otros), desajustes en el reflujo gatroesofageal y desórdenes diarreicos.

Los derivados de sales biliares como ya se ha visto tienen importantes funciones fisiológicas y biológicas. En particular, los derivados basados en colatos, debido a su estructura rígida, presentan ciertas ventajas al no desnaturalizar fácilmente las proteínas, adquiriendo un papel importante en el campo de las membranas proteicas. Algunos de los *derivados basados en colatos* se pueden presentar como *agentes potencialmente terapéuticos* útiles en un amplio abanico de aplicaciones como la *reducción*

*del colesterol, disolución de cálculos hepáticos, asistentes en la absorción de fármacos, actividades antimicrobianas,¹² como agentes reductores de radicales libres,¹³⁻¹⁴ actividad antibacterial,¹⁴⁻¹⁵ agentes sinergistas de fármacos anticancerígenos,¹⁶⁻¹⁷ reconocimiento aniónico,¹⁸⁻¹⁹ transportadores de iones, química combinatoria, fusión vesicular, desarrollo de permeabilidad de membranas,²⁰ etc. Debido a su característica estructura y su posibilidad comercial, el ácido cólico es un popular bloque básico en la *Química Supramolecular*, presentándose recientemente como base adecuada en la construcción de nuevos compuestos anfífilos sensibles a estímulos del entorno como los presentados en la presente tesis.¹²*



1.3 AGREGACIÓN EN SOLUCIONES

El proceso de agregación espontáneo por el cual unidades moleculares sencillas se unen formando estructuras de mayor tamaño en disolución con un orden determinado es un fenómeno de gran importancia en la vida diaria y en la naturaleza. Es bien conocida la formación de micelas por parte de las moléculas que forman parte de los detergentes o el tipo más importante de agregación, esencial para la vida, como es la formación de las membranas de bicapas lipídicas por los fosfolípidos como ya mencionamos anteriormente. Todos estos fenómenos han inspirado a científicos de todo el mundo a tratar de imitar y estudiar estos y otros tipos de agregados.²¹

Disciplinas como la Biología, Física, Química, Farmacología, Ciencia de materiales, Ingeniería... entre otras, son combinadas para alcanzar mejoras en la calidad de la agricultura, medio ambiente, biotecnología, procesos y productos biomédicos así como en productos comestibles y farmacéuticos. En todas estas áreas los *coloides* y las interfaces están casi siempre presentes.

Así pues, la Real Academia Española define los *coloides* como “la dispersión de partículas o macromoléculas en un medio continuo”, mientras que el término *macromolécula* lo define como “una molécula de gran tamaño, generalmente de muy elevado peso molecular y de origen natural o sintético”. Por ello, aún siendo entidades diferentes, los sistemas coloidales y las macromoléculas se rigen por muchas leyes comunes.

Las unidades estructurales presentes en los coloides (macromoléculas y sistemas multifásicos finamente divididos) se encuentran en el rango de 1nm-10 μm (Figura 1.11).

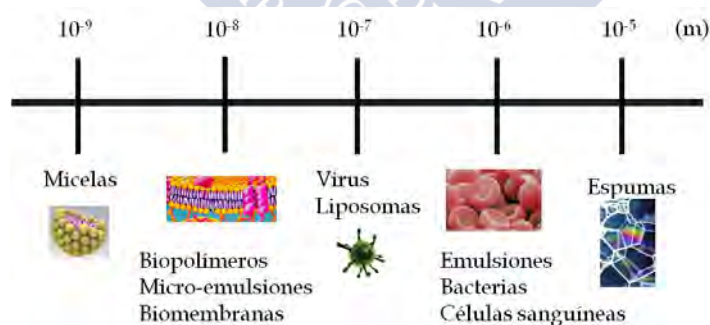


Fig. 1.11 - Sistemas biológicos pertenecientes al dominio coloidal.

En los sistemas coloidales no se produce una mezcla homogénea de soluto y disolvente, por lo que no es una verdadera disolución, lo que le confiere características diferenciadoras como pueden ser la capacidad de reducir tensiones superficiales o interfaciales entre otras.

La agregación de moléculas a menudo tiene lugar al límite de la solubilidad. Jugando la polaridad un papel importante en este punto, así podemos diferenciar dos grandes grupos de compuestos, los liófilos (apolares) y los liófilos (polares), los primeros son fácilmente miscibles con el disolvente apolar y termodinámicamente estables, mientras que los liófilos tienen características opuestas a los anteriores.

Una característica destacable de los compuestos con los que trabajamos en esta tesis es que presentan propiedades anfífilas, contienen partes polares y apolares en la misma molécula, lo que les proporciona comportamientos especiales y característicos. Este tipo de compuestos también son denominados surfactantes y tienden a acomodarse en regiones propias a sus características, como son las interfases entre dos medios.

Cuando este tipo de moléculas anfífilas se ubican en un disolvente, la tendencia de las mismas es la de minimizar las interacciones desfavorables polares-apolares, por lo que tienden a dar origen a diferentes tipos de agregados como pueden ser las micelas. Habitualmente, este fenómeno sucede en el entorno de una determinada concentración conocida como concentración de agregación crítica o *cac*. También es necesaria una temperatura mínima para asegurar la solubilidad del surfactante a la *cac*. (A esta temperatura se la conoce con el nombre de *Punto de Kraft*, en el que coexisten los monómeros de surfactante, las micelas y una suspensión cristalina de moléculas de surfactante). Se observa que al aumentar la longitud del grupo lipófilo o el peso de éste, se produce un aumento en la temperatura de Kraft, hecho que pueden ser contrastados experimentalmente. Para la mayoría de las sales biliares el punto de Kraft es inferior a 0 °C.

En este punto, debemos diferenciar varios aspectos relevantes, como que las *propiedades físicas de las macromoléculas*, tales como sedimentación, difusión y dispersión de la luz, son muy *similares a las encontradas en los sistemas coloidales*. Durante muchos años las macromoléculas fueron consideradas como asociaciones de coloides o sistemas coloidales liófilos, pero *las macromoléculas no son coloides*, ya que estos se forman a partir de la agregación de pequeñas moléculas, debido al balance entre fuerzas atractivas débiles (como las fuerzas de Van der Waals) y fuerzas repulsivas. La agregación depende en su mayor parte del entorno físico, particularmente el disolvente, por lo que cambios en éste pueden conducir a cambios drásticos en la agregación.

Por otra parte, las macromoléculas se forman a partir de la repetición de muchas pequeñas moléculas, enlazadas entre sí mediante enlaces covalentes, por lo que deben ser contempladas como una entidad y no como un agregado. Si se producen cambios en el disolvente, a diferencia de lo que ocurriría con los sistemas coloidales, las macromoléculas mantienen su identidad a menos que se produzcan rupturas en los enlaces covalentes, lo cual requiere condiciones relativamente más drásticas que para producir la desagregación de un sistema coloidal.

Básicamente, podemos encontrar dos tipos de macromoléculas: *polímeros sintéticos* (como pueden ser las resinas epoxídicas empleadas al final de la presente tesis) y *polímeros biológicos*, siendo los primeros aquellos que no existen como tales en la naturaleza ya que son elaborados por el hombre. Los polímeros biológicos existen en la naturaleza pero también pueden ser sintetizados en el laboratorio.

Podemos considerar que existen tres disciplinas científicas que van a abordar diferentes aspectos comunes tanto de los sistemas coloidales como las macromoléculas. Estas son *la ciencia de coloides*, *la ciencia de fenómenos de superficie* y *la ciencia macromolecular*.

La ciencia de coloides abarca el estudio de las propiedades físicas, mecánicas y químicas de los sistemas coloidales. La ciencia de fenómenos de superficie comprende los fenómenos desarrollados en las superficies macroscópicas y la ciencia macromolecular investiga los métodos de síntesis en el caso de los polímeros sintéticos (o el aislamiento y purificación en el caso de productos naturales como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos) y la caracterización de las macromoléculas.

Con todas las consideraciones realizadas hasta el momento, para entender los tipos de agregados que se forman a partir de las sales biliares y sus derivados, se considera oportuno hacer una breve introducción a la geometría y características de la molécula base de partida para nuestro trabajo.

El colato sódico o ácido cólico, en su forma ácida, presenta una serie de características estructurales que le confiere unas propiedades surfactantes idóneas para el correcto funcionamiento del sistema hepático-digestivo, como ya hemos visto con anterioridad. Las propiedades surfactantes del mismo son debidas en gran parte, a su configuración *cis* que presenta la unión entre los anillos A y B del núcleo esteroideo, permitiendo una minimización de las distancias entre los grupos hidroxilo (del orden de 5 Å), entre las posiciones 3, 7 y 12 (Figura 1.12). Estos grupos le confieren a la molécula un cierto carácter polar. Por todo ello, este tipo de moléculas presentan dos caras o regiones opuestas: una cara α (polar) definida por los grupos hidroxilo y el grupo carboxílico y una cara β (apolar) que viene determinada por los anillos hidrocarbonatos A, B, C y D del núcleo esteroideo, así como por los grupos metilos de las posiciones 10 y 13 (Figura 1.13).

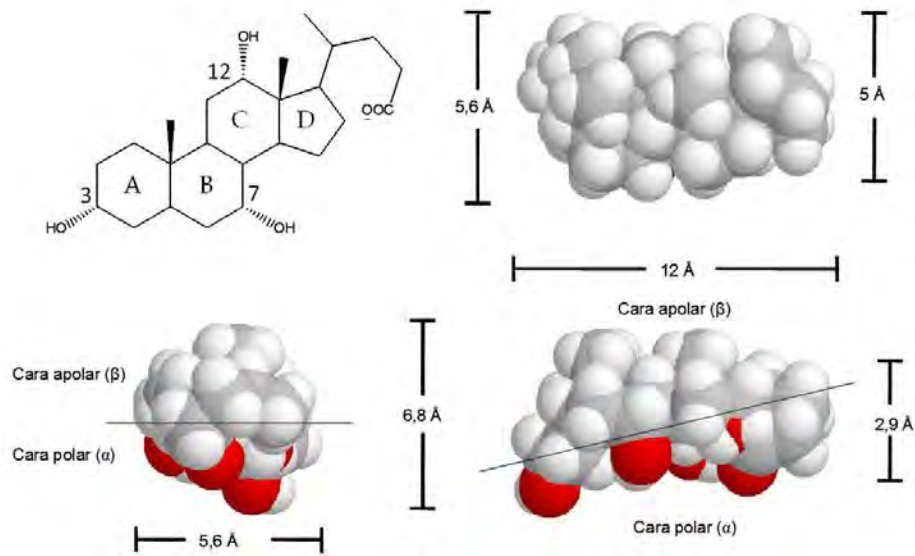


Fig. 1.12 - Dimensiones y geometría del colato sódico con la cadena lateral plegada

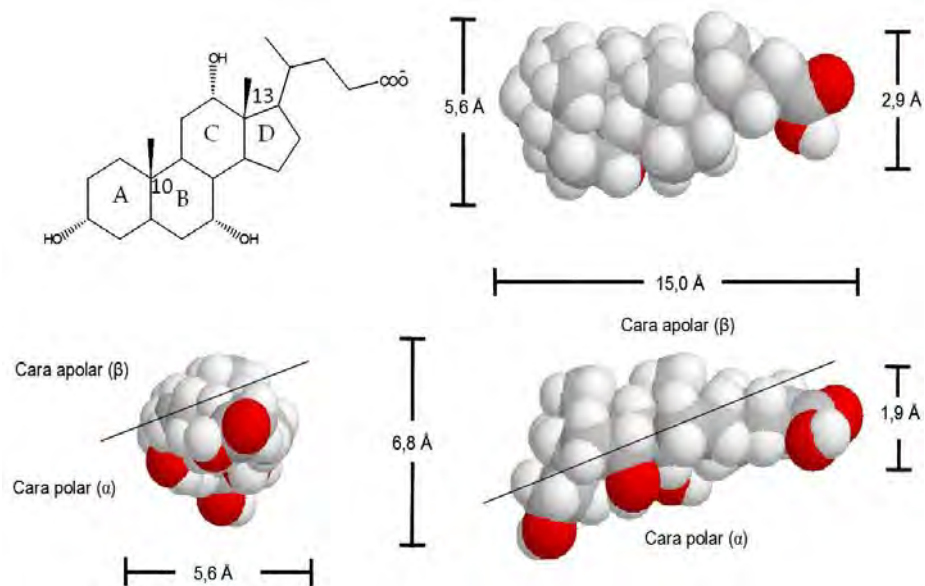


Fig. 1.13 - Dimensiones y geometría del colato sódico con la cadena lateral estirada.

Estas características van a dotar a las sales biliares derivadas del colato sódico de unas propiedades surfactantes muy interesantes frente a otro tipo de sales biliares como las mono o dihidroxílicas que poseen un carácter polar menor.

Se ha visto que los grupos hidroxilo del ácido cólico pueden tener interacciones específicas, como aquellas encontradas en compuestos de inclusión, organogelificantes y bases receptoras, además de presentar diferente reactividad en cada uno de los grupos.

La oxidación de los grupos hidroxilo (formación de oxosales biliares), su sulfonación o su sustitución por azúcares, son modificaciones que se hacen de manera usual. La amidación del grupo carboxilo con aminoácidos como glicina o taurina, también contribuye a cambios en el balance hidrófilo-lipófilo de las sales biliares. Así los tauroderivados son más hidrófilos que los glicoderivados, los cuales a su vez son más hidrófilos que las sales biliares originales.

Si la cara α presenta varios grupos polares, el balance hidrófilo-hidrófobo, conocido como HLB será elevado, reflejando una notable diferencia de polaridad respecto a la cara β . Si la cara α no presenta más que un grupo polar o varios grupos pero de escasa polaridad, el HLB será bajo y significa que la molécula será poco polar. Evidentemente, el HLB de las sales biliares trihidroxílicas es mayor que el de las dihidroxílicas y éste, a su vez, es mayor que el de las sales biliares monohidroxílicas que presentan ya un marcado carácter apolar.

La polaridad de las sales biliares además de depender del número de grupos polares presente en la molécula también dependerá de la posición que ocupen éstos, disminuyendo aquella según el orden $3 \approx 6 > 7 > 12$. Por otra parte, si la orientación de tales grupos es ecuatorial (es decir, hacia la cara β), disminuye el HLB. Por el contrario, el carácter hidrófilo de la molécula aumenta cuando dichos grupos están en posiciones axiales (es decir, hacia la cara α).

Así, todos los derivados sintetizados en este trabajo van a presentar una variación clara en la polaridad de la molécula de partida, así como de la naturaleza y del tamaño de la cadena lateral. Ello puede convertirlas en buenos modelos de moléculas huésped, para estudiar su efecto en la complejación con diferentes tipos de compuestos como podrían ser las ciclodextrinas²², o para la realización de estudios comparativos de comportamiento entre diversas moléculas sintetizadas.

1.3.1 AGREGACIÓN EN AGUA

Debido a su carácter anfifílico, las sales biliares presentan un comportamiento autoasociativo dando origen a agregados en disolución acuosa. Mediante el conocimiento de las propiedades de agregación en disolución, podremos predecir las condiciones experimentales bajo las cuales tendremos el sistema en forma de monómeros libres o formando diferentes tipos de agregados.

A consecuencia de sus propiedades surfactantes estas sustancias se adsorberán sobre la superficie, o interfase, por lo que su efecto se relacionará con el recubrimiento de dicha superficie. Además de la adsorción también son capaces de asociarse para formar los ya denominados polímeros de agregación o auto-asociación conocidos con el nombre de *micelas*. Tanto la capacidad de agregación como la de adsorción serán

factores limitantes a la hora de determinar las propiedades de las disoluciones de las sales biliares.

Las micelas se forman espontáneamente, constituyendo un sistema dinámico con tiempos de vida del orden de los milisegundos. Los monómeros están continuamente intercambiándose con el medio que los rodea, con tiempos de residencia en la micela del orden de microsegundos.^{21,23}

En medio acuoso la zona polar estará orientada hacia el exterior de la micela, para un completo contacto con el agua que la rodea y la parte más hidrófoba hacia el interior generando una región más apolar. Las fuerzas que conducen a la micelización espontánea están motivadas por el efecto hidrófobo o la tendencia que tienen las moléculas o regiones apolares de estas a interactuar entre sí preferentemente que con las moléculas de agua.

Cuando las moléculas están libres en el agua, las zonas hidrófobas se encuentran hidratadas. Esto implica el aumento de las interacciones de enlaces de hidrógeno y la pérdida de movilidad de las moléculas de agua de hidratación con respecto a la situación de agua libre. Por otro lado, cuando ocurre la formación de las micelas, cobra una mayor relevancia las interacciones por fuerzas de Van der Waals entre las zonas hidrófobas de las moléculas, disminuyendo la hidratación anteriormente mencionada.²¹

La consecuencia de la ruptura de los enlaces de hidrógeno produce un efecto entálpico desfavorable, que es compensado por la ganancia de entropía debida al aumento de moléculas de agua libres. Esto también compensa dos efectos de menor magnitud como son: la pérdida de entropía de las zonas hidrófobas y el aumento entálpico debido a las repulsiones de las zonas polares, especialmente cuando los compuestos son iónicos. Sin embargo, la unión de contraiones en este último caso, también atenúa esta repulsión al disminuir totalmente la carga superficial.²¹

Kawamura *et al* han propuesto un modelo de agregación de las sales biliares en forma de disco, con la cara apolar de las mismas dirigida hacia el interior de la micela y las caras polares en contacto con el medio que la rodea (Figura 1.14). El modelo está avalado por datos experimentales de fluorescencia, descenso del punto de congelación, determinación de la actividad de iones sodio (pNa), etc.²³

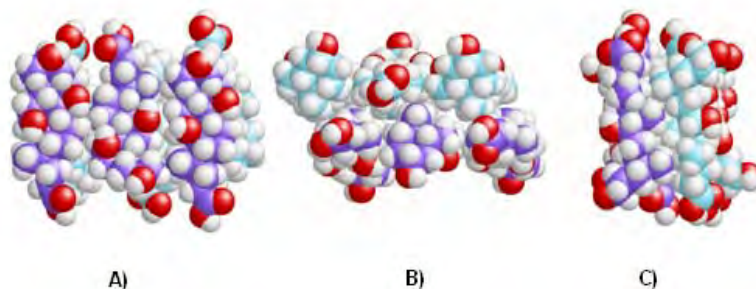


Fig. 1.14 - Modelo de Kawamura, A) Vista frontal B) Superior y C) lateral.

A modo de ejemplo encontramos datos bibliográficos en los cuales la *cac* para el colato sódico, con una concentración 0,15 M de NaCl (pH=7), es de 7-8 mM (Tabla 1.2).¹⁸ En otros artículos, los valores de *cmc* para el colato sódico se sitúan entre 13-20 mM, resaltando que la adición de dímeros de ácidos biliares derivados del ácido cólico disminuyen la *cmc* del colato sódico.²¹

Los valores de la *cmc* de las sales biliares trihidroxílicas son generalmente superiores a los de las dihidroxílicas. La *cmc* en el caso de amino ácidos derivados de ácido cólico y desoxicólico es más baja que para los respectivos ácidos biliares libres²⁴.

	<i>pKa</i>	<i>cac</i> (mM)
Colato Sódico	4.63	11
B-alanina conjugada con ácido cólico	4.46	6
L-feinilalanina conjugada con ácido cólico	4.18	10

Tabla 1.2 - *cac* y *pKa* del colato sódico y derivados.

Hendra M. Willemen y col. han estudiado una serie de α -amino ácidos acoplados al ácido cólico, mediante los cuales se puede observar que la *cac* varía ligeramente con la estructura molecular, y se producen pequeñas disminuciones en la misma cuando se aumentaba la hidrofobia del compuesto. También se evidencia la disminución en la *cac* de los derivados con respecto a la sal biliar original²⁵.

Las micelas o agregados suelen poseer varias decenas o centenares de moléculas orientadas. La dimensión y geometría de estos agregados depende de la estructura del surfactante y del ambiente fisicoquímico pudiendo dar origen a disoluciones monofásicas micelares estables. Estas son consideradas como polímeros de agregación con tamaños del orden de 10-100 Å, como coloides liófilos. Pueden aumentar su tamaño por la solubilización de sustancias en su interior, aumento de la concentración de surfactante, etc. llegando a alcanzar tamaños de 0,1 μ m.

Los agregados formados pueden tener otras formas diferentes a la micela cilíndrica, pueden adoptar formas tipo gusano, bicapas, vesículas simples, mixtas, formadas por una o múltiples capas..., con tamaños que pueden ir desde unos pocos nanómetros

hasta varios micrómetros. En ocasiones estos agregados también se pueden obtener mediante la mezcla de surfactantes iónicos. En el caso de las micelas tipo gusano, suelen conllevar un aumento de la viscosidad de la disolución. También se pueden originar otro tipo de agregados en disolución acuosa como es el caso de hidrogeles y cristales líquidos liotrópicos. La formación de estos agregados dependerá directamente de la estructura y concentración del surfactante empleado.

Willemen *et al.* han sintetizado, y caracterizado mediante técnicas como crio-TEM y *light scattering*, diversos derivados de ácidos biliares (Figura 1.15). En particular han realizado derivados éster mediante los grupos hidroxilo del ácido cólico con actividad antimicrobiana, en los cuales se evidencia la formación de agregados micelares esféricos en agua, de 3-6 nm y 5-6 nm cuando alargaba las longitudes de las cadenas laterales. También confirma la aparición de agregados de 15-50 nm ocasionalmente, con la misma variación de densidad que los pequeños, por lo que no son estructuras vesiculares. Asume que las micelas secundarias son racimos de las pequeñas micelas primarias. Este proceso es similar a la agregación en dos pasos propuesto para el ácido cólico.²⁰

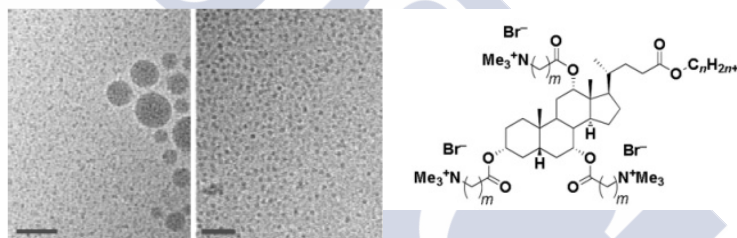


Fig. 1.15 - Imágenes de crio-TEM 1% peso para el compuesto de la imagen en solución acuosa, $n=12$ $m=7$ y $n=16$ $m=3$ respectivamente, barra 50 nm,²⁰

También se han realizado estudios con derivados de ácido cólico con α -amino ácidos acoplados vía enlaces amida al ácido carboxílico. Estos conjugados también evidencian la formación de pequeñas micelas de tamaño de unos 5 nm y algún agregado más grande en torno a 20 nm (Figura 1.16).²⁵

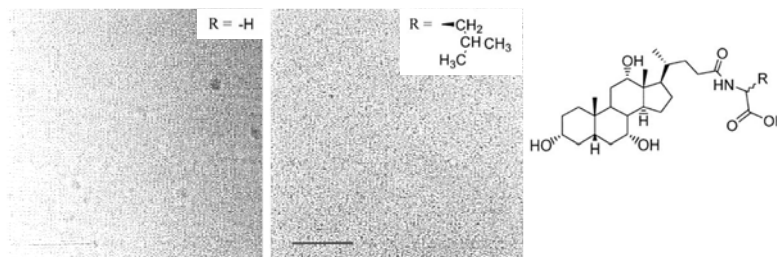


Fig. 1.16 - Imágenes de crio-TEM 1% peso solución acuosa, barra 100 nm.²⁵

A continuación se muestran otros ejemplos de estructuras de auto-ensamblaje de derivados esteroideos,²⁶ en los cuales se evidencia la existencia de estructuras cilíndricas o fibrosas (Figura 1.17).

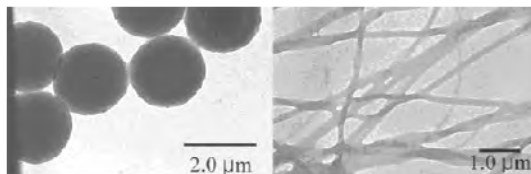


Fig. 1.17 - Imágenes de TEM de agregados de derivados de colesterol.

1.3.2 AGREGACIÓN EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.

Al igual que sucedía anteriormente, cuando moléculas de surfactante son situadas en un medio orgánico estas pueden dar lugar a diferentes tipos de agregados. Un ejemplo de ello son las micelas invertidas, en las cuales las regiones apolares de las moléculas estarán orientadas hacia el medio que las rodea mientras que las zonas más polares se situarán hacia el interior de la micela, originando una región polar en el interior de la misma, fenómeno opuesto al que tiene lugar en medio acuoso.²¹

Dentro de los agregados formados en disolventes orgánicos, podemos destacar los Organogeles. Su estudio comenzó hace aproximadamente unos 30 años y una característica principal de los mismos es la formación de redes tridimensionales de fibras entrelazadas formadas por la agregación de las moléculas del surfactante.²¹

De la reacción de distintos ácidos biliares con aminas secundarias y algunos disolventes orgánicos y acuosos, se generan organogeles, revelando la presencia de agregados fibrosos y fibras helicoidales para diferentes productos (Figura 1.18). La gelificación tiene lugar a través de la formación de clústeres fibrosos con un posterior entrecruzamiento de los mismos.²⁷⁻²⁸

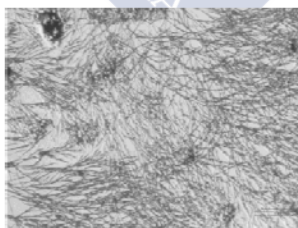


Fig. 1.18 - Microfotografía óptica de fibras en un gel de un derivado de ácido cólico.²⁷⁻²⁸

Existen diversos artículos centrados en la obtención de derivados de sales biliares para su uso como potentes agentes gelificantes, obteniéndose geles estables, transparentes y termorreversibles. La gelificación tiene lugar mediante la intervención de enlaces de hidrógeno (enlaces amidas y grupos hidroxilo) entre las diferentes moléculas y los disolventes, conduciendo a la formación de redes tridimensionales

como ya se ha comentado. La posibilidad de efectuar cambios en la estructura molecular permitirá, *a priori*, actuar sobre la capacidad gelificante de los compuestos,²⁹ logrando que una molécula de agente gelificante sea capaz de inmovilizar del orden de 10^5 moléculas de agua.³⁰

También se ha estudiado el efecto del tipo de enlace en el poder gelificante. Así se han comparado enlaces amida, éster y urea, obteniéndose geles (basados en los enlaces de hidrógeno) estables y transparentes en disolventes aromáticos que formaron fibras monomoleculares. Así, para el caso de ésteres derivados, se observó la formación de micelas cilíndricas invertidas que provocan la gelificación de disolventes apolares.³¹⁻³²

Otros trabajos con derivados del colesterol y sales biliares evidencian la existencia de micelas cilíndricas y fases multilaminares (Figura 1.19).³³⁻³⁴

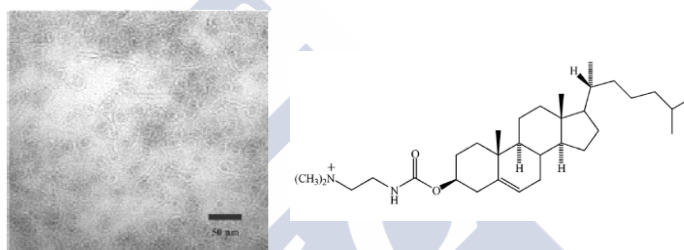


Fig. 1.19 - Micelas cilíndricas con diámetros medios de 5.4 nm del Colesterol -3β-N-((dimetilamino)etil)carbamato en agua.³⁴

En algunos casos, como ya se ha mencionado se han obtenido estructuras perfectamente ordenadas que claramente se pueden identificar como cristales líquidos (Figura 1.20).³⁵

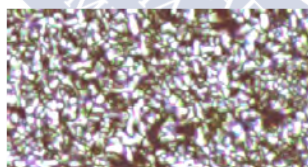


Fig. 1.20 - Textura birrefringente característica de los cristales líquidos de un derivado de colesterol con ácido láctico.³⁵

También se han obtenido nanotubos mediante el ensamblaje de derivados de colesterol con óxidos metálicos, como se muestra en las siguientes imágenes (Figura 1.21).²⁶

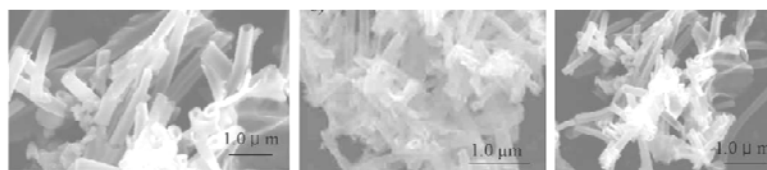


Fig. 1.21 - Nanotubos obtenidos de autoensamblaje de derivados de colesterol con óxidos de Talio, Titanio y Circonio en acetonitrilo.²⁶

1.3.3 ESTADO CRISTALINO.

La elaboración, caracterización y estudio de cristales de los ácidos biliares y sus derivados ha sido un tema que ha suscitado un gran interés y ha sido extensamente abordado por diferentes grupos científicos durante los últimos 60 años. Esto es motivado por el uso que estos compuestos tienen en una gran cantidad de aplicaciones prácticas como: la formación de complejos de inclusión, reacciones de polimerización³⁶⁻⁴², su uso en sistemas de liberación controlada de sustancias activas⁴³ y la resolución de mezclas racémicas⁴⁴⁻⁴⁷ entre otras.

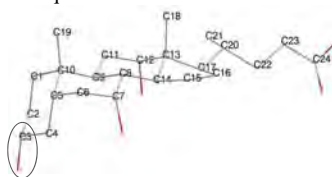
Por otro lado el estudio y comprensión de la estructura cristalina puede ser de utilidad para la predicción de modelos de agregación de las sales biliares en disolución acuosa⁴⁸ y con disolventes orgánicos. Los estudios cristalográficos que podemos encontrar en la bibliografía a menudo incluyen estudios de recristalización en disolventes de diferente polaridad, tamaño y otras diferencias estructurales. La mayoría de estos estudios se han centrado sobre todo en los ácidos: cólico (CA) y desoxicólico (DCA).

En la presente tesis debemos de destacar la obtención de diferentes tipos de compuestos de inclusión, con disolventes en algunos casos como moléculas huésped o libres de las mismas, obteniéndose diferentes tipos de cristales en cuanto a su estequiometría, sistema cristalino o grupo espacial. Este hecho está íntimamente relacionado con la capacidad del ácido cólico y otros ácidos biliares para la formación de complejos de inclusión con moléculas de diferente naturaleza, dando origen a complejos con sistemas cristalinos diversos, grupos espaciales o estequiometrias como: 1:1(monoclínica P2₁)⁴⁹⁻⁵¹, 2:1(hexagonal P6₅22)⁵¹⁻⁵², entre muchos otros.

En la bibliografía se puede encontrar un gran número de trabajos realizados con derivados de ácidos biliares naturales que abarcan diferentes aspectos como: (i) la influencia de la orientación de los grupos hidroxilo⁵³⁻⁵⁷; (ii) la influencia de la cadena lateral⁵⁸⁻⁶³; (iii) la influencia de la variación del grupo funcional en la cadena lateral (alcohol^{49,64-65}, éster de metilo^{49,66-71}, amida^{46-47,72-85}).

Sin embargo se ha prestado una menor atención a las modificaciones realizadas en el grupo hidroxilo de la posición C3¹. Algunos estudios realizados con derivados en esta posición corresponden a los 3-ceto derivados del ácido litocólico⁸⁶, a 3β-amino derivados de ácido cólico que forman compuestos de inclusión con altas relaciones

¹ Numeración para el ácido cólico y región sobre la que se han realizado las modificaciones:



sustrato/huésped, 1/4 (metanol)⁸⁷ y sus formas zwitterionicas cristalizan en una estructura ortorrómbica P2₁2₁2₁⁸⁸ y al ácido [3 β , 5 β , 7 α , 12 α]-3[(adamantil-1-carbonil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico (AdCA) en el cual la superficie hidrófoba del ácido biliar natural ha sido incrementada mediante la incorporación del grupo adamantilo⁸⁹. La sal de sodio de este compuesto forma una fase laminar, constituida por bicapas cargadas separadas por moléculas de agua periódicamente intercaladas.

Por otro lado, cuando la superficie hidrófoba del ácido biliar natural es aumentada mediante la incorporación de un grupo ter-butilfenilo en la misma posición, el nuevo derivado origina tubos moleculares en disolución⁹⁰. El hallazgo de estas nuevas estructuras supramoleculares en su día, nos sugirieron que se debían llevar a cabo estudios más profundos sobre la influencia de grupos hidrófobos por la posición C3.

Existen numerosos artículos centrados en la determinación e interpretación de los diagramas de fases de sistemas sal biliar, colesterol y fosfolípidos para el estudio de la cristalización en función de las propiedades anfífilas de la sal biliar, el contenido en fosfolípidos, la saturación de colesterol y la concentración de lípidos.^{17,34,35,42} La Figura 1.22 muestra un ejemplo típico de un diagrama de fases. En el mismo, se pueden observar los diferentes estados que se encontrarán dentro del sistema, desde micelas, vesículas, monómeros libres o la formación de cristales.

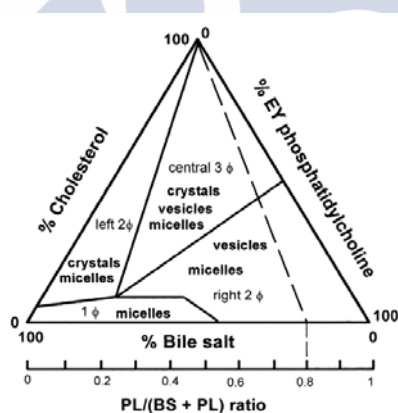


Fig. 1.22 - Diagrama de fases tipo para el sistema ternario colesterol/lecitina/Sal biliar.

Nuestro grupo a lo largo de estos últimos 15 años ha venido desarrollando un extenso trabajo en el ámbito de los derivados de sales biliares. Cabe destacar entre otros, el estudio de auto-agregación del ácido [3 β ,5 β ,7 α ,12 α]-3-[(adamantano-1-carbonil)-amino]-7,12-dihidroxicolan-24-oico (Na-AdC). Este compuesto forma una fase laminar (Figura 1.23) que consistiría en bicapas infinitas de Na-AdC separadas por disolvente que se repiten periódicamente.³⁷ Se ha visto que estas estructuras laminares son similares a las originadas por algunos derivados de colesterol.

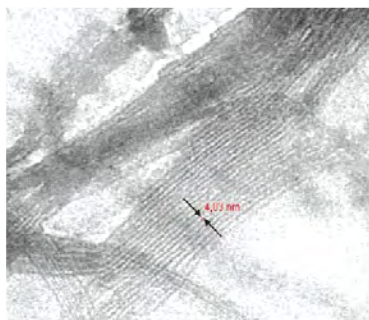


Fig. 1.23 - Imagen TEM de Na-AdC en solución acuosa

Debido a la relevancia del estado cristalino en la presente tesis, a lo largo del capítulo 2 de la misma, que se centrará en los cristales obtenidos durante la realización de la tesis, se hará una pequeña revisión bibliográfica sobre los aspectos más destacables y parámetros a tener en cuenta de los cristales obtenidos hasta el momento para que nos ayuden a una mejor comprensión de los resultados obtenidos.

1.4 NANOPARTÍCULAS DE ORO⁹¹

En estos últimos años, las nanopartículas han cobrado un gran interés desde el punto de vista industrial, médico, tecnológico, etc. Sus dimensiones son inferiores a los 100 nm y provienen de diferentes materiales, aunque los más comunes suelen ser los metales, óxidos metálicos, materiales cerámicos y silicatos.⁹² Las nanopartículas que integran los coloides metálicos suelen ser nanopartículas metálicas (como: Au, Ag y Cu) en suspensión en el disolvente deseado.

Los coloides metálicos se conocen desde hace mucho tiempo. En la antigüedad se empleaban ya los coloides de oro como sustancias colorantes en la fabricación de vidrios. Desde los tiempos de Faraday se conocen las propiedades ópticas especiales de las suspensiones de nanopartículas metálicas. Estas poseían un color diferente según el método de fabricación. El mecanismo preciso para dicha coloración fue propuesto por G. Mie quien mostró que los colores de los coloides metálicos, considerados como suspensiones de partículas esféricas, eran una consecuencia conjunta de la absorción y difusión de la luz. En los últimos tiempos las técnicas de fabricación y modificación de coloides metálicos o semiconductores se han desarrollado extraordinariamente con el fin de obtener partículas con morfologías y propiedades adecuadas para ser empleadas en dispositivos nanoscópicos con aplicaciones diversas: dispositivos electrónicos, ópticos, espectroscópicos, etc. Por ello, una cuestión muy importante en la preparación de sistemas coloidales para las diferentes aplicaciones es la posibilidad de controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas obtenidas, ya que las propiedades optoelectrónicas que de ellas deriven dependen íntimamente de estos parámetros.

Las partículas coloidales en suspensión tienen el problema de su gran inestabilidad ya que tienden a precipitar con el tiempo. Por eso, se debe prestar especial atención a

la estabilización de los mismos mediante diferentes medios o agentes protectores. Ejemplos de ellos los encontramos en los numerosos estudios en los cuales se tratan de buscar moléculas que estabilicen las nanopartículas como el empleo del ácido p-mercaptobenzoico (dando origen a nanopartículas con quiralidad, con los dos enantiómeros alternados en la red cristalina, y formando una capa rígida superficial que le confiere estabilidad al sistema),⁹³ o el empleo de L-fenilalanina⁹⁴, polivinilpirrolidona⁹⁵, aminoácidos⁹⁶, 4-aminotiofenol⁹⁷, 1-dodecanotiol y 1-decilamina⁹⁸, como agentes estabilizantes de nanopartículas, entre muchos otros.

El empleo de los ácidos biliares y sus conjugados en nanociencia representa una novedosa idea, la cual abre grandes expectativas. Ya han sido descritas rutas para la obtención de nanopartículas metálicas estabilizadas con etil éster N-litocolilcisteína.⁹⁹ Maitra y col.¹⁰⁰ también han sintetizado diferentes tioles anfífilos basados en sales biliares para su empleo como agentes estabilizantes de nanopartículas de oro, destacando su importancia en las posibilidades de su uso en catálisis, procesos de transferencia de energía, como sensores y agentes gelificantes.

1.4.1 PROPIEDADES ÓPTICAS Y ELÉCTRICAS DE LOS COLOIDES METÁLICOS

En general, los coloides poseen unas propiedades ópticas derivadas del tamaño de las nanopartículas en suspensión y los coloides metálicos, en particular, presentan unas propiedades ópticas específicas de su naturaleza metálica. Sin embargo, en muchos casos, pueden diferir de las de los metales a nivel macroscópico. En la realidad, las nanopartículas metálicas pueden ser consideradas como un estado intermedio entre un simple átomo y el material a escala macroscópica.

Las propiedades de materiales macroscópicos miniaturizados difieren en muchos aspectos de los materiales de origen, siendo una característica importante el hecho de que sus niveles electrónicos son discretos, lo que da lugar a la manifestación de efectos cuánticos. Entre estos efectos está el de los plasmones, nombre que reciben las oscilaciones colectivas de los electrones libres existentes en los metales, las cuales llevan asociadas energías de manera tal que las transiciones electrónicas entre las mismas dan lugar a la extinción de una parte de la luz incidente, originando un efecto de coloración en estos sistemas. Cuando las partículas metálicas son de pequeño tamaño en relación con la longitud de onda, la absorción predomina sobre la difusión. La energía de los plasmones depende de la naturaleza del metal así como de la morfología y tamaño de la nanopartícula.

En la bibliografía se pueden encontrar, por ejemplo, trabajos en los cuales se controla el tamaño de las nanopartículas usando como agente de estabilización el citrato de sodio, obteniéndose sistemas de diferentes espesores de recubrimiento y

tamaños de partícula con gran potencial para aplicaciones de detección químicas y biológicas con absorción en el IR-cercano.¹⁰¹

Estas propiedades ópticas modulables y características de las nanopartículas son la base de estudio en diversos campos de la medicina y biología que en algunos casos estos estudios van encaminados a alcanzar un contraste eficiente en aplicaciones de imagen celular y aplicaciones terapéuticas fototérmicas. Por ello, las nanoesferas de unos 40 nm, muestran absorciones 5 veces mayores que los colorantes convencionales, mientras que la luz dispersada por nanoesferas de oro de 80 nm es del orden de 5 veces mayor que la luz emitida por colorantes fluorescentes.¹⁰²

1.4.2 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS SUPERFICIES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Un aspecto importante a tener en cuenta en la estabilidad de los coloides metálicos, son sus propiedades superficiales, las cuales son de gran importancia con vistas a posteriores aplicaciones. Las nanopartículas metálicas presentan una interfase con cargas positivas, debidas a un defecto de electrones en los átomos de la superficie que pasan al medio que las circundan. Esta carga es neutralizada por iones negativos, normalmente procedentes de las sales empleadas en la preparación del coloide. Se forma entonces una doble capa eléctrica que da lugar a la llamada capa de Stern, véase la figura 1.24, integrada por iones rígidamente unidos a la superficie del metal. A continuación se encuentra la capa de difusión, en la que los iones presentan una mayor movilidad.

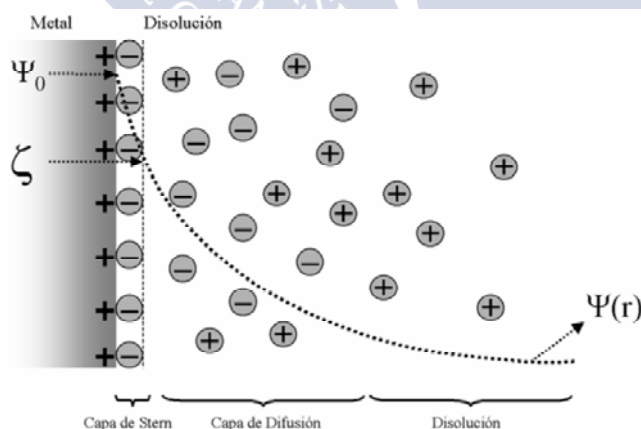


Figura 1.24. Distribución de iones sobre la superficie de la nanopartícula metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie.

Como consecuencia de la distribución de cargas positivas y negativas sobre la superficie, la partícula presenta una carga neta negativa. La carga residual del metal en su superficie es una propiedad importante que asegura la estabilidad de la partícula en suspensión. El potencial eléctrico en la superficie es difícil de determinar. Sin embargo

es más fácil determinar el potencial en la interfase entre la capa de Stern y la de difusión, conocido como potencial Z. Este potencial es más empleado ya que su valor depende en buena parte de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, tales como la movilidad, difusibilidad y estabilidad.

La estabilidad de estos sistemas está gobernada por un balance de fuerzas atractivas tipo Van der Waals y repulsivas electrostáticas entre nanopartículas.

Las fuerzas electrostáticas de repulsión entre partículas dependen de la distancia según r^{-2} mientras que las fuerzas de atracción son mucho más débiles ya que depende de r^{-6} , siendo r la distancia entre las partículas. Las partículas tienen que vencer un potencial máximo para poder aproximarse lo suficiente como para adherirse y/o agregarse. La barrera energética depende del potencial Z de las nanopartículas.

La reducción del potencial Z puede inducirse bien por adsorción de una molécula neutra sobre el metal, bien por neutralización de la carga residual de la partícula. Lo que da lugar a una reducción en la barrera de potencial y se produce la agregación de las partículas.¹⁰³

1.4.3 PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

El área superficial de las nanopartículas se incrementa con el descenso de su tamaño. Así una pequeña partícula de 1 nm de diámetro tendrá el 100% de sus átomos en la superficie, una partícula de 10 nm, tendría únicamente entorno al 15% de sus átomos en la superficie, por lo que una nanopartícula pequeña con una alta área superficial será más reactiva. Además, el cambio cualitativo en la estructura electrónica produce un confinamiento cuántico lo que les dará unas propiedades catalíticas inusuales a estas partículas, totalmente distinto del material sólido macroscópico.¹⁰⁴

1.5 RESINAS EPOXI

Las resinas epoxi o epoxídicas son polímeros orgánicos que pertenecen al grupo de polímeros termoestables. Se presentan en forma de sólidos o de líquidos más o menos viscosos siendo su característica estructural más destacable la existencia de dos o más anillos epoxi u oxirano (figura 1.25) lo cuales, dentro de una molécula, pueden ser grupos terminales, internos o situados en una estructura cíclica. La apertura de estos grupos inicia la reacción de polimerización. En la figura 1.25 se muestra la epíclorhidrina.

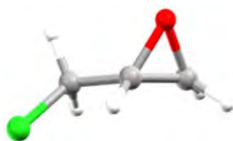


Fig. 1.25. Estructura básica del anillo epoxi (epiclorhidrina).

El inicio de la investigación tecnológica sobre este tipo de resinas se produjo en Estados Unidos a partir de la Segunda Guerra Mundial. La primera resina que se comercializa (a partir de 1947) es una mezcla de epiclorhidrina y bisfenol y la producción fue creciendo a ritmo muy acelerado, utilizando productos de partida variados: fenoles, aldehídos, aminas, alcoholes..., obteniéndose productos finales de gran versatilidad, con propiedades químicas que hacen que sus utilidades sean muy amplias.

1.5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS RESINAS EPOXI

Por si solas las resinas epoxi son solubles, fundibles y no presentan propiedades mecánicas de gran interés, pero reaccionando con sustancias endurecedores o agentes de curado originan estructuras muy reticuladas, insolubles, infusibles, con excelente resistencia a ácidos, bases y disolventes y con unas prestaciones mecánicas muy buenas. El término resina epoxi se utiliza tanto para el prepolímero en estado líquido o sólido como para la resina ya curada formando un polímero termoestable (aunque en el último caso es posible que ya no contengan estos grupos oxirano).

Las propiedades de las resinas epoxi dependen de la estructura química, del proceso de transformación y si llevan o no partículas de relleno, como puede ser el caso que nos atañe al añadirle nanopartículas metálicas.

En general, las propiedades que determinan sus aplicaciones son:

- La versatilidad, es una de las características fundamentales: posiblemente se trate de uno de los plásticos contemporáneos más versátiles. Las propiedades básicas que presenta pueden ser modificadas en muchas direcciones: mezclando diversas resinas o mediante la selección de agentes de curado y rellenos diferentes.
- Son polímeros termoestables, presentando una mayor resistencia a la fluencia viscosa a temperatura elevada y una mayor estabilidad dimensional que los polímeros termoplásticos.
- Fácil curado: estas resinas curan rápido y fácilmente a cualquier temperatura comprendida desde la temperatura ambiente hasta cientos de grados centígrados, dependiendo de la selección del agente de curado.
- Alta resistencia mecánica: depende considerablemente del agente de curado utilizado y es probablemente un resultado de su baja contracción durante la etapa de curado, motivo por el cual se reducen al mínimo las tensiones que debilitarían de otra manera la estructura mecánica. Ofrecen alta resistencia al desgaste y muy alta al agrietamiento, además de que presentan resistencias a la tracción del orden de 1050 Kg/cm².

- Buena resistencia química a los agentes químicos superando ampliamente a sus antecesores, los poliésteres. Se caracterizan por su elevada resistencia al agua, a disolventes, ácidos y bases.
- Elevada fuerza de adhesión: debido a su composición química, especialmente, la presencia de numerosos grupos polares ($-OH$) facilitan la unión con los materiales de contacto. Son adhesivos de buena calidad, lo que resulta un gran inconveniente a la hora de desmoldar piezas.
- Altos coeficientes de expansión y conductividades térmicas.
- Mejores condiciones aislantes que los poliésteres.
- Están en desventaja con respecto a la mayoría de los termoplásticos en cuanto a flexibilidad y resistencia al impacto, aunque se pueden mejorar las condiciones de flexibilidad después del curado, cuando los grupos funcionales que producen las reticulaciones están lo suficientemente alejados. Además, al ser combinados con diferentes tipos de refuerzos (cargas fibrilares de todo tipo y materiales orgánicos e inorgánicos) aumentan sus propiedades mecánicas y eléctricas, potenciándose de este modo su uso en la industria electrónica y en el sector de la construcción.
- Admiten cargas de sílice (disminuye su coeficiente de dilatación), de metales atomizados como es el caso del presente estudio (aumentando su conductividad) y son compatibles con el estireno (proporciona una mayor capacidad de admitir cargas y pigmentos).
- Su principal inconveniente está relacionado con la transparencia y calidad superficial, tanto en coloridos brillantes como en mates.

1.5.2 SÍNTESIS Y APLICACIONES DE LAS RESINAS EPOXI

La mayoría de las formulaciones epoxídicas están basadas en el diglicil éter de bisfenol A (BADGE), síntesis patentada por Pierre Castan en la década de 1930. Esta resina, una vez endurecida, ofrece un excelente balance de propiedades mecánicas, térmicas y químicas.

La resina empleada en la presente tesis será el BADGE que se obtiene por la reacción de bisfenol A con exceso de epíclorhidrina en medio alcalino a temperaturas moderadamente elevadas. (figura 1.26)

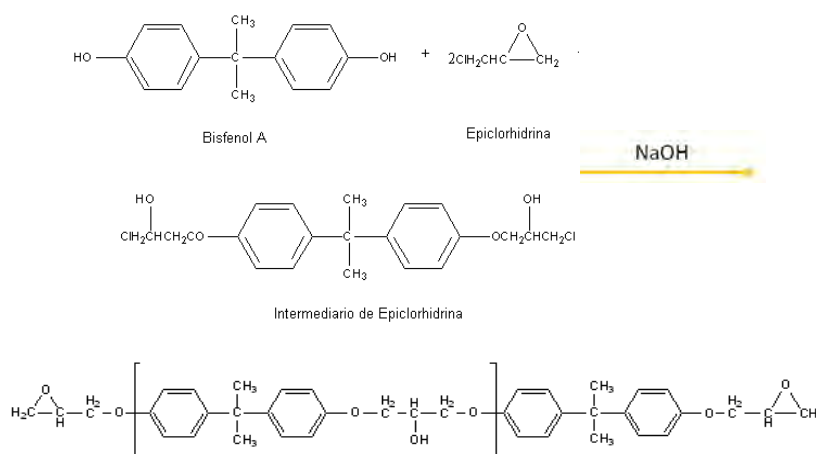


Figura 1.26. Obtención del diglicil éter de Bisfenol A.

El hidróxido sódico cataliza la primera reacción y permite la formación del intermediario, actuando al mismo tiempo como agente deshidrohalogenador. Se forman así moléculas lineales con grupos epoxi en los extremos. Estos prepolímeros son generalmente líquidos viscosos, aumentando su viscosidad con el número de unidades estructurales de la molécula. El exceso de epichlorhidrina es necesario para limitar la producción de moléculas de mayor peso molecular, ya que el BADGE reacciona con el bisfenol A y da lugar a moléculas con número variable de unidades estructurales repetidas.

Sus principales aplicaciones están repartidas en tres grandes bloques:

- 🏠 Electrónica y electrotecnia: constituyen protectores y recubrimientos para equipos eléctricos y electrónicos.
- ✈️ Aeronáutica (recubrimientos).
- 🏠 Adhesivos.

En resumen, se puede decir que los grandes éxitos de las resinas epoxídicas en estos campos son el ahorro de peso frente a otros materiales, las excelentes características mecánicas, la gran resistencia a la corrosión y la posibilidad de ser diseñadas a medida con un gran potencial de posibilidades, muchas de ellas por la versatilidad en la selección de diferentes agentes reticulantes y rellenos.

1.5.3 AGENTES RETICULANTES

Para convertir un prepolímero epoxi en un polímero termoplástico o en uno termoestable es necesario añadir un agente de curado o endurecedor. Estos compuestos químicos son moléculas polifuncionales. Algunos fomentan el proceso de curado mediante acción catalítica, otros participan directamente en la reacción uniéndose con facilidad a los anillos epoxi de las resinas. Dependiendo del

endurecedor seleccionado, la etapa de curado puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o requerir a la aplicación de calor procedente de una reacción exotérmica o de una fuente de calor externa.

En la actualidad existe una gran variedad de endurecedores válidos. Su elección depende fundamentalmente de las características químicas y de las propiedades físicas que necesitemos en el polímero a sintetizar y de otros criterios como son: el tiempo de aplicación, las condiciones de curado y, por supuesto, criterios económicos. Los más utilizados son aminas aromáticas y alifáticas porque curan más rápidamente y proporcionan mejor resistencia química, aunque son más tóxicas y pueden reaccionar a temperatura ambiente. Otros posibles endurecedores son algunas bases inorgánicas, amidas y bases de Lewis.

Las reacciones de polimerización que pueden sufrir durante el proceso de curado son de varios tipos dependiendo del endurecedor y de los grupos funcionales del prepolímero. Una de ellas es la poliadición, que es la reacción más común entre prepolímeros epoxi y aminas, son exotérmicas. En la poliadición, el acoplamiento entre el grupo epoxi y el grupo amino se debe a la migración o transposición de átomos de hidrógeno de uno a otro grupo (véase figura 1.27). Cada grupo amino se podrá unir a dos grupos epoxi.

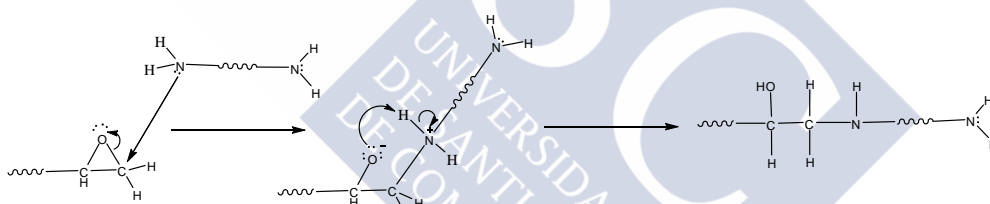


Figura 1.27. Unión entre un grupo amino y grupo epoxi.

Este proceso se repite formándose cadenas poliméricas que rápidamente empiezan a unirse entre sí dando lugar a una red tridimensional entrecruzada que constituye un sólido de extrema dureza y elevado peso molecular (véase figura 1.28).

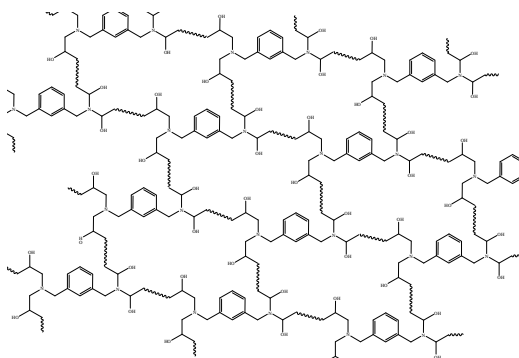


Figura 1.28. Ejemplo de red entrecruzada.

En la presente tesis, el agente endurecedor utilizado es la metaxililenediamina (m-XDA) Fig. 1.29, consistente en una amina alifática que presenta un anillo bencénico. Su forma comercial se corresponde con una mezcla de las formas *meta* y *para*, con un 97% de la forma *meta* y el porcentaje restante corresponde a la *para*.

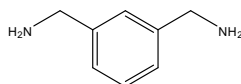


Figura 1.29. Fórmula molecular de m-XDA.

Según estudios realizados sobre la reacción entre la resina epoxi Bisfenol A (BADGE) y m-XDA los valores de equivalente epoxi-amina son 173,6 y 31,2 respectivamente. Atendiendo a esto, su relación estequiométrica sería 100 partes de BADGE y 18 partes de m-XDA.

La combinación de estos dos tipos de sistemas, resinas termoestables y nanopartículas metálicas, vistos en los apartados previos, hacen de los materiales nanocompuestos de resinas epoxi y nanopartículas metálicas, materiales de gran relevancia e importancia para posibles aplicaciones futuras.¹⁰⁵

1.6 PLANTEAMIENTO

La investigación que se recoge en la presente tesis, plantea y desarrolla la síntesis de derivados de ácido cólico por la posición 3 y 24, así como su caracterización por diferentes técnicas instrumentales y diversos estudios sobre el comportamiento de agregación en disolución para algunos de ellos. También abarca campos tan diversos como los sistemas coloidales, los sistemas poliméricos y nanopartículas metálicas, entre otros. Se hace un estudio en profundidad del estado cristalino de algunos de los compuestos sintetizados tratando de esclarecer relaciones entre su estructura molecular y los comportamientos de agregación obtenidos.

Dividiremos la investigación realizada en varios capítulos en función de los sistemas obtenidos o modificaciones realizadas sobre las sales biliares de partida. Así los capítulos 2 y 3 se centrarán en los estudios de agregación y resolución de cristales, realizados sobre los compuestos derivados del ácido cólico (AC) por la posición 3, punto donde serán incorporadas diversas moléculas hidrófobas con diferentes espaciadores, tratando de observar el cambio de comportamiento de las moléculas diseñadas en función del medio y los espaciadores empleados, continuando con líneas de investigación ya planteadas en el grupo. Este estudio proporcionará información muy detallada acerca del tipo de redes cristalinas obtenidas, sus dimensiones, y características de las moléculas de disolvente que, en muchas ocasiones, quedan ocluidas o formando parte fundamental de la estabilidad de las redes cristalinas.

En el capítulo 4, se abordará la incorporación de moléculas con grupos tiol a nuestra molécula base AC, para su empleo como posibles agentes reductores o de estabilización de nanopartículas de Au, seguido por un resumen de los trabajos y proyectos desarrollados durante la tesis, relacionados principalmente con las nanopartículas de oro y resinas epoxi para la obtención de materiales nanocompuestos con posibles intereses prácticos. Finalizando con la obtención de surfactantes para la realización de mezclas catiónicas derivados también del AC por la posición 24, estudiando su capacidad para la formación de hidrogeles y el comportamiento en cuanto a la capacidad de agregación de los mismos.

Al final de cada capítulo se realizarán discusiones de algunos de los aspectos más relevantes y generales vistos, tratando de establecer algunas relaciones entre los diferentes capítulos desarrollados, para mostrar al final de la presente tesis las conclusiones generales que se han obtenido durante su desarrollo.



1.7 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Mihail, B. & Jean-Marie, L. **Dynamic chemical devices: modulation of contraction/extension molecular motion by coupled-ion binding/pH change-induced structural switching.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5201-5206 (2002).
- 2 Cragg, P. J. *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry.* (John Wiley & Sons Ltd., 2005).
- 3 Yui, N. *Supramolecular Design for Biological Applications,* CRC Press, Boca Ratón (2002).
- 4 Schmitz, A. *Solubility and Molecular Structure,* <<http://2012books.lardbucket.org/books/principles-of-general-chemistry-v1.0/s17-02-solubility-and-molecular-struct.html>> (2012).
- 5 Meier, P. J. & Stieger, B. Bile salt Transporters. *Annual review of Physiology* **64**, 16 (2002).
- 6 Narin, P. K., DeMaria, E. J. & Heuman, D. M. Cholesterol Enhances Membrane-Damaging Properties of Model Bile by Increasing the Interventricular-Intermixed Micellar Concentration of Hydrophobic Bile Salts *Journal of Surgical Research* **84**, 8 (1999).
- 7 Hagenbuech, B. & Dawson, P. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *European Journal of Physiology* **447** (5), 5 (2003).
- 8 Pauli-Magnus, C., Stieger, B., Meier, Y., Kullak-Ublick, G. A. & Meier, P. J. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *Journal of Hepatology* **43**, 17 (2005).
- 9 Luk, A. S., Kaler, E. W. & Lee, S. P. **Structural Mechanisms of Bile Salt-Induced Growth of Small Unilamellar Cholesterol-Lecithin Vesicles.** *Biochemistry* **36**, 5633-5644 (1997).
- 10 Tsuchimoto, D., Tazuma, S., Yamashita, G. & Kajiyama, G. **Role of bile salt hydrophobicity in distribution of phospholipid species to carriers in supersaturated model bile solutions.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **14**, 388-393 (1999).
- 11 Venneman, N. G., van Kammen, M., Renooij, W., van Berge-Henegouwen, G. P. & van Erpecum, K. J. **Effects of hydrophobic and hydrophilic bile salts on gallstone growth and dissolution in model biles.** *Biochim. Biophys. Acta* **1686**, 209-219 (2005).
- 12 Zhong, Z., Yan, J. & Zhao, Y. **Cholic Acid-Derived Facial Amphiphiles with Different Ionic Characteristics.** *Langmuir* **21**, 6235-6239 (2005).
- 13 Schiesser, C. H., Skidmore, M. A. & White, J. M. Stannanes from Cholic Acid as Enantioselective Free-Radical Reducing Agents. *Australian Journal of Chemistry* **54** (3), 5 (2001).
- 14 C, L. *et al.* **Antimicrobial activities of amine- and guanidine-functionalized cholic acid derivatives.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**, 1347-1349 (1999).
- 15 Li, C., Peters, A. S., Meredith, E. L., Allman, G. W. & Savage, P. B. Design and Synthesis of Potent Sensitizers of Gram-Negative Bacteria Based on a Cholic Acid Scaffolding. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2 (1998).
- 16 Sweeny, D. J., Barnes, S., Heggie, G. D. & Diasio, R. B. Metabolism of 5-fluorouracil to an N-cholyl-2-fluoro-beta-alanine conjugate: previously unrecognized role for bile acids in drug conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84** (15), 5 (1987).
- 17 Oспенica, D. *et al.* Cholic Acid Derivatives as 1,2,4,5-Tetraoxane Carriers: Structure and Antimalarial and Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **43**, 10 (2000).
- 18 Ayling, A. J. *et al.* An extraction-Based Assay for Neutral Anionophores: The measurement of High Binding Constants to Steroidal Receptor in a Non polar solvents. *Chem. Eur. J.* **8** (2002).

- 19 Ghosh, S., Choudhury, A. R., Guru, R. T. N. & Maitra, U. **Selective and unusual fluoride ion complexation by a steroidal receptor using OH...F- and CH...F- interactions: a new motif for anion coordination?** *Org. Lett.* **7**, 1441-1444 (2005).
- 20 Willemen, H. M. *et al.* **Micelle formation and antimicrobial activity of cholic acid derivatives with three permanent ionic head groups.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4275-4277 (2002).
- 21 Willemen, H. M. Aggregation behavior of cholic acid derivatives in organic solvents and in water. ISBN 90-5808-5714-X (2002).
- 22 Cabrer, P. R. Complejación de sales biliares di- y tri-hidroxílicas por ciclodextrinas. Estudio mediante RMN y tensión superficial. *Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela* (2000).
- 23 Warren, D. B., Chalmers, D. K., Hutchison, K., Dang, W. & Pouton, C. W. **Molecular dynamics simulations of spontaneous bile salt aggregation.** *Colloids and Surfaces, A* **280**, 182-193 (2006).
- 24 Nakashima, T. *et al.* Potentiometric study on critical micellization concentrations (CMC) of sodium salts of bile acids and their amino acid derivatives. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **24**, 103-110 (2002).
- 25 Willemen, H. M., Vermonden, T., Koudijs, A., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. **Aggregation of different amino acid conjugates of cholic acid in aqueous solution.** *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* **218**, 59-64 (2003).
- 26 Jung, J. H., Shimizu, T. & Shinkai, S. Self-assembling structures of steroidal derivatives in organic solvents and their sol-gel transcription into double-walled transition-metal oxide nanotubes. *J. Mater. Chem.* **15**, 9 (2005).
- 27 Nonappa & Maitra, U. **Simple esters of cholic acid as potent organogelators: direct imaging of the collapse of SAFINs.** *Soft Matter* **3**, 1428-1433 (2007).
- 28 Babu, P., Sangeetha, N. M. & Maitra, U. **Supramolecular chemistry of bile acid derivatives: formation of gels.** *Macromol. Symp.* **241**, 60-67 (2006).
- 29 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. **N-Cholyl amino acid alkyl esters - a novel class of organogelators.** *Eur. J. Org. Chem.*, 2329-2335 (2001).
- 30 Maitra, U., Mukhopadhyay, S., Sarkar, A., Rao, P. & Indi, S. S. **Hydrophobic pockets in a nonpolymeric aqueous gel: observation of such a gelation process by color change.** *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2281-2283 (2001).
- 31 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. **Alkyl Derivatives of Cholic Acid as Organogelators: One-Component and Two-Component Gels.** *Langmuir* **18**, 7102-7106 (2002).
- 32 M, K. F., D, D., D, W., M, R. & Y, T. **Microstructural evolution of lipid aggregates in nucleating model and human bile visualized by cryogenic transmission electron microscopy.** *Hepatology* **31**, 261-268 (2000).
- 33 Kaplun, A. *et al.* **Imagin Supramolecular Aggregates in Bile Models and Human Bile.** *Microscopy research and Technique* **39**, 13 (1997).
- 34 C-M, W., W., L., H-L, C., T-L, L. & U-S, J. **Self-Assembled Structure of the Binary Complex of DNA with Cationic Lipid.** *Macromolecules* **37**, 4974-4980 (2004).
- 35 Hwang, J. J. *et al.* **Self-assembling biomaterials: liquid crystal phases of cholesteryl oligo(L-lactic acid) and their interactions with cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9662-9667 (2002).

- 36 Miyata, M. & Takemoto, K. **Radiation-induced polymerization of 2,3-disubstituted butadienes in deoxycholic acid inclusion compounds.** *J. Polymer Sci., Polymer Lett. Ed.* **13**, 221-223 (1975).
- 37 Miyata, M. & Takemoto, K. **Functional monomers and polymers. 32. Radiation-induced polymerization of 2,3-dichlorobutadiene in deoxycholic acid canal complexes.** *Angew. Makromol. Chem.* **55**, 191-202 (1976).
- 38 Miyata, M., Morioka, K. & Takemoto, K. **Functional monomers and polymers. XXXVIII. Postirradiation polymerization of 2,3-dimethylbutadiene in deoxycholic acid canal complexes.** *J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed.* **15**, 2987-2996 (1977).
- 39 Miyata, M. & Takemoto, K. **Functional monomers and polymers. XXXIX. Synthesis of optically active poly(trans-2-methylpentadiene) by asymmetric inclusion polymerization in deoxycholic acid.** *Polymer J.* **9**, 111-112 (1977).
- 40 Miyata, M., Tsuzuki, T., Noma, F., Takemoto, K. & Kamachi, M. **Functional monomers and polymers. 161. Inclusion polymerization in deoxycholic acid and apocholic acid canals: decisive role of a relative size between a canal and a monomer.** *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **9**, 45-50 (1988).
- 41 Goonewardena, W., Miyata, M. & Takemoto, K. **One-dimensional inclusion polymerization of diene and vinyl monomers by using methyl cholate as a host.** *Polymer J.* **25**, 731-740 (1993).
- 42 Chikada, M., Sada, K. & Miyata, M. **Intercalation and polymerization in chenodeoxycholic acid channels with retention of a crystalline state.** *Polymer J.* **31**, 1061-1064 (1999).
- 43 Froemming, K. H. & Sandmann, R. **New preparative method for gastric juice-resistant forms at active substances.** *Arch. Pharmaz.* **303**, 371-378 (1970).
- 44 Sada, K., Maeda, T. & Miyata, M. **Chiral discrimination of 1-phenylethylamine by diastereomeric salt formation with bile acids. Crystal structures of cholic acid salts with (R)- and (S)-1-phenylethylamine.** *Chem. Lett.*, 837-838 (1996).
- 45 Miki, K., Kasai, N., Shibakami, M., Takemoto, K. & Miyata, M. **New Chiral Recognition Ability of a Steroidal Bile Acid; Direct Evidence for Efficient Optical Resolution of Racemic Lactones by Cholic Acid Inclusion Crystals.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1757 (1991).
- 46 Briozzo, P., Kondo, T., Sada, K., Miyata, M. & Miki, K. **Structures of three inclusion compounds of cholamide with either (s)-enantiomer, (R)-enantiomer or an optically resolved mixture of butan-2-ol.** *Acta Cryst.* **B52**, 728-733 (1996).
- 47 Aoki, Y., Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. **Enantioresolution of aliphatic alcohols by lithocholamide.** *Enantiomer* **5**, 95-104 (2000).
- 48 Campanelli, A. R., Candeloro de Sanctis, S., Giglio, E., Viorel Pavel, N. & Quagliata, C. **From crystal to micelle: a new approach to the micellar structure.** *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **7**, 391-400 (1989).
- 49 Norton, D. A. & Haner, B. **Crystal data. I. Some bile acid derivatives.** *Acta Cryst.* **19**, 477-478 (1965).
- 50 Lessinger, L. **Cholic acid monohydrate, C₂₄H₄₀O₅.H₂O.** *Cryst. Struct. Commun.* **11**, 1787-1792 (1982).
- 51 Shibakami, M., Tamura, M. & Sekiya, A. **X-Ray Crystallographic Studies and Molecular Calculations on 1: 1 Inclusion Complexes of Cholic Acid with Acetophenone and Its Derivatives.** *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **22**, 155-168 (1995).

- 52 Lessinger, L. & Low, B. W. Crystal structure and hydrogen-bonding system of cholic acid hemihydrate, C₂₄H₄₀O₅·1/2H₂O. *J. Crystallographic Spectroscopic Res.* **23**, 85 (1993).
- 53 Alvarez, M. *et al.* **Crystal structure of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and their two 3b ,7a - and 3b ,7b -dihydroxy epimers.** *Steroids* **72**, 535–544 (2007).
- 54 Jover, A. *et al.* **Successful prediction of the hydrogen bond network of the 3-oxo-12 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid crystal from resolution of the crystal structure of deoxycholic acid and its three 3,12-dihydroxy epimers.** *Steroids* **69**, 379-388 (2004).
- 55 Kato, K. *et al.* **Excellent enantio-selective enclathration of (2R,3S)-3-methyl-2-pentanol in channel-like cavity of 3-epideoxycholic acid, interpreted by the four-location model for chiral recognition.** *Chem. Commun.*, 2872-2873 (2003).
- 56 Jover, A. *et al.* **Crystal structure of 3 β ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (isodeoxycholic acid).** *J. Mol. Struct.* **523**, 299-307 (2000).
- 57 Miyake, Y., Hirose, J., Hasegawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. **Novel channel-type inclusion compounds of 3-epiursodeoxycholic acid.** *Chem. Commun.*, 111-112 (1998).
- 58 Kato, K., Sugahara, M., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. **Drastic increase in the flexibility of open host frameworks of a steroidal host compound upon shortening its spacer.** *Eur. J. Org. Chem.*, 981-994 (2004).
- 59 Kato, K., Sugahara, M., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. **Systematic structural study of asymmetric supramolecular assembly by a series of bile acid derivatives with different side-chain lengths.** *Crystal Growth Design* **4**, 263-272 (2004).
- 60 Kato, K. *et al.* **Interpretation of enantioresolution in nordeoxycholic acid channels based on the four-location model.** *Chirality* **15**, 53-59 (2003).
- 61 Sugahara, M., Sada, K. & Miyata, M. **A robust structural motif in inclusion crystals of nor-bile acids.** *Chem. Commun.*, 293-294 (1999).
- 62 Sada, K. *et al.* **First columnar monolayer structure of bile acids inclusion crystal. Inclusion compounds of 23-nordeoxycholic acid.** *Chem. Lett.*, 31-32 (1998).
- 63 Sada, K., Sugahara, M., Kato, K. & Miyata, M. **Controlled Expansion of a Molecular Cavity in a Steroid Host Compound.** *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4386-4392 (2001).
- 64 Sada, K., Matsuo, A. & Miyata, M. **Novel molecular arrangement in asymmetric bilayered crystals of the inclusion compounds of 3 α ,12 α ,24-trihydroxy-5 β -cholane.** *Chem. Lett.*, 877-878 (1995).
- 65 Sada, K., Kondo, T., Yasuda, Y., Miyata, M. & Miki, K. **Interpretation of variable inclusion abilities of cholic acid and its derivatives on the basis of the crystal structure of 5 β -petromyzonol.** *Chem. Lett.*, 727-730 (1994).
- 66 Takemoto, K. & Miyata, M. **Polymerization of vinyl and diene monomers in canal complexes.** *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem.* **C18**, 83-107 (1980).
- 67 Miyata, M., Kitahara, Y., Osaki, Y. & Takemoto, K. **Inclusion polymerization of various diene monomers in apocholic acid canals.** *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **2**, 391-398 (1984).
- 68 Miyata, M. *et al.* **Inclusion compounds of methyl esters of cholic and deoxycholic acids; structure of a 1:1 complex between methyl cholate and methanol.** *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1140-1141 (1987).
- 69 Miki, K. *et al.* **Structures of 1 : 1 addition compounds of methyl cholate with methanol and with 2 - propanol.** *Acta Cryst.* **C48**, 503-507 (1992).
- 70 Scott, J. L. **Solid-vapor reactions of cholic acid and methyl cholate with acetonitrile: structures and reaction kinetics.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 495-502 (1995).

- 71 Virtanen, E., Nissinen, M., Suontamo, R., Tamminen, J. & Kolehmainen, E. **Comparison of epimeric methyl lithocholate and methyl iso-lithocholate molecules: single crystal X-ray structure of methyl lithocholate, ab initio HF/6-31G optimized structures and experimental and calculated DFT/B3LYP 13C NMR chemical shifts.** *J. Mol. Struct.* **649**, 207-218 (2003).
- 72 Sada, K., Kondo, T., Miyata, M., Tamada, T. & Miki, K. **A novel molecular channel with a hydrogen bond 'hook'; inclusion phenomena of cholamide and the crystal structure of a 1:1 complex of cholamide and 1,4-dioxane.** *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 753-755 (1993).
- 73 Sada, K., Kondo, T., Miyata, M. & Miki, K. **Inclusion Crystals of Cholic Acid and Cholamide with Alcohols : Importance of Hydrogen Bond " Double Hooks ".** *Chem. Mater.* **6**, 1103-1105 (1994).
- 74 Sada, K., Kondo, T. & Miyata, M. **Resolution of aliphatic alcohols by hydrogen bond "double hooks" of cholamide inclusion compounds.** *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 2655-2656 (1995).
- 75 Sada, K., Kondo, T. & Miyata, M. **Channel-type inclusion crystal with hydrogen bond 'hooks' of deoxycholamide.** *Supramol. Chem.* **5**, 189-191 (1995).
- 76 Sada, K., Matsuura, Y. & Miyata, M. **Hydrogen bond 'triple hooks' in an inclusion crystal of cholamide with aniline. Structural difference of inclusion crystals of cholic acid and cholamide with same guest.** *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **276**, 121-127 (1996).
- 77 Miyata, M., Sada, K., Yasuda, Y. & Miki, K. **Hydrogen bonding networks in bilayered crystals composed of facially amphiphilic compounds.** *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **240**, 183-186 (1994).
- 78 Sada, K., Hishikawa, Y., Kondo, T. & Miyata, M. **Specific inclusion of water by N-methyldeoxycholamide revealed by the crystal structure of the hemihydrate.** *Chem. Lett.*, 2113-2116 (1994).
- 79 Sada, K. *et al.* **Functionalization of inclusion cavities of bile acid hosts. Channel-type inclusion compounds of cholamide.** *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **71**, 1931-1937 (1998).
- 80 Hishikawa, Y., Sada, K., Watanabe, R., Miyata, M. & Hanabusa, K. **A novel class of organogelator based on N-isopropylcholamide and the first observation of fibrous colloidal aggregates.** *Chem. Lett.*, 795-796 (1998).
- 81 Hishikawa, Y., Watanabe, R., Sada, K. & Miyata, M. **Molecular arrangements in chiral sheets of N-alkylcholamides bilayered crystals.** *Chirality* **10**, 600-618 (1998).
- 82 Hishikawa, Y., Aoki, Y., Sada, K. & Miyata, M. **Selective inclusion phenomena in lithocholamide crystal lattices; design of bilayered assemblies through ladder-type hydrogen bonding network.** *Chem. Lett.*, 1289-1290 (1998).
- 83 Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. **Water-participation in the formation of a triangular pillar-like assembly in deoxycholamide inclusion crystals.** *J. Chem. Res. (S)*, 738-739 (1998).
- 84 Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. **Extremely specific recognition of ethylene glycol in three-leaved building blocks of N-methyldeoxycholamide.** *Supramol. Chem.* **11**, 101-108 (1999).
- 85 Yoswathananont, N., Kita, H., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. **A novel three-component pseudo-polymorphism in the cholamide inclusion crystals promoted by the combination of organic guest and water.** *Chem. Lett.*, 1234-1235 (2002).

- 86 Brunskill, A. P. J., Lalancette, R. A. & Thompson, H. W. **(+)-3-Oxo-5 α -cholan-24-oic acid: catemeric hydrogen bonding in a steroidal keto acid.** *Acta Cryst.* **C55**, 419-422 (1999).
- 87 Ryu, E., Ellern, A. & Zhao, Y. **High guest inclusion in 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxycholan-24-oic acid enabled by charge - assisted hydrogen bonds.** *Tetrahedron* **62**, 6808-6813 (2006).
- 88 Soto Tellini, V. H. Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* (2006).
- 89 Soto Tellini, V. H. *et al.* **New Lamellar Structure Formed by an Adamantyl Derivative of Cholic Acid.** *J. Phys. Chem. B* **110**, 13679-13681 (2006).
- 90 Soto Tellini, V. H. *et al.* **Supramolecular structures generated by a *p*-tert-butylphenylamide derivative of cholic acid. From vesicles to molecular tubes.** *Adv. Mater.* **19**, 1752-1756 (2007).
- 91 Daniel, M.-C. & Astruc, D. **Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology.** *Chem. Rev.* **104**, 293-346 (2004).
- 92 García Jaca, J. e. c. La nanotecnología en los plásticos. *Observatorio Industrial del Sector Químico* (2007).
- 93 Jadzinsky, P. D., Calero, G., Ackerson, C. J., Bushnell, D. A. & Kornberg, R. D. **Structure of a Thiol Monolayer-Protected Gold Nanoparticle at 1.1 Å Resolution.** *Science* **318**, 430-443 (2007).
- 94 Nayak, N. C. & Shin, K. **Synthesis of L-phenylalanine stabilized gold nanoparticles and their thermal stability.** *J. Nanoscience Nanotechnology* **6**, 3512-3516 (2006).
- 95 Liu, Q. *et al.* **Synthesis of nearly monodisperse gold nanoparticles by a sodium diphenylamine sulfonate reduction process.** *J. Mat. Sci.* **41**, 3657-3662 (2006).
- 96 Bhargava, S. K., Booth, J. M., Agrawal, S., Coloe, P. & Kar, G. **Gold Nanoparticle Formation during Bromoaurate Reduction by Amino Acids.** *Langmuir* **21**, 5949-5956 (2005).
- 97 Sharma, J. *et al.* **Solvent-Assisted One-Pot Synthesis and Self-Assembly of 4-Aminothiophenol-Capped Gold Nanoparticles.** *J. Phys. Chem. B* **108**, 13280-13286 (2004).
- 98 Jurvilliers, X., Schneider, R., Fort, Y., Walcarius, A. & Ghanbaja, J. **Novel single-phase and gram-scale synthesis of thiol-uncapped stable colloidal gold nanoparticles.** *J. Nanoscience Nanotechnology* **5**, 282-287 (2005).
- 99 Noponen, V., Bhat, S., Sievanen, E. & Kolehmainen, E. **Novel two-step synthesis of gold nanoparticles capped with bile acid conjugates.** *Materials Science & Engineering, C* **28**, 1144-1148 (2008).
- 100 Bhat, S. & Maitra, U. **Nanoparticle-Gel Hybrid Material Designed with Bile Acid Analogues.** *Chem. Mat.* **18**, 4224-4226 (2006).
- 101 Schwartzberg, A. M., Olson, T. Y., Talley, C. E. & Zhang, J. Z. **Synthesis, Characterization, and Tunable Optical Properties of Hollow Gold Nanospheres.** *J. Phys. Chem. B* **110**, 19935-19944 (2006).
- 102 Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. **Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine.** *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238-7248 (2006).
- 103 Sánchez-Cortés, S. SERS en coloides. *Óptica pura y Aplicada* **37 (2)** (2004).
- 104 Rao, C. N. R., *et al.* *Physical and Chemical Properties of Nano-sized Metal Particles.* (John Wiley & Sons, 2005).
- 105 Pardiñas-Blanco, I., Hoppe, C. E., López Quintela, M. A. & Rivas, J. *Journal of Non-Crystalline Solids* **356**, 826 (2007).

2

Estudio del estado cristalino de derivados del ácido cólico.

Este capítulo trata sobre el estudio del estado cristalino de algunos de los derivados del ácido cólico de los cuales ha sido posible obtener monocristales de calidad suficiente para la obtención de la resolución de la red cristalina en estado sólido. El capítulo comienza con una revisión bibliográfica cronológica de los descubrimientos más significativos en este campo de los ácidos biliares y sus derivados, centrándonos en los aspectos relacionados con el ácido cólico. El capítulo continúa con el análisis pormenorizado de los cristales obtenidos de los compuestos sintetizados para tratar de discernir el comportamiento de las nuevas moléculas sintetizadas.

Lo que conseguimos con demasiada facilidad nunca es objeto de gran estimación. Sólo lo que nos cuesta obtener otorga valor a las cosas.
(Thomas Paine)

Partes de este capítulo han sido publicadas en:

Steroids, 74, 2009 735-741

Cryst. Growth Des., 2010, 10 (3), pp 1124-1



2.1 INTRODUCCIÓN

La elaboración, caracterización y estudio de cristales de ácidos biliares ha sido un tema que ha suscitado un gran interés y ha sido extensamente abordado por diferentes grupos científicos durante los últimos 60 años como ya habíamos visto en la introducción. Esto está motivado en gran medida por el uso que estos compuestos tienen en una gran cantidad de aplicaciones. Los estudios cristalográficos que podemos encontrar en la bibliografía a menudo incluyen estudios de recristalización en disolventes con moléculas de diferente polaridad, tamaño y otras diferencias estructurales. La mayoría de estos estudios se han centrado sobre todo en el ácido cólico (CA) y desoxicólico (DCA).

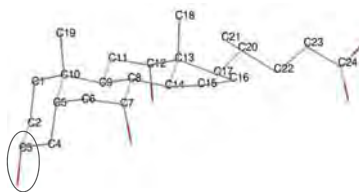
Durante el presente trabajo de investigación se han obtenido compuestos de inclusión, con el disolvente como molécula huésped o en algún caso libres de huésped, habiéndose observado diferentes tipos de cristales en cuanto a su estequiometría, sistema cristalino o grupo espacial. Ello está íntimamente relacionado con la capacidad del ácido cólico y otros ácidos biliares para formar complejos de inclusión con moléculas de diferente naturaleza, dando origen a complejos con diferentes sistemas cristalinos, grupos espaciales o estequiometrías como: 1:1(monoclínica $P2_1$)¹⁻³, 2:1(hexagonal $P6_522$)³⁻⁴, entre muchos otros.

En la bibliografía se puede encontrar un gran número de trabajos realizados con derivados de ácidos biliares naturales que abarcan diferentes aspectos como: (i) la influencia de la orientación de los grupos hidroxilo⁵⁻⁹; (ii) la influencia de la cadena lateral¹⁰⁻¹⁵; (iii) la influencia de la variación del grupo funcional en la cadena lateral (alcohol^{1,16-17}, éster de metilo^{1,18-23}, amida²⁴⁻³⁹).

Sin embargo se ha prestado una menor atención a las modificaciones realizadas en el grupo hidroxilo de la posición C3¹.

Algunos estudios realizados con derivados en esta posición corresponden (i) a los 3-ceto derivados del ácido litocólico⁴⁰; (ii) a 3 β -amino derivados de ácido cólico que forman compuestos de inclusión con altas relaciones sustrato/huésped, 1/4 (metanol)⁴¹ (sus formas zwitterionicas cristalizan en una estructura ortorrómbica $P2_12_12_1$ ⁴²) y (iii) al ácido [3 β , 5 β , 7 α , 12 α]-3[(adamantil-1-carbonil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico

¹ Numeración para el ácido cólico y región sobre la que se han realizado las modificaciones:



(AdCA), en el cual la superficie hidrófoba del ácido biliar natural ha sido incrementada mediante la incorporación del grupo adamantilo⁴³. Esta sustitución origina que su sal sódica origine estructuras laminares, las cuales están constituidas por bicapas cargadas separadas por moléculas de agua periódicamente intercaladas.

Por otro lado, cuando la superficie hidrófoba del ácido biliar natural es aumentada mediante la incorporación de un grupo como puede ser el *p-t*-butilfenilo en la misma posición, el nuevo derivado origina tubos moleculares en disolución⁴⁴. El hallazgo de estas nuevas estructuras supramoleculares en estos compuestos sugiere que se deben llevar a cabo estudios sobre la influencia de grupos hidrófobos por la posición C3, para tratar de profundizar en este hecho. Parte de los esfuerzos de este capítulo se centrarán en el estudio de la influencia de cambios en los grupos hidrófobos en dicha posición.

Con esta idea en mente se han sintetizado nuevos derivados como *norbornil-2-acetil*, *adamantil-1-acetil*, *adamantil-1-propionil*, *adamantil-1-succinil*, *adamantil-1-glutaril* y *N-(tert-butoxicarbonil)-S-tritil-L-cisteinil* de ácido cólico por la posición C3 y que han sido recristalizados en diferentes disolventes como acetona, DMSO, 2-propanol, 2-butanol y acetofenona, entre otros.

En algunos casos, como para la acetona, DMSO y 2-propanol, cuya geometría molecular es similar, la capacidad de formar enlaces de hidrógeno puede ser una característica diferenciadora a la hora de la formación del cristal. En otros casos veremos que la geometría puede jugar también un papel fundamental a la hora de obtener la estructura cristalina final.

Por todo ello, es de esperar que el disolvente o huésped también jueguen un papel importante en el empaquetamiento y en la formación de un complejo de inclusión concreto.

2.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A continuación, vamos a realizar una revisión bibliográfica que nos ayudará en la comprensión de los parámetros que hemos estudiado y nos proporcionará una mejor visión de cómo abordar el análisis de los cristales obtenidos. Nos centraremos fundamentalmente en el ácido cólico, como ya se ha mencionado con anterioridad, por ser este el ácido biliar natural de partida de nuestros derivados, y así poder seguir la evolución de las modificaciones realizadas en la molécula de origen. Cabe decir que el análisis aquí realizado podría ser extendido a otros ácidos biliares y sus derivados, tales como los ácidos desoxicólico, litocólico, ursodesoxicólico, quenodesoxicólico, taurocólico y glicocólico.

La revisión la hemos comenzado en 1965 fecha en la cual Dorita A. Norton y Bárbara Haner¹ publican los que pueden ser considerados como los primeros datos

cristalográficos para trece derivados de ácidos biliares. Entre ellos se encuentran el ácido 3 α ,7 α , 12 α -triol 5 β -colánico o ácido cólico (CA), su sal sódica (NaC) y su éster metílico (CMe). La molécula de ácido cólico fue cristalizada en acetato de etilo y se encontró que estaba hidratada con 4 moléculas de agua, mientras que el éster metílico presenta un compuesto de inclusión con etanol con estequiometría 1:1. Algunos de los datos obtenidos se encuentran recogidos en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Datos de los cristales obtenidos para ácido cólico, su sal sódica y éster de metilo¹

	Ácido Cólico	Colato de Sodio	Colato de Metilo
Disolvente/Huésped	Acetato de Etilo / Agua	Acetona / s.h.	Etanol / Etanol
Estequiometría	1(CA) : 4(agua)	1	1(CA) : 1(etanol)
Sis. Crist., Grupo Espacial	Monoclínico, P2 ₁	Monoclínico, P2 ₁	Monoclínico, C2

Deben transcurrir siete años para que en 1972, Paul L. Johnson y John P. Schaefer⁴⁵ publiquen nuevos datos cristalográficos de lo que denominaron, por primera vez, como el *complejo de adición* formado por ácido cólico y etanol, con estequiometría 1:1 y perteneciente al sistema ortorrómbico P2₁2₁2₁. Estos autores analizan a fondo la conformación del anillo D del núcleo esteroide en términos del ángulo máximo de torsión, φ_m , y del ángulo de fase de pseudorotación, Δ , definidos por Altona y col.⁴⁶ en 1968 para describir los anillos flexibles de cinco miembros.[#] (Figura 2.1)

La conformación encontrada para este complejo es intermedia entre *media silla* y *sobre* pero con valores próximos a esta última. También se observa que un cambio en el disolvente da lugar a que las moléculas se reordenen surgiendo un sistema cristalino diferente en comparación con el primer caso.

En este momento se propone, por primera vez, un *esquema de 5 enlaces de hidrógeno* (Figura 2.2), que implica la participación de 3 moléculas de ácido y una de etanol. La secuencia de enlaces de hidrógeno resultante se considera en *bucle cerrado* y va a ser común para cristales de los alcoholes alifáticos de cadena corta.

[#] Altona y col. definen los valores de Δ que nos orientarán sobre la descripción cuantitativa de la conformación del anillo D del núcleo del esteroide, si este valor se aproximan a 0, esto indica que la conformación es en media silla mientras que valores próximos a -36° o +36° indican una conformación en sobre. Se calculan según las siguientes expresiones:

$$\tan \frac{\Delta}{2} = \frac{(\varphi_2 + \varphi_4) - (\varphi_1 + \varphi_3)}{3.0777 \cdot \varphi_0} \quad \varphi_m = \frac{\varphi_0}{\cos(\frac{\Delta}{2})}$$

siendo $\varphi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15}$, $\varphi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14}$, $\varphi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13}$, $\varphi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17}$ y $\varphi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16}$, se observa también que cuando $\Delta = 0^\circ$ entonces $\varphi_0 = \varphi_m$.

Disolvente y Huésped	Etanol
Estequiometría	1(CA):1(Etanol)
Δ (°)	23.28
φ_m	49.11
$\varphi_0 \equiv C17-C13-C14-C15$	+48.1
$\varphi_1 \equiv C16-C17-C13-C14$	-43.4
$\varphi_2 \equiv C15-C16-C17-C13$	+24.5
$\varphi_3 \equiv C14-C15-C16-C17$	+4.8
$\varphi_4 \equiv C13-C14-C15-C16$	-32.6
Conformación del anillo D	Intermedio entre Media-Silla y Sobre

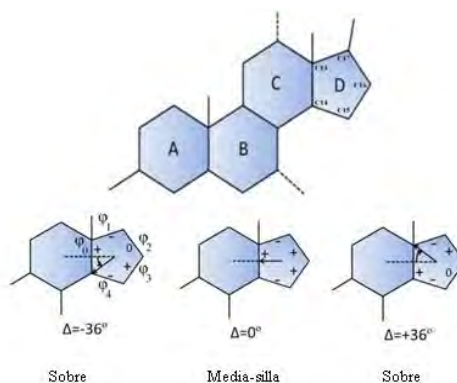


Fig. 2.1 Datos y esquema de la conformación del anillo D complejo CA:etanol.

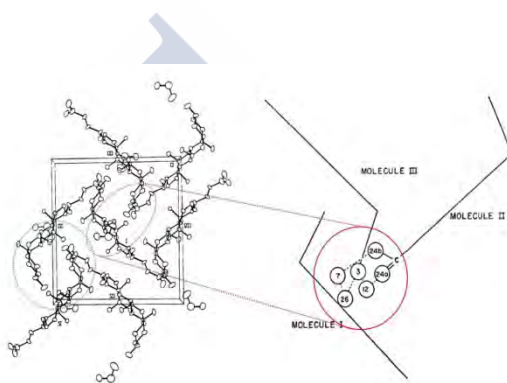


Fig. 2.2 Esquema de enlaces de hidrógeno y canales hidrófobos generados en el cristal CA:etanol.

En la figura anterior se puede apreciar, indicado con un círculo verde, la formación de *canales hidrófilos en el seno de la red cristalina*, hecho al cual no se hace referencia en el artículo pero que se evidenciará en trabajos posteriores. Con respecto a la estructura cristalina del éster de metilo en etanol ya mencionada, se ha producido un cambio en el sistema cristalino y grupo espacial pasando de un sistema monoclinico C2 en el caso del éster a uno ortorrómbico P2₁2₁2₁ en el caso del CA. *Por lo tanto se puede afirmar que la transformación de grupos funcionales parece afectar de un modo claro a la formación de la estructura cristalina.*

En 1982, Leslie Lessinger² publica la estructura del *ácido cólico monohidratado* obtenido mediante recristalización del ácido en una mezcla de ácido acético:agua, con estequiometría 1:1 y sistema monoclinico P2₁. Se recoge en este artículo que el *empaquetamiento* se produce en *bicapas* de moléculas de ácido cólico paralelas al plano *bc*, entre las cuales se alojan las moléculas de agua, por lo cual el *interior* de estas bicapas es *hidrófilo*, mientras que el *exterior* es *hidrófobo*.

También se cita el esquema de enlaces de hidrógeno, que indica que cada molécula de ácido cólico está unida a otras cuatro homólogas, dos de cada lado de la bicapa, y a otras tres de agua. Cada molécula de agua está aproximadamente situada en el centro de una disposición tetraédrica de enlaces de hidrógeno conectando tres moléculas de ácido cólico (una de una mitad de la bicapa y dos de la otra). Las secuencias de enlaces de hidrógeno seguidas se muestran a continuación²:

Bucle cerrado: $O_{agua_1}-H \rightarrow O_3-H \cdots O_{24b}=C-O_{24a} \cdots O (12)-H$

Red helicoidal infinita: $O (7) \rightarrow O_{agua_1} \rightarrow O (7') \rightarrow O_{agua_2} \rightarrow \dots$

Posteriormente, en 1987, Miyata y col.⁴⁷ dan cuenta de las estequiometrías de los compuestos de inclusión formados por el ácido cólico y una gran variedad de moléculas huésped, como: alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres, ácidos, ésteres y nitrilos. Observan que en la mayoría de los casos la relación molar sustrato:huésped es 1:1, excepto en los 3 alcoholes estudiados (metanol, n-butanol, fenilmetanol) para los que la relación es 1:2.

Estos mismos autores al año siguiente 1988, publican la estructura del compuesto de inclusión ácido cólico:acetofenona⁴⁸ con estequiometría 1:1, que ya había sido descrita en el artículo anterior. Las moléculas de acetofenona se acomodan en los canales hidrófobos que dejan las moléculas de ácido cólico al empaquetarse, siendo este empaquetamiento diferente al de los otros dos ácidos biliares. En las caras hidrófilas tienen lugar 4 tipos de enlaces de hidrógeno que originan una red que sigue la siguiente secuencia:

Bucle cerrado: $O_{12}-H \cdots O_{24b}=C-O_{24a}-H \cdots O_7-H \cdots O_3-H \cdots O_{12}$.

Esta disposición también es diferente de las correspondientes a los cristales con agua² y etanol⁴⁵. En la Figura 2.3 se puede observar la disposición de las moléculas de acetofenona en la red con ácido desoxicólico y ácido cólico así como las distancias entre moléculas consecutivas de huésped.

Dos años más tarde en 1990, el mismo grupo de investigación trata de racionalizar las estructuras encontradas hasta ese momento para el ácido cólico estudiando primero el cristal sin inclusión⁴⁹, obtenido de una disolución de acetona a 30°C, que resultó ser ortorrómbico P2₁2₁2₁. Este cristal puede absorber moléculas de acetofenona pasando a ser monoclinico, idéntico al obtenido de manera directa. Además, el huésped se puede eliminar reversiblemente sin la intervención de estados amorfos, lo que es un hecho novedoso con respecto a la idea aceptada hasta la fecha.

² Los números indican la posición de los grupos en la molécula del esteroide según la numeración convencional mostrada anteriormente.

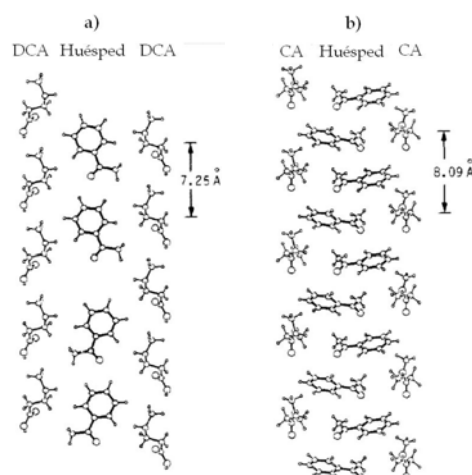


Fig. 2.3 Disposición de las moléculas de acetofenona en los diferentes complejos de inclusión: a) DCA:acetofenona, b) CA:acetofenona⁴⁸.

Por lo tanto, se propone por primera vez que el ácido cólico posee una estructura en capas dinámica que se puede modificar para la incorporación de huéspedes con la consiguiente reorganización de los enlaces de hidrógeno, hecho que califican como el primer ejemplo de intercalación en cristales orgánicos. También sugieren que las moléculas pequeñas como el ácido cólico pueden expresar su información molecular mediante su comportamiento originando diferentes asociaciones y estructuras moleculares. Este hecho puede tener un papel importante en los procesos de la evolución molecular, como lo tienen las macromoléculas en los sistemas biológicos.

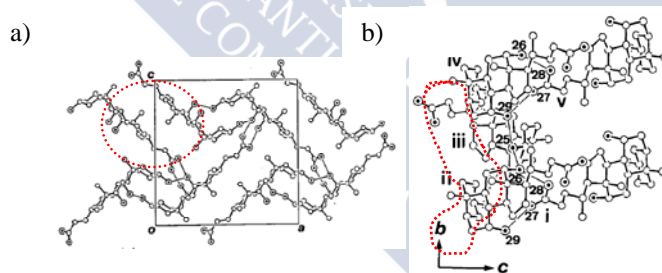
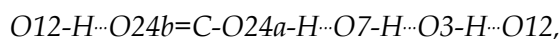


Fig. 2.4 Disposición de las moléculas de sal biliar en el cristal sin huésped, a) vista a lo largo del eje b, b) vista a lo largo del eje a.

El cristal de CA sin inclusión fue analizado con más detalle en otro artículo publicado este mismo año por K. Miki y N. Kasai⁵⁰. En el mismo, se indica que el ordenamiento de las moléculas (véase Figura 2.4), vista a lo largo del eje b es similar al del cristal con etanol⁴⁵ y que los cuatro enlaces de hidrógeno, que forman una red helicoidal alrededor del eje cristalográfico b, son los siguientes:



Esta red está indicada mediante un círculo rojo en las figuras anteriores. Esta situación genera un plegamiento de hojas apiladas provocando que no existan cavidades entre ellas.

En el compuesto con etanol⁴⁵, las moléculas huésped se insertan entre los átomos O3 y O7 y ello lleva consigo un cambio en la dirección de los átomos donantes y aceptores, también con respecto a la molécula cristalizada en ácido acético/agua². Como se observa en la Figura 2.5, las moléculas de agua se insertan entre los átomos O3 y O12.

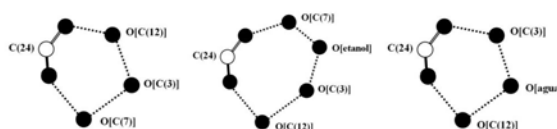


Fig. 2.5 Esquema de la red de enlaces de hidrógeno en bucle cerrado para los complejos CA sin huésped, con etanol y agua respectivamente.

En este mismo año, Elizabeth L. Jones y Luigi R. Nassimbeni⁵¹ publicaron las estructuras de los cristales de inclusión del ácido cólico con los huéspedes *metanol*, *etanol* y *propanol*. Tales cristales fueron obtenidos mediante la evaporación lenta de las correspondientes disoluciones alcohólicas (véase la Tabla 2.3). Aunque los tres poseen estequiometría 1:1, el primero de ellos es inestable al aire y en este caso la relación sustrato-huésped puede llegar a ser de 1:3. No se observa la formación de bicapas y los alcoholes se alojan en las cavidades que dejan las moléculas del ácido biliar participando en un único esquema de enlaces de hidrógeno:

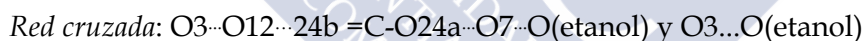


Tabla 2.3. Datos de los complejos de inclusión del ácido cólico con metanol, etanol y 1-propanol.

Disolvente y Huésped	Metanol	Etanol	1-Propanol
Estequiometría	1:1	1:1	1:1
Sist. Cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Δ (°)	18.7	23.1	17.5
φ _m	46.3	46.4	46.9
Conformación del anillo D	Intermedia Media-Silla y Sobre	Intermedia Media-Silla y Sobre	Intermedia Media-Silla y Sobre

La conformación del anillo D es intermedia a media silla y sobre, y del análisis de la conformación de la cadena lateral se concluye que se presenta extendida tipo *trans* (*tttt*).[#]

[#] Giglio y Quagliata definen cuatro ángulos de rotación interna asociados a los ángulos de torsión de la cadena lateral que van a estar relacionados con la flexibilidad conformacional y la capacidad para la formación de enlaces de hidrógeno. “t” indica disposición *trans* o estirada ángulos próximos a 180° y “g” indica una disposición *gauche* o encogida con ángulos próximos a 60°. ⁶³

En este artículo, se le da una gran importancia al tamaño del huésped y los autores estiman que el propanol posee un tamaño similar al de las cavidades generadas, mientras que el metanol, por su menor tamaño, puede introducirse en un mayor número de moléculas sin la participación de enlaces de hidrógeno, lo que justificaría la inestabilidad de este cristal.

Un año más tarde en 1991, Kunio Miki y col. publican la estructura del cristal de inclusión *ácido cólico:γ-valerolactona*⁵², con estequiometría 1:1, que pertenece al sistema monoclinico P2₁, resultando similar al del cristal con acetofenona como huésped⁴⁸. El parecido alcanza incluso el esquema de enlaces de hidrógeno (ya comentado anteriormente).

Miyata y col. en 1992⁵³ analizan y extienden el estudio de polimorfismo y de fenómenos de intercalación a los cristales de ácido cólico, estando recogidos los huéspedes estudiados en la Tabla 2.4.

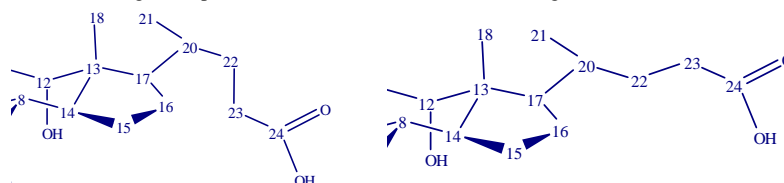
Tabla 2.4. Sistemas cristalinos y grupos espaciales para diferentes complejos de inclusión de ácido cólico.

Huésped	Acetona, sin huésped, Etanol, Acrilonitrilo	Agua, Acetofenona, γ-valerolactona	Acetilacetona	3-metilciclohexanona
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Monoclinico P2 ₁	Triclinico P1	Monoclinico C2
Ortorrómbico: α = β = γ = 90°, a ≠ b ≠ c; Monoclinico: α = β = 90° ≠ γ, a ≠ b ≠ c; Triclinico: α ≠ β = γ ≠ 90°, a ≠ b ≠ c				

Asimismo, hacen referencia a que en las estructuras ortorrómbicas las moléculas de ácido biliar están unidas unas a otras formando *secuencia de enlaces de hidrógeno de tipo helicoidal*, y resaltan que mientras que las moléculas de etanol unen estas secuencias, las de acrilonitrilo se alojan en las cavidades. En las estructuras monoclinicas se producen enlaces de hidrógeno entre el grupo carboxilo y grupos hidroxilo originando bicapas que dejan canales cerrados.

En 1993 el cristal *CA:agua* fue objeto de un exhaustivo estudio por Lessinger y Low⁴. En el cristal, un hemihidrato 2:1, hexagonal P6₅22, la molécula de agua se encuentra desordenada entre dos posiciones no equivalentes, hecho extensamente argumentado.

La conformación *gauche* (encogida) viene caracterizada por un ángulo de torsión sobre C(20)-C(22) de 60°, mientras que la conformación *trans* (estirada) el ángulo es próximo a 180°, como se ilustra en las figuras:



Esta definición puede extrapolarse a otros ángulos de torsión como ya explicamos anteriormente.

En este mismo año Caira *y col.* publicaron los cristales *ácido cólico:anilina* y *ácido cólico:nitrobenzeno*⁵⁴, con estequiometrías 1:1 y monocínicos, al igual que sucedía para la mayoría de los complejos vistos hasta el momento.

También Miyata *y col.*⁵⁵ examinan el papel de la cadena lateral en los cristales de ácido cólico en estructuras ya conocidas. *A diferencia de los cristales de ácido desoxicólico, los de ácido cólico presentan un polimorfismo que depende del huésped*, proveniente del hecho de que los 4 grupos potenciales para la formación de enlaces de hidrógeno (grupos hidroxilos y carboxilo) unen las moléculas de formas diferentes. Algunos presentan *formación de canales*, como en el caso de la *acetofenona*⁴⁸ o la γ -*valerolactona*⁵², mientras que otros no lo hacen como algunos alcoholes alifáticos^{45,51}, o cuando no presentan huéspedes⁵⁰. En los cristales, las moléculas de ácido desoxicólico están unidas en disposición cabeza-cola, presentando la cadena lateral una conformación *gauche* y constantes de red muy similares. Sin embargo, en los cristales de ácido cólico, con *disposición cola-cola*, se pueden dar en la cadena lateral conformaciones tanto *trans* como *gauche* dependiendo del huésped.

En este año también se lleva a cabo un estudio de RMN de ¹³C para averiguar las poblaciones, conformaciones y movimientos moleculares de los *enantiómeros de la γ -valerolactona* ocluida en cristales de ácido cólico⁵⁶. El motivo de realizar dicho estudio radica en datos contradictorios acerca de este sistema, ya que se había publicado tanto la inclusión de ambos isómeros⁵⁶ como la selectiva del isómero S⁵². Puesto que la inclusión de los dos isómeros del huésped en los canales del sustrato es un proceso que puede asimilarse a una reacción competitiva, *discuten la enantioselectividad en términos de un factor de acomodación relativa que se relaciona con la variación de la energía libre*.

Al tratar de observar el efecto de un hidrocarburo como huésped, Miyata *y col.* publicaron la estructura del cristal de *ácido cólico:benzeno*⁵⁷ con estequiometría 1:1 y monocínico P2₁. El complejo de inclusión está ordenado en bicapas con canales en su parte hidrófoba. Esta estructura es isomorfa con la de los cristales de ácido cólico y los huéspedes γ -valerolactona⁵², acetofenona⁴⁸, nitrobenzeno y anilina⁵⁴. En la parte hidrófila de la bicapa se establece una red de enlaces de hidrógeno ya vista con anterioridad para el complejo sin huésped que conduce a un ordenamiento molecular cabeza-cabeza y cola-cola común para este tipo de huéspedes.

Casi simultáneamente, Shibakami *y Sekiya* estudiaron el efecto de un átomo de flúor sobre los canales y la pauta de los enlaces de hidrógeno mediante las estructuras cristalinas del *ácido cólico:anilina* y del *ácido cólico:3-flúoranilina*⁵⁸. Ambos cristales son monocínicos P2₁, pero se diferencian en cuanto a su estequiometría ya que para el primero es 1:1 y 1:2 para el segundo. La novedad radica en que en este último caso se generan canales dobles como se muestra en la Figura 2.6, originando este tipo de

estequiometría. Los enlaces de hidrógeno en ambos complejos siguen la secuencia cíclica de la del benceno y los otros huéspedes anteriormente descritos.

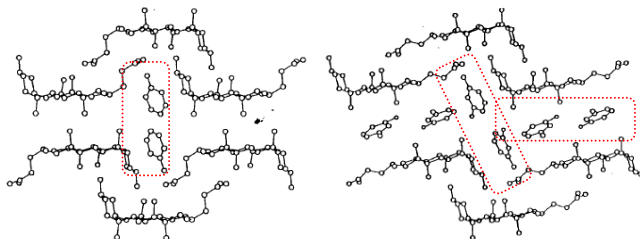


Fig. 2.6 Vistas de los canales generados en los complejos ácido cólico:anilina y ácido cólico:3-flúoroanilina, respectivamente. ⁵⁸

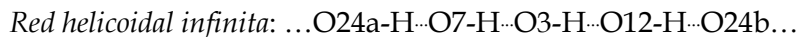
Más adelante estos mismos autores publicarán un estudio con diferentes derivados fluorados del etanol⁵⁹, estudiando las estructuras cristalográficas de los complejos de ácido cólico con 2-fluoretanol, 2,2-difluoretanol y 2,2,2-trifluoretanol. Todos ellos tienen una estequiometría 1:1 y son ortorrómbicos. El efecto de los átomos de flúor no afecta significativamente a los valores de los ángulos de torsión ni al empaquetamiento en el cristal. La secuencia de enlaces de hidrógeno sigue una red cíclica similar a la ya descrita para el etanol.

Caira y col.⁶⁰ publicaron la estructura del cristal CA:acetona:agua con estequiometría 1:1:3, que resultó ser monoclinico $P2_1$ con una estructura única entre las típicas que presenta el ácido cólico debido a la red de enlaces de hidrógeno que muestra. En efecto, los autores observan enlaces sustrato-sustrato, sustrato-huésped y huésped-huésped, con una red de 10 enlaces de hidrógeno.

Otra publicación del mismo grupo⁶¹ se centró en el estudio de los complejos de inclusión del ácido cólico y cinco ésteres alifáticos, todos ellos monoclinicos y de estequiometría 1:1, a excepción del acetato de metilo que es triclinico. Los autores encontraron dos tipos de empaquetamiento diferentes que suponen canales, de tamaño y orientaciones distintas, que alojan a huéspedes con diferentes características. En el caso del acetato de metilo, el esquema de enlaces de hidrógeno encontrado se observa que da lugar a dos posibilidades. Estas surgen de las dos orientaciones del grupo carboxilo, sin causar diferencias en la estructura global, debido a la no existencia de barreras para la rotación libre sobre el enlace C23-C24 posibilitando la inversión de donantes y aceptores.

Este esquema, seguido también por el propionato de etilo y el acetato de *i*-propilo, es similar al obtenido anteriormente para la acetofenona y γ -valerolactona, mientras que los esquemas de enlaces seguidos por el acetato de etilo y el *n*-propilo son similares al obtenido para el cristal de ácido cólico sin huéspedes.

Estos mismos autores estudiaron los compuestos de inclusión 2:3, 1:1 y 1:1 del *ácido cólico y tres cetonas: acetona, metiletilcetona y dietilcetona*⁶². Las tres estructuras poseen la misma red de enlaces de hidrógeno:



Esta red da lugar a bicapas que dejan canales libres para la inclusión. En el caso del huésped metiletilcetona se da la misma situación de inversión de los enlaces de hidrógeno que la comentada en el artículo anterior⁶¹.

Un año más tarde, en 1995, Shibakami *y col.*³ llevaron a cabo un estudio cristalográfico y de cálculos moleculares de los complejos de inclusión con estequiometría 1:1 entre el *ácido cólico y las cetonas: acetofenona, 3'-flúoroacetofenona, 4'-flúoroacetofenona y 2'-cloroacetofenona*. Los cuatro cristales poseen la misma *red cíclica o bucle cerrado* de enlaces de hidrógeno ya descrita con anterioridad para moléculas como la acetofenona. Mediante el estudio de las estructuras de empaquetamiento que da lugar a dos tipos de canales, se llegó a la conclusión de que *la estructura resultante depende del tipo de canal y no del tamaño del huésped*.

Hasta este momento parece que el ácido cólico se ordena en los complejos de inclusión cristalinicos en forma cabeza-cabeza y cola-cola mientras que el ácido desoxicólico lo hace en forma cabeza-cola. Tratando de deducir si estos ordenamientos son inherentes al sustrato o dependientes del huésped, Miyata *et al.*⁶³ llevaron a cabo un trabajo en el que demostraron que *los ordenamientos moleculares pueden invertirse mediante la introducción de cierta clase de huéspedes*. A esta conclusión llegaron tras el *análisis del cristal ácido cólico:o-xileno*.

Los autores diferencian los huéspedes hidrocarburos aromáticos en función de la estequiometría que presentan: *compuestos de inclusión 1:1 (como 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)* y los que presentan *estequiometría 2:1 (como el 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)*.

El cristal estudiado, ácido cólico:o-xileno es monoclinico P2₁ presentando estequiometría 2:1, al igual que el ácido cólico:benceno⁵⁷ y ácido desoxicólico:o-xileno⁶⁴, pero el ordenamiento de las moléculas de esteroide es 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 el ordenamiento cabeza-cola y cíclica para el cabeza-cabeza cola-cola*.

En el mismo año, Shibakami *y col.*⁶⁵ estudiaron el intercambio de huéspedes en cristales de ácido cólico dejando un determinado complejo cristalino en un líquido que puede actuar como huésped potencial (Tabla 2.5). Los huéspedes seleccionados fueron agua y los alcoholes 2-, 3- y 4-flúorbencílicos (FBzOH).

Tabla 2.5. Datos obtenidos en los complejos de inclusión de ácido cólico con diferentes derivados fluorados obtenidos mediante intercambio de huéspedes

Huéspedes	Estequiometría	Sistema cristalino, grupo espacial
2-FBzOH, 4-FBzOH, H ₂ O(I), 4-FBzOH ¹	1:1	Monoclínico, P2 ₁
3-FBzOH	1:1.5	
4-FBzOH ²	2:1	
H ₂ O(II) ³ , H ₂ O(II) ⁴ , H ₂ O(II) ⁵ , H ₂ O(II) ⁶	2:1	Hexagonal, P6 ₃ 22

¹ Por intercambio de 2- a 4-FBzOH; ² por intercambio de 3- a 4-FBzOH; ³ obtenido a partir del complejo con 2-FBzOH por intercambio de huésped; ⁴ por intercambio de 3- a 2-FBzOH, moléculas de agua que provienen del disolvente; ⁵ por intercambio de 2-FBzOH a agua; ⁶ por intercambio de 3-FBzOH a agua.

Estos resultados ponen de manifiesto que los procesos de intercambio de huéspedes se producen sin pasar por el estado amorfo. Así, al pasar del 3- al 4-FBzOH la red cíclica de enlaces de hidrógeno cambia porque se modifica el número de miembros en los anillos cíclicos, cosa que no sucede en la transformación de 2- a 4-FBzOH. Además, el análisis de la simetría indica que estas transformaciones cristal-cristal son topológicas, característica que por primera vez se propone para cristales de ácido cólico. En los procesos de intercambio por agua sucede que la red cíclica se destruye para pasar a ser lineal.

Los mismos autores continúan esta investigación con el estudio de los complejos de inclusión de ácido cólico con anilina y alguno de sus derivados mono- y di-flúorados (Tabla 2.6)⁶⁶, como continuación de uno de sus trabajos publicado el año anterior en el cual se analizaban los complejos con la anilina y la 3-flúoroanilina⁵⁸.

Tabla 2.6. Datos obtenidos en los complejos de inclusión de ácido cólico con la anilina y diferentes derivados flúorados⁶⁶⁻⁶⁷.

Huéspedes	Estequiometría	Sistema cristalino, grupo espacial
Anilina, 2-fluoroanilina, 4-fluoroanilina, 3,4-difluoroanilina, p-toluidina ⁷⁸	1:1	Monoclínico, P2 ₁
3-fluoroanilina	2:1	

Si se analizan los enlaces de hidrógeno se observan dos esquemas claramente diferenciados como muestra la Figura 2.7, uno consistente en un biciclo con enlaces establecidos por el grupo amino (*anilina*, 3- y 4-*flúoranilina* y 3,4-*diflúoranilina*) y el otro un sistema cíclico sencillo (*2-flúoranilina*) donde el grupo amino no participa en los enlaces de hidrógeno intermoleculares.

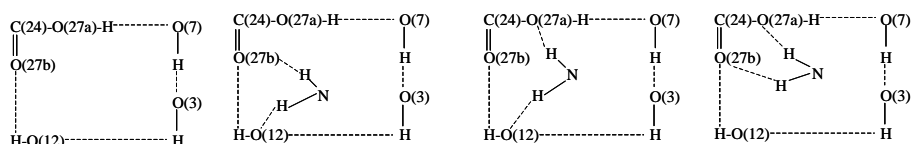


Fig. 2.7. Ejemplos de redes de enlaces de hidrógeno: biciclos con puentes originados mediante grupos amino y sistema cíclico sencillo.

En 1996 Janet L. Scott estudia el complejo cristalino *ácido cólico:p-toluidina*⁶⁷. Mediante la reacción en fase sólida obtienen un sistema monoclinico P2₁ de estequiometría 1:1, formando canales hidrófobos en donde se alojan moléculas del huésped a lo largo del eje cristalográfico *b*.

En este mismo año Sada *y col.*⁶⁸ estudian la *discriminación quiral de (R)- y (S)-1-feniletilamina por el ácido cólico*, en forma de sus correspondientes sales, obteniéndose para todas ellas sistemas monoclinicos P2₁. 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.

Miyata *y col.*⁶⁹ describieron la formación de cristales de inclusión, para un mismo huésped. Se observaron diferentes secuencias de enlaces de hidrógeno al utilizar un tercer componente añadido a la disolución de huésped-sustrato. Los huéspedes estudiados son *acrilonitrilo* y *ácido acético* obteniéndose los resultados recopilados en la Tabla 2.7.

Los cristales con *acrilonitrilo* obtenidos *sin cosolvente* son *ortorrómbicos*, en los que las moléculas de sustrato forman una *estructura cruzada* con *redes helicoidales de enlaces de hidrógeno*:



Los obtenidos *con un cosolvente* son *monoclinicos*, siendo ahora la *estructura en bicapas* con *redes cíclicas de enlaces de hidrógeno tipo*:

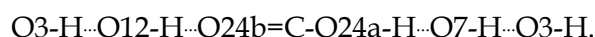
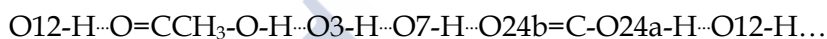


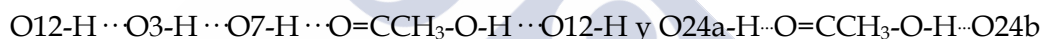
Tabla 2.7. Datos para cristales de inclusión de ácido cólico con o sin la utilización de cosolventes⁶⁹.

Huéspedes	Estequiometría	Sistema cristalino, grupo espacial
Acrilonitrilo, ácido acético	1:1	Ortorrómico, P ₂ ₁ ² ₁ ² ₁
Acrilonitrilo y 1-butanol (cosolvente)		Monoclínico, P ₂ ₁
Ácido acético y ciclohexano (cosolvente)	1:2	

En el caso del *ácido acético*, los cristales obtenidos poseen una *estructura cruzada* con una *red helicoidal de enlaces de hidrógeno* en el que está implicado el grupo carboxílico del huésped:



Los cristales obtenidos *con cosolvente* difieren en *estequiometría* y *estructura*, ahora formada a base de *bicapas* con *dos tipos de secuencias cíclicas de enlaces de hidrógeno* que también implican al huésped:



En otro trabajo del mismo grupo⁷⁰ se analizó la estructura del cristal *ácido cólico: n-propilbenceno*, indicando también que el ácido cólico forma más de 10 tipos de cristales polimórficos, mientras que el desoxicólico sólo 4 (todos a base de *bicapas*). Las estructuras polimórficas del ácido cólico se ven modificadas por los enlaces de hidrógeno (con *secuencias de tipo cíclico o helicoidal*) y por la *conformación de la cadena lateral* (en disposiciones *trans* o *gauche*). Además, en las capas lipófilas se pueden encontrar hasta tres tipos de posiciones relativas. El cristal estudiado posee estequiometría 1:1 y una organización cabeza-cabeza y cola-cola, con las cadenas laterales en conformación *trans*, formando un red cíclica de 4 enlaces de hidrógeno, todo ello similar al del complejo con γ -valerolactona, a excepción de la posición relativa de las bicapas en la parte lipófila. Estudiaron también la *eliminación del huésped mediante calentamiento* en dos etapas, con *cambio* de la *estequiometría* de los cristales y con *desplazamiento* de las *bicapas*.

Scott⁷¹ estudió la *formación de complejos de inclusión mixtos* con el *ácido cólico*, con huéspedes de diferente estructura. Así estudiaron los complejos con *1,2-diclorobenceno:acetona* y con *acetato de i-propilo:acetato de metilo* (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Datos para los complejos de inclusión mixtos de ácido cólico

Huéspedes	Estequiometría	Sistema cristalino, grupo espacial
1,2-diclorobenceno:acetona acetato de i-propilo:acetato de metilo	2:1:1	Triclínico, P1

La red de enlaces de hidrógeno entre las moléculas del sustrato son iguales en ambos cristales: O24a-H...O7-H...O3-H...O12-H...O24b. En ambos casos las cadenas laterales del esteroide adoptan una conformación *trans* o estirada.

En ese mismo año, Caira *y col.*⁷²⁻⁷³ obtuvieron, por exposición del sustrato a los vapores del huésped correspondiente, cristales del ácido cólico con diferentes huéspedes aromáticos. Los cristales tienen las mismas estructuras que los obtenidos por los métodos convencionales de cristalización.

En 1997 Miyata *y col.* describieron dos cristales polimórficos del ácido cólico con acrilonitrilo *y metacrilonitrilo*⁷³ obteniendo en todos los casos estequiometrías 1:1, con ordenamientos en bicapas o cruzadas que conducen a diferentes sistemas cristalinos como ortorrómbico P2₁2₁2₁ en las estructuras cruzadas, o triclínico P1 y monoclinico P2₁ para el ordenamiento en bicapas con metacrilonitrilo y acrilonitrilo, respectivamente.

Scott publica dos artículos en los que estudia la inclusión en ácido cólico con propiofenona⁷⁴, benzonitrilo *y p-nitrotolueno*⁷⁵ en los que indica que todos ellos poseen estequiometría 1:1, son monoclinicos P2₁ *y* presentan la misma secuencia de enlaces de hidrógeno. Con la propiofenona la cadena lateral se encuentra estirada mientras que para los otros dos complejos de inclusión se pone de manifiesto que la cadena se encuentra plegada.

Un año más tarde, Miyata *y col.*⁷⁶ publicaron otro artículo en el que aplicaron la química combinatoria para investigar la formación de complejos de inclusión cristalinos. Utilizaron las 10 aminas de la Figura 2.8 *y* 10 ácidos carboxílicos, entre los que se encuentra el ácido cólico, en una relación molar 1:1. Señalaron que con las aminas *a*, *b*, *c*, *f* *y* *h* se obtienen cristales sin huésped, con las *d* *y* *j* se obtienen cristales con inclusión, con la *e* *y* con la *i* no se produce cristalización *y* con la *g* sólo cristaliza la amina.

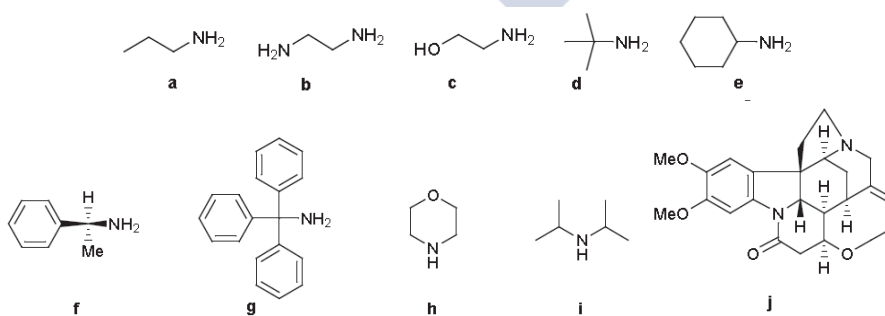


Fig. 2.8 Aminas utilizadas mediante química combinatoria para la obtención de complejos de inclusión con el ácido cólico por Miyata *y col.*⁷⁶

Asimismo, publicaron otro artículo⁷⁷ que comienza con la descripción de la capacidad de formar complejos de inclusión los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico y algunos de sus epímeros³. La información se resume en la Tabla 2.9 en la que “-”, representa la inclusión de huéspedes lipófilos, “--”, de huéspedes más lipófilos, “+”, de huéspedes hidrófilos, “++”, de huéspedes más hidrófilos, * cristales sin inclusión, y *nd* necesidad de realizar un estudio en mayor profundidad. Se observa que para el caso que nos atañe se favorecería la inclusión de huéspedes más hidrófilos o lipófilos.

Tabla 2.9. Capacidad de formar complejos de inclusión de los diferentes ácidos biliares en función de la naturaleza del huésped. ⁷⁷

sustituyente en C-3	sustituyente en C-7			sustituyente en C-12
	H	α -OH	β -OH	
α -OH	-	--	*	H
	--	--	nd	α -OH
	+	*	nd	β -OH
β -OH	++	+	--	H
	+	++	+	α -OH
	+ y -	+	nd	β -OH

También establecieron las relaciones entre las estructuras moleculares y las asociaciones moleculares, y para ello se fijan en que *las moléculas de sustrato se asocian para dar tres tipos de arquitecturas diferentes: cruzadas, en capas o helicoidales*, así como en las secuencias de enlaces de hidrógeno que se establecen. Estas secuencias representativas se muestran en la Figura 2.9, respectivamente para el ácido cólico (*cíclicos sin participación de huéspedes*) y desoxicólico (*helicoidal*).

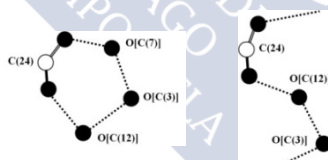


Fig. 2.9 Redes de enlaces de hidrógeno típicas para el ácido cólico y desoxicólico respectivamente sin la participación de huéspedes. ⁷⁷

Al comparar parejas de ácidos, señalan que los *diferentes esquemas de enlaces de hidrógeno justifican las grandes diferencias en las capacidades de inclusión*. Así, mientras el ácido cólico sólo incluye alcoholes muy pequeños, el ácido 3-epicólico también incluye alcoholes de mayor tamaño, y mientras el ácido epidesoxicólico posee una capacidad limitada para la inclusión de alcoholes, los cristales del desoxicólico no incluyen este tipo de huéspedes.

³ Estereoisómeros de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno sólo de sus centros estereogénicos.

Polonski y Gdaniec⁷⁸ estudiaron diferentes complejos de inclusión 1:1 entre el *ácido cólico* y seis *cetonas aromáticas* diferentes: (I) *PhCOMe*, (II) *4-F-C₆H₄-COMe*, (III) *2-Cl-C₆H₄-COMe*, (IV) *PhCOEt*, (V) *4-F-C₆H₄-COEt* y (VI) *PhCHO*, así como los del ácido desoxicólico con los huéspedes (I) y (IV), con estequiometría 2:5 y 1:3 respectivamente. Del trabajo realizado se deduce:

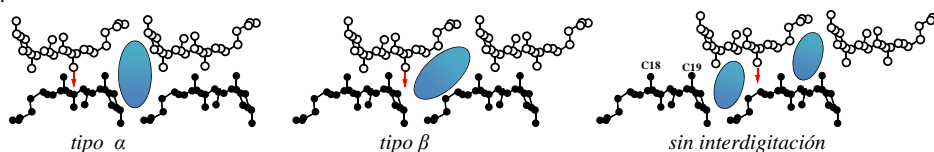
- En los complejos de ácido cólico con III, IV y V, los huéspedes se acomodan en canales tipo $\beta^{\#}$ formados entre bicapas de esteroide con sus cadenas laterales en disposición *trans* (estiradas).
- En los complejos de ácido cólico con I, II y VI, los huéspedes se presentan en canales tipo $\alpha^{\#}$ formados entre bicapas de esteroide con sus cadenas laterales en disposición *gauche* (plegadas).
- Las interacciones sustrato-huésped en los cristales de ácido desoxicólico son totalmente diferentes.

En el año 1999, Gdaniec y col.⁷⁹ estudiaron los complejos de inclusión formados entre el ácido cólico y desoxicólico con dos N-nitrosopiperidinas en diferentes medios (KBr y MeOH). Resultaron complejos 1:1 con el ácido cólico y 2:1 con el ácido desoxicólico.

En el año 2000, Polonski y col.⁸⁰ revisaron la estructura cristalina del complejo *ácido cólico:benzofenona*. En este artículo se define el llamado *polimorfismo dependiente del huésped* mediante el cual las moléculas de ácido cólico ajustan su modo de asociación y su conformación para adaptarse a diferentes tipos de huéspedes, fenómeno que ya hemos visto en repetidas ocasiones anteriores. En la mayoría de los cristales de inclusión del ácido cólico, los huéspedes se alojan en los canales que quedan entre las bicapas corrugadas, donde las moléculas de esteroide se ordenan en forma cabeza-cabeza cola-cola como se muestra en la Figura 2.10.

La forma y geometría del canal se ve modificada por la conformación de la cadena lateral pudiendo encontrarse extendida (*trans*) o plegada (*gauche*) y por desplazamientos mutuos de las bicapas. Todo esto da origen, normalmente, a

[#] La designación de los canales como tipo α y β , viene relacionado con la interdigitación de los carbonos C18 y C19 del núcleo esteroide, de manera que en una configuración tipo α el C18 de la parte lipófila superior de la bicapa está intercalado entre los C18 y C19 de la parte lipófila inferior, y en la configuración tipo β es el C19 el que se encuentra intercalado. En el caso de existir un mayor desplazamiento en el seno de la bicapa puede darse la situación de ausencia de interdigitación. La flecha roja indica la posición de C19 de la parte superior de la bicapa lipófila. Mediante el esquema podemos ver como varía la geometría de los canales hidrófobos.



estequiometrías 1:1. Los complejos de inclusión pueden formarse con las dos conformaciones de las cadenas laterales debido a un reordenamiento antiparalelo de las moléculas de esteroide en las dos partes que forman la bicapa (Figura 2.10 (a)). En los complejos de estequiometría 2:1, por ejemplo, con hidrocarburos aromáticos, las moléculas de esteroide se ordenan en las bicapas en forma cabeza-cola (Figura 2.10 (b)).

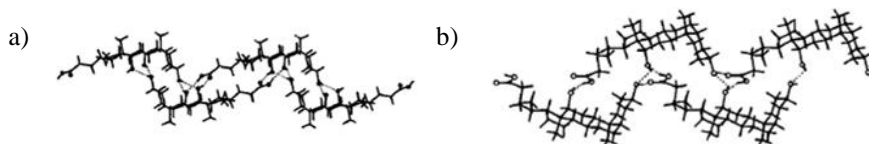


Fig. 2.10 (a) Representación de la relación cabeza-cabeza cola-cola, (ácido cólico) y (b) relación cabeza-cola (ácido desoxicólico)⁸⁰

Para el complejo CA:benzofenona, Miyata y col.⁴⁷ habían indicado una estequiometría 1:1, pero este huésped es demasiado grande para acomodarse en los canales manteniendo dicha estequiometría, motivo por el cual llevan a cabo la citada revisión. Se establece entonces que la estequiometría más adecuada es la 2:1, resultando un cristal monoclinico $P2_1$. En la celda unidad hay cuatro moléculas de esteroide simétricamente independientes, dos de ellas con conformación *gauche* y otras dos *trans*, situación no muy común en este tipo de complejos de inclusión (Figura 2.11). Las moléculas de huésped, se encuentran desordenadas alojándose en dos canales cristalográficamente distintos, pero topológicamente similares, en dos conformaciones diferentes. Las moléculas de esteroide 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 (*hh-tt*).



Fig. 2.11. Empaquetamiento del complejo de inclusión ácido cólico:benzofenona.⁴⁷

Dastidar⁸¹ estudió el complejo de inclusión ácido cólico:4-aminopiridina recrystalizado de metanol:agua, perteneciente al sistema monoclinico $P2_1$ con estequiometría 1:1 con 2 moléculas de agua. Presenta un red helicoidal de enlaces de hidrógeno en la que se une el O12 y el O24b en forma cabeza cola (*h-t*) que había sido observada y se creía exclusiva de los complejos de ácido desoxicólico (Figura 2.12).

A comienzos del presente siglo, Fantin⁸² estudió los compuestos de inclusión de los ácido cólico y desoxicólico con *diferentes cetonas cíclicas racémicas, permitiendo la separación de los enantiómeros*. El cristal ácido cólico: (-)-biciclo[3.2.0]-hept-2-en-6-ona (compuesto de importancia en la síntesis de la prostaglandina), resultó ser monoclinico

P₂₁ de estequiometría 2:1. Debe resaltarse que cuando se usa el ácido desoxicólico como sustrato se obtiene el *isómero contrario*, lo que pone de manifiesto que los *detalles estructurales juegan un papel importante en el proceso de discriminación quiral*. El cristal es isomorfo con los de muchos otros complejos entre el ácido cólico y cetonas, ésteres y derivados fenólicos ya vistos^{48,52,54,61-62,65}.

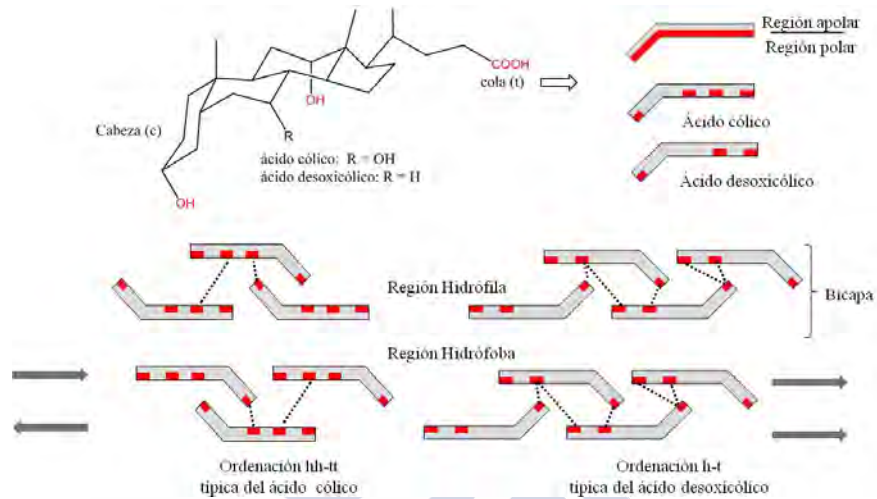


Fig. 2.12. Ejemplos de ordenaciones típicas para el CA y DCA en bicapas paralela y antiparalela en las bicapas.⁸¹

El *polimorfismo en estado sólido* se suele clasificar en dos tipos:

- a) El empaquetamiento de las mismas moléculas en formas diferentes.
- b) El empaquetamiento de isómeros conformacionales en formas diferentes, conocido como *polimorfismo conformacional*.

Miyata y col. al realizar un estudio de complejación entre *ácido cólico* y *acetato de etilo* mediante recristalización en presencia de 1-naftilmetilamina⁸³. Obtuvieron un cristal triclínico P1 con estequiometría 1:1 con una estructura diferente a la ya publicada para este mismo sistema⁶¹ (Tabla 2.10) y que, junto con otros ya descritos^{69,73}, pertenecen al último grupo de polimorfismo. En la Figura 2.13 se muestra el ordenamiento en bicapas *hh-tt* que es común a ambos cristales. Difieren en las conformaciones (*trans* y *gauche*) de la cadena lateral.

Tabla 2.10. Comparación entre complejos de inclusión del CA:acetato de etilo.⁸³

Ácido Cólico		
Disolvente (Huésped)	Acetato de etilo	1-naftilmetilamina / Acetato de Etilo Acetato de Etilo
Estequiometría	1:1	1:1
Sistema cristalino grupo espacial	Monoclínico P ₂₁	Triclínico P1

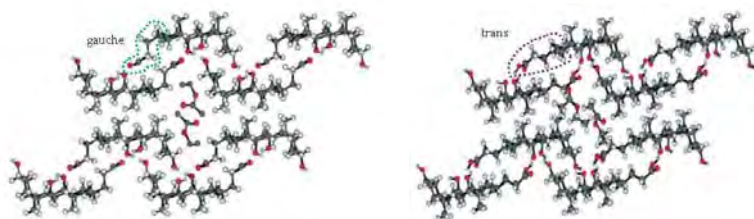
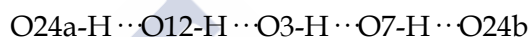


Fig. 2.13 Empaquetamiento de los complejos de inclusión ácido cólico:acetato de etilo: Izquierda: conformación *gauche*; derecha: conformación *trans*. Ambos tienen interdigitación β .^{61,83}

Por otro lado, mientras que el primer cristal descrito para este sistema mostraba una red cíclica de enlaces de hidrógeno, en este trabajo se observa una *red cíclica* idéntica a la anterior:



y otra *helicoidal*

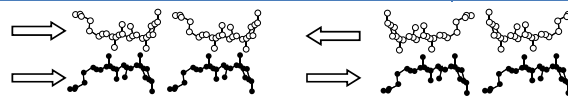


Por último, también describieron diferencias en la forma de los canales de inclusión.

En ese mismo año, Miyata también publicó una nueva forma de ordenamiento del ácido cólico en el cristal de inclusión con la *m*-cloroanilina⁸⁴ (ortorrómbico $P2_12_12_1$). Describió seis tipos de ordenamientos que pueden resultar por rotación y deslizamiento de capas lipófilas paralelas o antiparalelas, de los que tres ya eran conocidos, (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Relación entre la interdigitación de la capa lipófila y la orientación de las moléculas de esteroide.⁸⁴

Interdigitación	orientación antiparalela	orientación paralela
α	conocida ^{69,95}	desconocida
β	conocida ⁹⁵	desconocida
Sin interdigitación	conocida ^{91,94}	este trabajo ⁹⁴



Orientación paralela, α Orientación antiparalela, α

La estructura de la *m*-cloroanilina se muestra en la Figura 2.14 junto a la del cristal con anilina^{54,58}. Ambos poseen la misma red cíclica de enlaces de hidrógeno y las principales diferencias estriban en el desplazamiento de las bicapas que dan lugar a que en el complejo con *m*-cloroanilina no exista interdigitación de los metilos 18 y 19, mientras que para la anilina la interdigitación es tipo α . También se han encontrado

diferencias en la orientación paralela en el caso de la cloroanilina y antiparalela en el cristal con anilina.

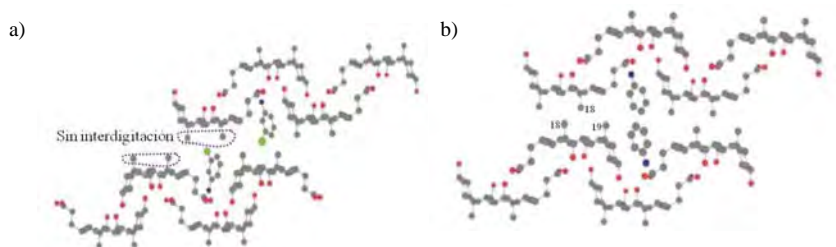


Fig. 2.14. Empaquetamientos de los complejos de inclusión ácido cólico: a) *m*-cloro anilina, sin interdigitación y b) anilina con interdigitación tipo α .^{54,58}

Polonski y col. también estudiaron los complejos de inclusión de los ácidos cólico y desoxicólico con nitrosobencenos y bencilo⁸⁵⁻⁸⁶. En la Tabla 2.12 incluye algunas características de los cristales descritos en dichos artículos.

Tabla 2.12. Datos para complejos de ácido cólico con nitrosobencenos⁸⁶ y bencilo⁸⁵.

Huésped	Sustrato	Estequiometría	Sistema cristalino, grupo espacial
nitrosobenceno	ácido cólico	1:1	monoclínico, $P2_1$
o-nitrosotolueno	ácido desoxicólico	2:1	
m-nitrosotolueno			
bencilo	ácido cólico		

La Figura 2.15 muestra el empaquetamiento del cristal ácido cólico:nitrosobenceno, en donde se observa la conformación gauche de la cadena lateral y la interdigitación tipo α .

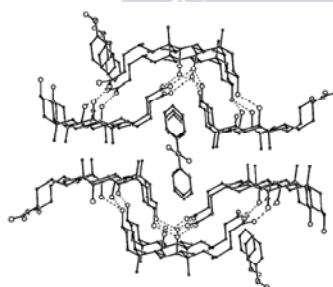


Fig. 2.15 Empaquetamiento del complejo de inclusión ácido cólico:nitrosobenceno.⁸⁶

Estos autores plantean cómo transformar especies ópticamente inactivas en activas sin utilizar reactivos quirales⁸⁵. La quiralidad puede provenir de una torsión molecular en cuyo caso la estabilidad configuracional depende de la barrera energética para la rotación interna. Uno de los primeros ejemplos conocidos de compuestos que

adquieren actividad óptica en estado sólido es el bencilo (PhCOCOPh), que a temperatura ambiente lo hace en cristales de los grupos espaciales trigonales enantiomorfos $P3_121$ y $P3_221$. La configuración absoluta se determina en este trabajo al obtener complejos de inclusión con ácido cólico y ácido desoxicólico y realizar medidas de rayos-X y dicroísmo circular.

En este mismo año M. Miyata *y col.* realizaron un estudio sistemático de las estructuras cristalinas de complejos de inclusión de *ácido cólico y 28 bencenos monosustituídos* como *primer intento para la comprensión del reconocimiento molecular del sustrato*⁸⁷. Encontraron que *todos ellos son monocínicos $P2_1$ con una estructura en bicapas*, con canales monodimensionales en los que se pueden introducir los huéspedes.

Todas las estructuras cristalinas del artículo, con la única excepción del huésped fenilmetanol, contienen la misma red de enlaces de hidrógeno entre moléculas de sustrato (con independencia del huésped) y que responden al esquema de la Figura 2.16 (a). En la Figura 2.16 (b) se muestra que el grupo hidroxilo como con el fenilmetanol se inserta en la red cíclica anterior, mientras que, en la Figura 2.16 (c), es el grupo amino el que forma enlaces de hidrógeno con el sustrato⁵⁸.

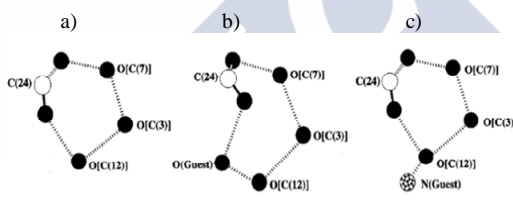


Fig. 2.16 Esquemas de redes de enlaces de hidrógeno para sistemas ácido cólico: bencenos monosustituídos.⁸⁷

Los cristales del ácido cólico estructurados en bicapas pueden clasificarse en cuatro tipos en función de las conformaciones *gauche* o *trans* de la *cadena lateral* del esteroide y los dos tipos de *interdigitation*, α o β , de los *grupos metilo en las capas lipófilas*. Es obvio que las estructuras resultantes, como hemos visto ya en diversas ocasiones, dependen del huésped. Un ejemplo de cada una de ellas se muestra en la Figura 2.17, y corresponden, respectivamente, a los siguientes huéspedes: *benceno (α -gauche)*, *alcohol bencílico (α -trans)*, *fenilacetileno (β -gauche)* y *enol (β -trans)*.

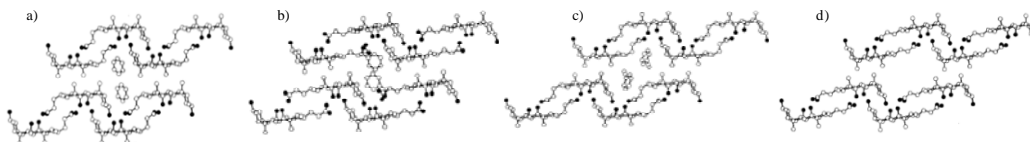


Fig. 2.17. Empaquetamiento de complejos de inclusión ácido cólico y diferentes derivados aromáticos: a) benceno, b) alcohol bencílico, c) fenilacetileno y d) fenol.

También se describen las características de estos cuatro tipos de cristalización, y así se señala que en el α -*gauche* los ángulos diedros C(17)-C(20)-C(22)-C(23) están comprendidos entre 58 y 65° , que en la capa lipófila el metilo 18 se localiza entre los metilos 18 y 19 de la capa opuesta y que los parámetros cristalográficos se mueven en un estrecho intervalo. En el tipo β -*trans*, los ángulos de torsión están comprendidos entre -167 y -180° y ahora es el metilo 19 quien se inserta entre los metilos 18 y 19 de la capa opuesta. Señalan además que, de nuevo, sus parámetros cristalográficos varían en un estrecho margen y que el deslizamiento de unos $4,5 \text{ \AA}$ de una de las capas sobre la otra provoca la transformación $\alpha \rightarrow \beta$. La estructura β -*gauche* se obtuvo para el fenilacetileno con un ángulo de torsión de 70° y la α -*trans* para el alcohol bencílico con un ángulo de torsión de -160° .

También hacen un estudio de tamaño y forma de las cavidades, estableciendo el siguiente orden de sus volúmenes: α -*gauche* < α -*trans* y β -*gauche* < β -*trans*. A través de cortes paralelos al eje de los canales diferencian surcos cuadrados para los de tipo *gauche* y triangulares para los *trans*.

La mayoría de los bencenos monosustituídos cristalizan en los tipos α -*gauche* y β -*trans*, el primero para los huéspedes pequeños y el último para los más grandes. Cuando los volúmenes moleculares del huésped exceden el límite superior del tipo β -*trans* (140 \AA^3) 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). En el artículo, los autores caracterizan al huésped 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 $l < 9,7 \text{ \AA}$ y $th < 4,3 \text{ \AA}$ resulta el tipo α -*gauche*
- si $l > 9,0 \text{ \AA}$ y $th > 4,3 \text{ \AA}$ resulta el β -*trans* (excepto para el huésped 56 del artículo)

Las formas características de las moléculas correspondientes a los huéspedes fenilacetileno y alcohol bencílico explican la aparición de las otras dos formas menos comunes. Así, para el fenilacetileno, $l = 10,0 \text{ \AA}$ es grande como para acomodarse en el tipo α -*gauche* pero su volumen pequeño para hacerlo como β -*trans* y por ello lo hace como β -*gauche*. Para el alcohol bencílico, el valor $th = 5,2 \text{ \AA}$ es superior al requerido para resultar el tipo α -*gauche* y su volumen pequeño para que resulte el β -*gauche*; por ello lo hace como α -*trans*.

Para tratar de comprender los tipos de cristalización resultantes en función de los tamaños de los huéspedes (complementariedad por tamaños) y, por lo tanto, el

reconocimiento molecular del ácido cólico hacia ellos, se utiliza el coeficiente de empaquetamiento de las cavidades del sustrato (PC_{cavity}) como criterio para el ajuste estérico del huésped en la cavidad, definido como:

$$PC_{cavity} (\%) = [(volumen\ molecular) \times (\text{número de huéspedes}) / V_{cavity}] \times 100$$

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 $\pi-\pi$ o los enlaces de hidrógeno expanden el rango anterior. Por otra parte, valores de PC_{cavity} superiores al 70%, al no dar complejos estables, tienden a reducir la relación estequiométrica sustrato:huésped.

Los mismos autores abordan la inclusión y polimerización en cristales polimórficos del ácido cólico con metacrilonitrilo y 2,3-dimetil-1,3-butadieno⁸⁸, realizando comparaciones con otros estudios anteriores con los ácidos desoxicólico⁸⁹⁻⁹⁰, quenodesoxicólico⁹¹⁻⁹² y con el éster colato de metilo⁹³.

Este grupo de investigación realiza también un estudio sobre el reconocimiento molecular de lactonas de tamaño medio (como 3-metilpropiolactona, γ -valerolactona, 4-etilbutirolactona, 2-metilbutirolactona, 3,4-en- γ -valerolactona, 2-metil- γ -valerolactona, y hexirolactona) por inclusión en cristales de ácido cólico⁹⁴, llegando a la conclusión de que el tamaño y la posición de los sustituyentes juega un importante papel y que existe discriminación quiral, que ya habíamos visto con anterioridad⁸⁵. Todos los cristales de los complejos estudiados presentan estequiometría 1:1 y son monoclinicos $P2_1$ con estructuras en bicapas del tipo β -trans. Observan que las lactonas de tamaño más pequeño y las grandes conducen a cristales sin inclusión.

Respecto a los enlaces de hidrógeno, se debe señalar que todos los grupos donantes del sustrato están implicados en la red intramolecular sustrato-sustrato de forma que el huésped no participa y, por lo tanto, su inclusión está gobernada por fuerzas de van der Waals y por las dimensiones estéricas. Tratan de comprender el reconocimiento molecular al analizar 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.

Polonski y col. en ese mismo año resuelven las estructuras cristalinas de complejos de ácido cólico y tres *N*-nitrosaminas con estructura $Ph-N(R)-NO$ ⁹⁵, siendo todos ellos monoclinicos $P2_1$, con estequiometrías 1:1 para la $Ph-N(Me)-NO$ y 2:1 para las otras dos restantes ($R= Ph$ y $PhCH_2$). El primero de los complejos presenta una conformación α -gauche mientras que para el último la conformación es β -trans, lo que se corresponde con un mayor volumen de la cavidad para el huésped más voluminoso y con un cambio

de estequiometría. En todos ellos las moléculas de ácido biliar se disponen en bicapas anfífilas corrugadas estabilizadas por enlaces de hidrógeno, dejando canales para el alojamiento del huésped.

Miyata *y col.* estudiaron la *influencia del tamaño de la cadena lateral* en las características de inclusión de los ácidos cólico, desoxicólico, quenodesoxicólico, litocólico y derivados⁹⁶ mediante el análisis de los cristales sin huésped o con inclusión. El ácido cólico (a^0) y 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^0 y a^- dan estructuras en bicapas con canales flexibles, a^{+2} se presenta en diferentes estructuras cristalinas.

En otro artículo del mismo grupo, se plantea el estudio de la *expansión de las cavidades moleculares mediante un aumento de la longitud de la cadena lateral* del esteroide⁹⁶. Se trabaja así con el derivado del ácido cólico que posee dos grupos metileno adicionales, denominado habitualmente ácido bishomocólico, comprobándose que es capaz de formar complejos de inclusión cristalinos de estequiometría 1:1 con una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo algunos de tamaño grande como el 1-metilnaftaleno y la 1-tetralona, que no son incluidos en los cristales con ácido cólico. Mediante difracción de rayos X se ponen de manifiesto dos tipos de estructuras, en *bicapas y cruzadas*, isoestructurales con las propias del ácido cólico y esquematizadas en la Figura 2.18. Ambas poseen en común la secuencia de enlaces de hidrógeno, pero la orientación del grupo carboxílico que participa en la secuencia determina una u otra estructura. (I se corresponde con una disposición α -gauche mientras que II que se corresponde con una disposición *trans* sin interdigitación).

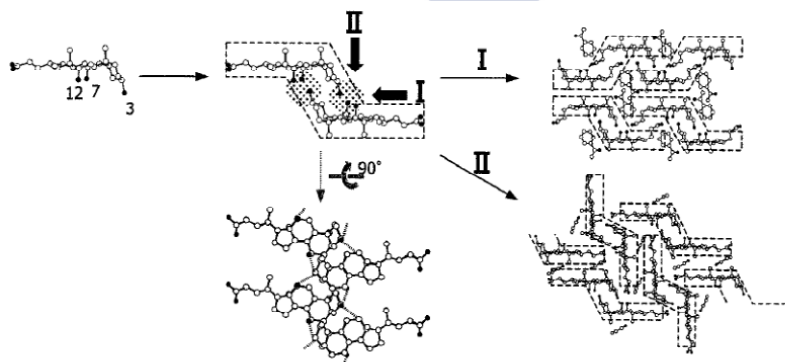


Fig. 2.18. Empaquetamiento típico del ácido cólico, (I) estructura típica en bicapas, (II) estructura típica cruzada.⁹⁶

En las *estructuras* conocidas como *bicapas*, éstas se organizan de acuerdo con la interdigitación de los grupos metilo y originan canales moleculares con espacios vacíos monodimensionales donde se incluyen variedad de huéspedes.

En las *estructuras cruzadas* se produce un *ordenamiento tipo espiga* que origina cavidades tipo caja donde se alojan compuestos como alcoholes y nitrilos de pequeño tamaño. Con el aumento o acortamiento en un único grupo metileno, se cambia la orientación del grupo carboxílico y se deforman los enlaces de hidrógeno. Hay que notar que el diseño de esta modificación está basado en la intención de mantener los enlaces de hidrógeno cíclicos.

Ejemplos de bicapas y estructuras cruzadas se muestran en las Figuras 2.19 y 2.20.

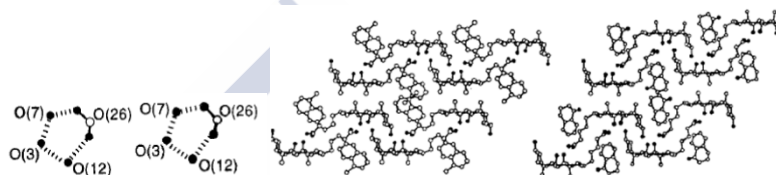


Fig. 2.19 Ejemplos de empaquetamientos en bicapas para ácido cólico y redes de enlaces de hidrógeno correspondientes.

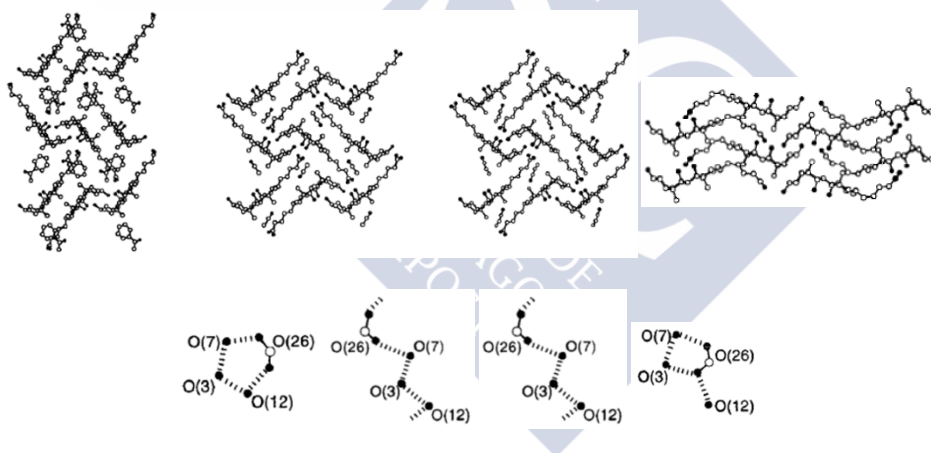


Fig. 2.20 Ejemplos de empaquetamientos cruzados para ácido cólico y redes de enlaces de hidrógeno correspondientes.

Las *estructuras* en *bicapas* son más idóneas con huéspedes grandes como el 1-metilnaftaleno y la 1-tetralona, pudiendo diferir en la conformación de la cadena lateral (*trans* o *gauche*), deformando las cavidades y modificando la orientación del huésped aromático en su interior.

Las *estructuras cruzadas* son más comunes con los huéspedes pequeños, diferenciándose los tipos CI y CII según que los enlaces de hidrógeno sean helicoidales o cíclicos (en este caso, los mismos que en las bicapas) y los tamaños de las cavidades resultantes. Los primeros son adecuados para nitrilos y los segundos para compuestos aromáticos (ambos mucho menores que las formadas por las bicapas). Por otra parte, el ácido cólico

forma la estructura CI con diferentes huéspedes ya vistos^{45,51,59,69,73}. Se pone de manifiesto que *el aumento de la cadena lateral no es eficaz para las expansiones de las cavidades en este tipo de estructuras cruzadas*. El ácido cólico forma complejos de inclusión con alcoholes de cadena corta^{45,51} y los derivados fluorados estudiados⁵⁹, todos ellos con una estructura de tipo cruzado.

En el año 2002 Miyata *y col.* estudiaron los complejos de inclusión del ácido cólico con el *1-pentanol* y *1-hexanol*⁹⁷, obteniendo cristales monoclinicos P2₁ de estequiometría 1:1, siendo ahora las estructuras en bicapas α -*trans* y α -*gauche* respectivamente, como las obtenidas para diferentes alcoholes aromáticos^{65,87}. *Las bicapas se ven estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre las caras hidrófilas y fuerzas de van der Waals entre las lipófilas*.

En ambos casos los enlaces de hidrógeno siguen una *red cíclica* en la que participan los alcoholes y es similar a la encontrada para la anilina y derivados⁶⁶:



En el mismo año, Yamamoto *y col.*⁹⁸, estudiaron los complejos de inclusión en estado sólido del ácido cólico con *p-hidroxibenzoato de metilo* e *ibuprofeno*. Las estequiometrías resultantes fueron 1:1 y 2:1, respectivamente.

Un año más tarde, Nakano *y col.*⁹⁹ estudiaron la formación de *clatratos de ácido cólico y benceno monosustituídos*[#] (como huéspedes) desde el punto de vista de la selectividad en la recristalización de todas las mezclas posibles de pares de esos huéspedes y *1-butanol* (que no se incorpora al complejo).

Todos los compuestos de inclusión poseen estructuras en bicapas, incorporándose los huéspedes en la cavidad monodimensional de la capa lipófila. Clasifican estas estructuras en tres tipos, α -G, α -T y β -T, según el comportamiento de *interdigitation* de los grupos metilo en las caras lipófilas y la conformación *gauche* (G) o *trans* (T) de la cadena lateral del esteroide (Tabla 2.13).

Tabla 2.13. Resumen de datos para complejos de ácido cólico con bencenos monosustituídos.⁹⁹

Huésped	Benceno, Tolueno	Etilbenceno, Propilbenceno	Butilbenceno	Pentilbenceno, Hexilbenceno
Estequiometría	1:1		2:1	
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁			
tipo	α -G	β -T	α -T	α -G

[#] los huéspedes estudiados por los autores fueron los siguientes: *benceno, tolueno, etilbenceno, propilbenceno, butilbenceno, pentilbenceno* y *hexilbenceno*, los cuatro primeros complejos ya habían sido publicados previamente por los mismos autores. (Nakano, K. et al.; *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 209)

La eficiencia del empaquetamiento de los huéspedes en las cavidades, es decir, la complementariedad del tamaño no es un parámetro adecuado para medir la selectividad. En cambio, sí lo es la complementariedad de la forma, al menos para huéspedes con anillos fenilo.

El mismo grupo de investigación planteó continuar el estudio del artículo anterior, ahora referido a la selectividad con el ácido cólico con *o*-, *m*- y *p*-xileno¹⁰⁰. Describen las enclatraciones⁴ *selectiva* y *no selectiva* en sistemas con diferentes huéspedes, obteniendo diferentes comportamientos:

- a) Un huésped se incluye de manera selectiva y el otro actúa sólo como disolvente.
- b) Los dos se incluyen, y los cristales son mezclas de cristales de inclusión individuales.
- c) Los dos se incluyen sin selectividad, resultando de forma estadísticamente desordenado en las cavidades de inclusión.
- d) Ambos huéspedes se incluyen, pero se modifica la estructura del sustrato con respecto a la de los cristales puros.

Sin considerar los compuestos con un sólo huésped vemos que poseen estequiometrías 1:1 (*m*- y *p*- xileno) y 2:1 (en dos cristales polimórficos según la temperatura con *o*-xileno), todos ellos formando bicapas (Tabla 2.14).

Tabla 2.14. Resumen de datos de estructuras cristalinas de complejos de ácido cólico con *o*-, *m*- y *p*-xileno.¹⁰⁰

Huésped	<i>o</i> -xileno (I)	<i>o</i> -xileno (II)	<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno
Estequiometría	2:1		1:1	
Sistema cristalino, grupo cristalino	Monoclínico, P2 ₁			
tipo	β -G	α -T	β -T	α -G

La forma I del *o*-xileno se diferencia de todas las demás en el sentido de que posee un empaquetamiento antiparalelo en la capa lipófila y paralelo en la hidrófila.

Todas ellas, incluyen la forma I del *o*-xileno, poseen diferentes esquemas de enlaces de hidrógeno (Figura 2.21).

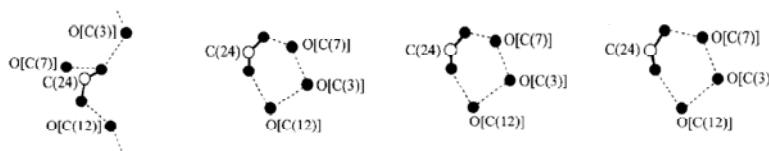


Fig. 2.21 Red de enlaces de hidrógeno para los complejos de inclusión del ácido cólico con: *o*-xileno(I), *o*-xileno(II), *m*-xileno y *p*-xileno, respectivamente.¹⁰⁰

⁴ Clatrato: red de un determinado tipo de molécula, que atrapa y retiene a un segundo tipo de molécula.

Los autores realizaron también experimentos de recristalización selectiva por combinación de parejas de huéspedes, encontrando casos que se oponen a los vistos en la recristalización competitiva de bencenos sustituidos⁹⁹, en los que predominaba el factor de forma del huésped.

Simultáneamente, Osada *y col.*¹⁰¹ publicaron un artículo en el que se resolvía la estructura cristalina, aunque se indica que no corresponde a un único cristal, de un complejo entre el ácido cólico y el policatión 3,3-ioneno. El patrón de difracción obtenido sugiere la formación de una estructura laminar con un espesor de 1.33 nm, haciendo una estimación ortorrómbica del ordenamiento de la molécula en la celda unidad.

En el año 2004, Polonski *y col.*¹⁰² estudian los complejos de ácido cólico y benzofenona y tiobenzofenona a 100 K. Los cristales resultaron ser monoclinicos P2₁, con la misma estequiometría 2:1. Las estructuras del primer complejo se ven estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre moléculas del ácido biliar que forman bicapas anfífilas corrugadas. En uno de los dos tipos de canales se alojan moléculas de huésped con diferente helicidad. El segundo complejo sólo contiene un tipo de huésped en conformación P, (Figura 2.22).

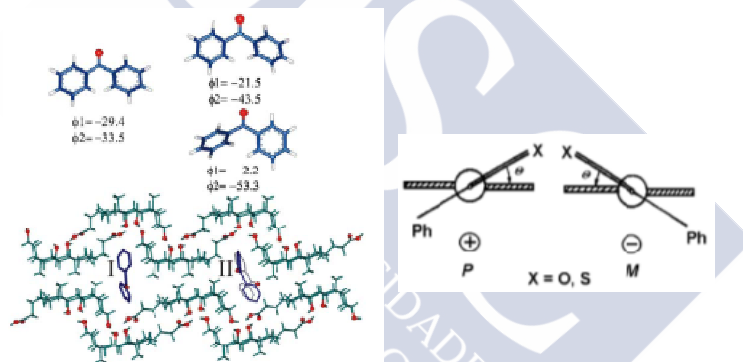


Fig. 2.22 Empaquetamiento del complejo ácido cólico:benzofenona con canales tipo I y II y definición para la conformación de la benzofenona y tiobenzofenona.¹⁰²

En ese mismo año Miyata *y col.* estudiaron el complejo cristalino mixto ácido cólico:benceno+etilbenceno¹⁰³. La estequiometría (8:2) es independiente de la relación huésped:sustrato utilizada en el proceso de cristalización. Las estructuras de los cristales ácido cólico:benceno y ácido cólico:etilbenceno son, respectivamente, α -gauche y β -trans, y la mezcla de los dos huéspedes se incorpora al cristal manteniendo la primera de las estructuras.

En otro artículo, el mismo grupo discute los ensamblajes helicoidales de cristales de inclusión con ácidos biliares y derivados como moléculas sustrato¹⁰⁴. Tras analizar del orden de 300 estructuras cristalinas, los autores indican que poseen la estructura jerárquica que se indica en la Figura 2.23:

- 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.
- d) Llenado de los espacios quirales incluyendo huéspedes entre las láminas.

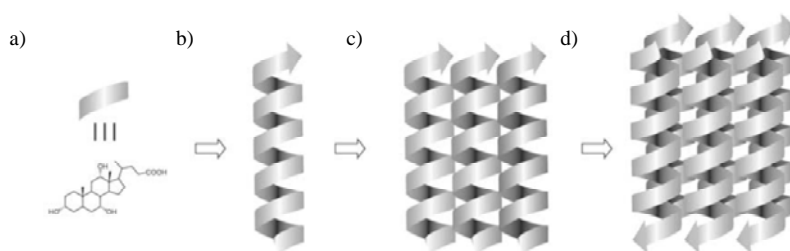


Fig. 2.23. Ordenamiento helicoidal de las moléculas de ácido cólico en función de sus asociaciones moleculares tipo (a), (b), (c) y (d) definidas en el texto.¹⁰⁴

Si se comparan los ácidos desoxicólico, cólico, quenodesoxicólico y litocólico (a-d en la Figura 2.24) se observan diferentes maneras de ordenación de los esteroides para generar las hélices, resultando todas a derechas excepto la del ácido quenodesoxicólico que es a izquierdas.

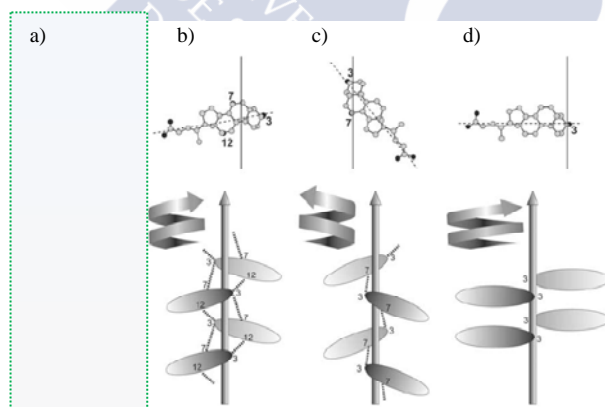


Fig. 2.24. Ordenamiento helicoidal de las moléculas de los ácidos desoxicólico (a), cólico (b), quenodesoxicólico (c) y litocólico (d).

En el caso del ácido cólico el grupo carboxílico se ajusta dentro de los enlaces de hidrógeno incompletos OH7-OH3-OH12 de la hélice vecina dando lugar a una red cíclica de enlaces de hidrógeno. La transformación de la función carboxílica del ácido cólico en un enlace amida, éster o alcohol (Figura 2.25), implican la modificación de la secuencia cíclica de enlaces de hidrógeno. Sólo en el caso de la amida^{26,33} se conserva

esta secuencia cíclica, mientras que se rompe en el caso de la formación de ésteres o alcoholes²⁷.

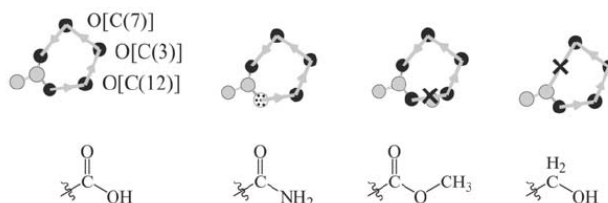


Fig. 2.25. Esquema de redes de enlaces de hidrógeno en función de la modificación realizada sobre el grupo carboxílico del ácido cólico.

Finalmente, como muestra la Figura 2.26, entre las hélices pueden quedar canales potencialmente disponibles para una inclusión de huéspedes lo que dependerá de las características de estos y del alineamiento de las moléculas que componen el sustrato.

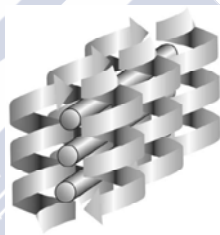


Fig. 2.26. Esquema de los canales para la inclusión esquematizados mediante los cilindros intercalados entre las redes helicoidales del sustrato.

En otro artículo del mismo grupo de investigación se realizó un estudio estructural del ensamblaje supramolecular de ácidos biliares con diferentes longitudes en sus cadenas laterales¹¹. Los compuestos utilizados son los ácidos bisnorcólico, norcólico, cólico, homocólico y bishomocólico. Basándose en consideraciones geométricas (rotaciones y desplazamientos) diseñan 10 maneras en la que se pueden agregar las moléculas de esteroides para generar estructuras en bicapas (Figura 2.27).

El artículo se centra en las bicapas, que pueden clasificarse en bicapas propiamente dichas (con siete subtipos, de B_a a B_g) y en *layerlike* o *falsas capas* (con dos subtipos, T y W). Los empaquetamientos moleculares correspondientes a ellas se muestran en la Figura 2.28.

El ácido cólico posee como estructuras dominantes las B_b-B_g. Las diferentes estructuras en bicapas B_e, B_f y B_g dependen del huésped y sus secuencias de enlaces de hidrógeno se muestran en la Figura 2.29. Destaca que las redes resultantes son cíclicas para B_e, cíclica y lineal para B_f y ramificada para B_g.

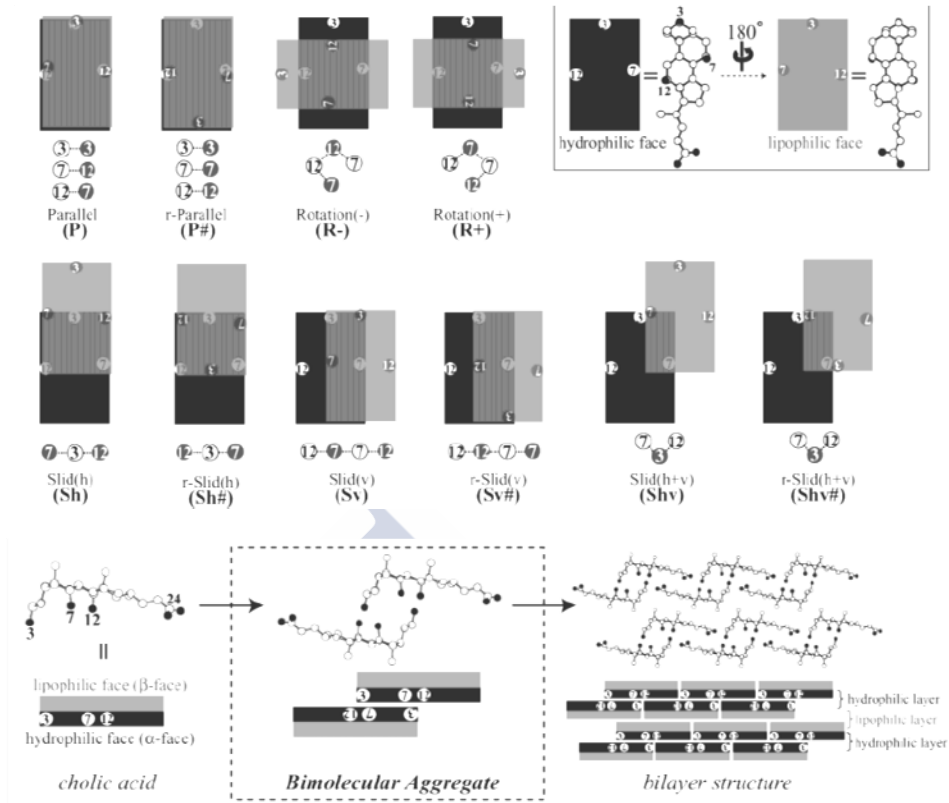


Fig. 2.27 Modos de agregación del ácido cólico para la generación de bicapas.¹¹

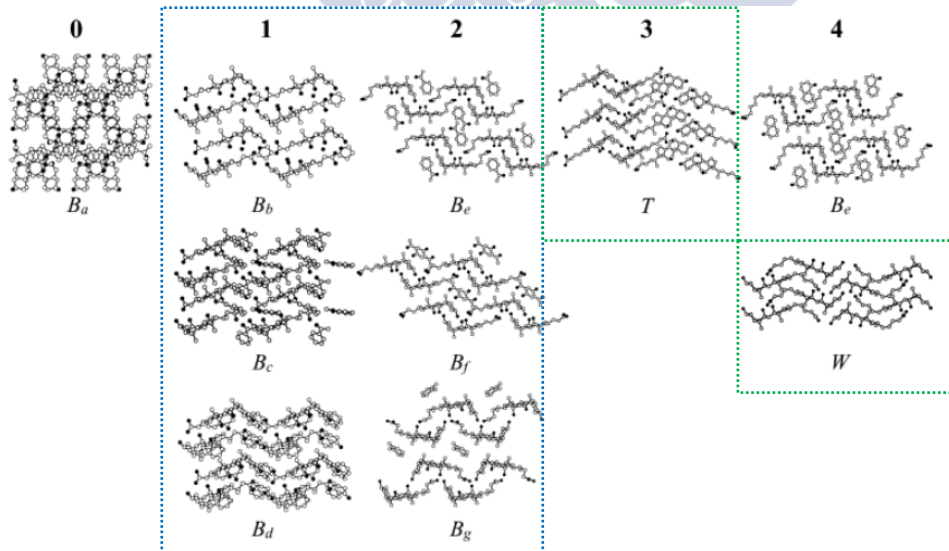


Fig. 2.28 Esquemas de empaquetamientos moleculares en bicapas (cuadro punteado azul) y falsas capas (cuadros punteados verdes) para el ácido cólico.

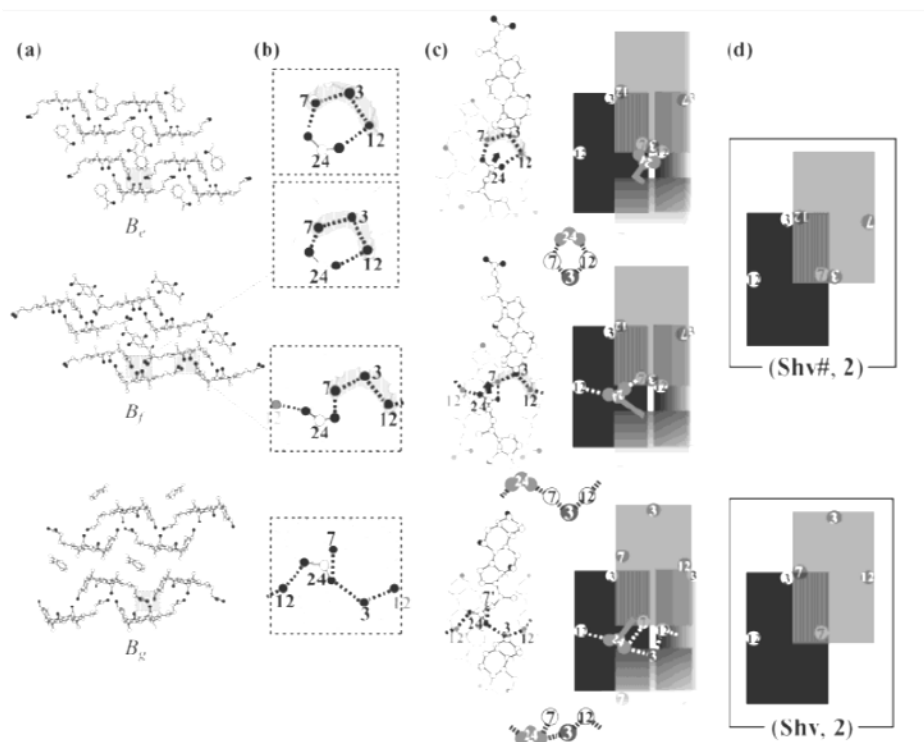


Fig. 2.29 Esquemas de redes de enlaces de hidrógeno y empaquetamientos moleculares en bicapas para las estructuras dominantes presentadas en el ácido cólico, B_c , B_f y B_g .

Polonski *y col.* publicaron¹⁰⁵ las estructuras de los complejos de ácido cólico y ácido desoxicólico con *anti*-azobenceno. Expresamente se indica que estos sustratos no incluyen al compuesto *sin*-. El primero de los compuestos de inclusión posee estequiometría 1:2 y es monoclinico $P2_1$, mostrando un desorden en el huésped similar al del complejo con bencilo⁸⁵. El empaquetamiento que se muestra a continuación, se observa que las moléculas de sustrato se auto-ensamblan en bicapas, unidas mediante enlaces de hidrógeno y los canales que quedan entre las bicapas se llenan con el huésped organizado en columnas infinitas a lo largo del eje *a*. Las moléculas de ácido cólico se disponen en una conformación α -G ya descrita en varias ocasiones.

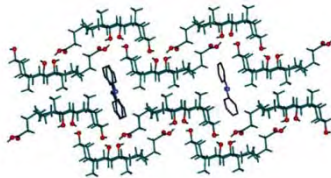


Fig. 2.30 Empaquetamiento del complejo de inclusión para ácido cólico:anti-azobenceno.¹⁰⁵

En 2005 M. Miyata *y col.* publicaron un estudio sobre los cambios que por calentamiento sufren cristales de ácido cólico con diferentes huéspedes¹⁰⁶. Tras analizar las bicapas y observar la variación de la distancia entre capas en función del huésped,

plantearon la investigación de los cambios reversibles en dichas distancias por la inserción o eliminación de los siguientes huéspedes: *o*-toluidina, *m*-fluoroanilina, *o*-clorotolueno, *o*-bromotolueno e indeno. Todos ellos presentan estequiometrías 1:2 y poseen estructuras con bicapas en donde los huéspedes se encuentran alojados en los canales bidimensionales que quedan entre las capas lipófilas (Figura 2.31).

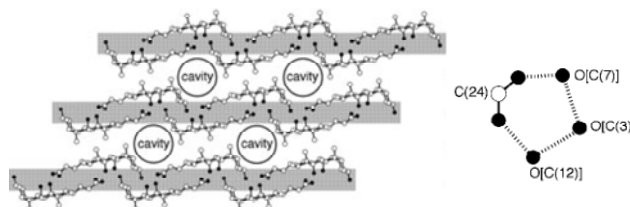


Fig. 2.31 Esquema de capas lipofílicas, hidrófilas, cavidad para alojar los huéspedes y esquema de enlaces de hidrógeno.¹⁰⁶

En la parte hidrófila se genera una secuencia cíclica de enlaces de hidrógeno común para muchos sistemas con el ácido cólico. Los huéspedes con grupos amino (*o*-toluidina y *m*-fluoroanilina) interaccionan débilmente con esta red de enlaces de hidrógeno actuando de puente entre las secuencias cíclicas, de forma similar a como lo hacía la anilina⁵⁸ (Figura 2.32).

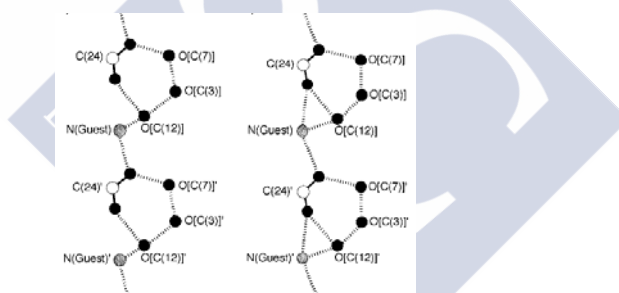


Fig. 2.32 Esquema de la red de enlaces de hidrógeno entre el ácido cólico con *o*-toluidina y *m*-fluoroanilina respectivamente.¹⁰⁶

Mediante termogravimetría se comprobó que todos los cristales liberan el huésped a una temperatura próxima a 130°C, pero muestran dos picos endotérmicos por debajo de este punto, asociados a cambios estructurales provocados por la aparición de cristales intermedios con comportamientos de difracción de rayos X diferentes de los correspondientes a los complejos iniciales que son tipo *sándwich*. Los autores estudiaron también el proceso inverso, es decir, la inserción de los huéspedes entre las bicapas de moléculas sustrato, poniendo en evidencia la reversibilidad del proceso, hecho que califican como raro para huéspedes orgánicos.

En otra publicación del mismo grupo¹⁰⁷ se ofrecieron los resultados de un estudio de colamida y ácido cólico con 58 alcoholes como huéspedes (56 nuevos respecto a otros

trabajos publicados). La mayoría de los formados con la colamida son del tipo bicapas, pero sólo dos poseen este tipo de estructura con el ácido cólico, lo que muestra la importancia de los grupos funcionales del sustrato en la formación de enlaces de hidrógeno a pesar de poseer ambos prácticamente la misma forma y tamaño.

Los cristales poseen estequiometrías 1:2, 1:1 ó 2:1, dependiente del número de átomos de carbono del huésped, y las estructuras encontradas se distribuyen en bicapas, una nueva forma que no había sido descrita para estos sistemas que es la distribución en espiga y cruzadas (Figura 2.33 y Tabla 2.15), siendo las dos últimas estructuras novedosas.

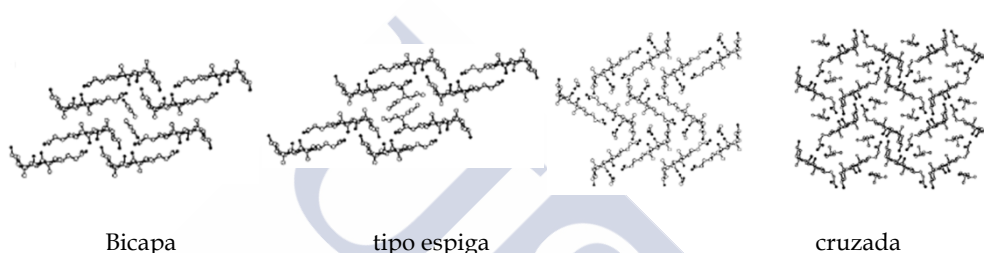


Fig. 2.33. Estructuras encontradas para complejos de inclusión entre ácido cólico y diferentes alcoholes alifáticos.¹⁰⁷

Tabla 2.15. Cantidad de alcoholes alifáticos encontrados para cada estructura en función de la longitud de la cadena alifática.¹⁰⁷

Estequiometría	Número de carbonos de las moléculas huésped										
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Total
Bicapa (1:2)		1									1
Bicapa (1:1)			2	6	11	13	8	4			44
Bicapa (2:1)						1	2	2	2	2	9
Espiga (1:2)	1										1
Espiga (1:1)				2							2
Cruzada (1:1)							1				1

Las estructuras en bicapas aparecen con los subtipos α -trans, α -gauche, β -trans y β -gauche.

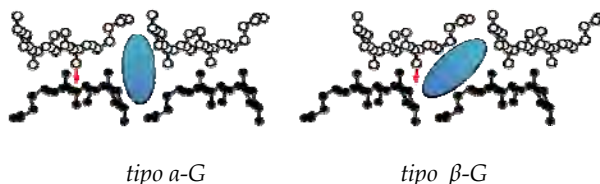


Fig. 2.34. Cavidad generada en función del tipo de interdigitación para configuración gauche de la cadena lateral.

Como se observa en la figura anterior, las disposiciones con interdigitación tipo β dejan una cavidad elíptica inclinada (más que en las tipo α) siendo de mayor tamaño cuando la cadena lateral se presenta en conformación *trans*. En las partes hidrófilas, las moléculas de sustrato se encuentran unidas por medio de enlaces de hidrógeno que forman redes cíclicas (Figura 2.35) estando los ciclos adyacentes unidos a través de uno de los huéspedes alcohólicos excepto en el caso del $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHOH}$.

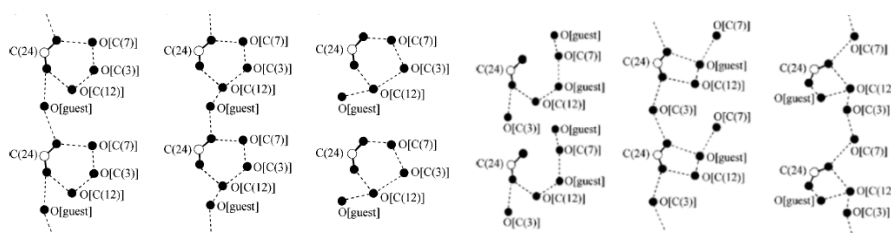


Fig. 2.35. Esquemas para redes de enlaces de hidrógeno en diferentes complejos ácido cólico:alcoholes alifáticos.¹⁰⁷

El isomerismo encontrado es debido en primer lugar a los tamaños de los huéspedes y las cavidades. Los huéspedes con volúmenes entre 55,6 y 161,5 Å³ se incluyen en estructuras en bicapas, pero como el $(\text{CH}_3)(\text{COCH}_3)\text{CHOH}$, $((\text{CH}_3)_2\text{CH})_2\text{CHOH}$ y el 1,4-butanodiol (con volúmenes de 100-143 Å³) lo hacen en estructuras diferentes, se concluye que dicho aspecto no es el único determinante y que también deben de influir la forma del huésped y los enlaces de hidrógeno. Por otra parte, dentro de la estructura en bicapas, la isomerización en los 4 subtipos se entiende y explica en términos del tamaño del huésped. La isomerización estructural provocada por el aumento del volumen del huésped queda en la forma: α -*trans* (1:1), α -*gauche* (1:1), β -*trans* (1:1), α -*trans* (2:1), α -*gauche* (2:1) y β -*trans* (2:1). Por otra parte, se estudia el coeficiente de empaquetamiento $\text{PC}_{\text{cavity}}$ que se correlaciona con el volumen del huésped concluyéndose que la isomerización α -*trans* a α -*gauche* es atribuible a la forma y no al tamaño. Asimismo, la transformación de α -*gauche* a β -*trans* está dominada por el tamaño, y la formación selectiva de estos dos tipos de conformaciones con alcoholes medios se interpreta en función del ajuste de su forma a la cavidad.

Al comparar las estructuras cristalinas del ácido cólico y de la colamida que forman cristales monoclinicos P2_1 con isomerismos α -*trans*, α -*gauche* y β -*trans*, se deduce que ambos sustratos exhiben un comportamiento similar de la isomerización basada en tamaño y forma del huésped. A pesar de la similitud la inclusión de alcoholes alifáticos es diferente. La recristalización de ácido cólico en más de 50 alcoholes sólo produce 8 cristales de inclusión, de los cuales 2 (1-pentanol y 1-hexanol) lo hacen en una estructura en bicapas y otros 5 en estructura cruzada^{45,51,59}. La estructura en bicapas con 1-pentanol y 1-hexanol dan diferentes isómeros con el ácido cólico y la colamida: α -*trans* (ácido cólico) y α -*gauche* (colamida), y α -*gauche* (ácido cólico) y β -*gauche* (colamida) respectivamente. Estas diferencias pueden atribuirse a la formación de redes de enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales. En la colamida se da una unión con el huésped entre las redes

cíclicas adyacentes del sustrato, situación que no sucede cuando el grupo amida se sustituye por el grupo carboxílico.

Miyata *y col.*¹⁰⁸ trataron de establecer una predicción jerárquica de estructuras cristalinas con más de 30 tipos de ordenaciones del ácido cólico que se conocen^{87,100}. Destacaron la importancia de la asimetría del esqueleto ya que indican que las moléculas sin elementos de simetría tienen tendencia a formar organizaciones en hélices 2_1 y asumen estas conclusiones para el ácido cólico. Por otro lado, destacan la importancia del empaquetamiento cara hidrófila-cara hidrófila que es el más adecuado para el establecimiento de enlaces de hidrógeno por parte de los grupos hidroxilo, y así las moléculas del ácido biliar se alinean con la dirección cabeza-cola vertical al eje 2_1 (Figura 2.36). Los huéspedes se intercalan entre las láminas construyéndose los diferentes ordenamientos estructurales discutidos previamente¹⁰⁴ y basados en diferentes interacciones: enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo, enlaces de hidrógeno del grupo carboxílico e interacciones de van der Waals.

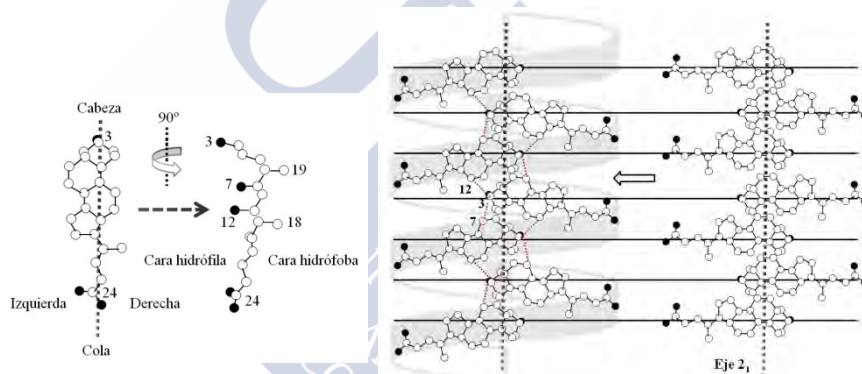


Fig. 2.36. Esquema de la molécula de ácido cólico y orientación adoptada por las moléculas individuales para la generación de la hélice mediante enlaces de hidrógeno.¹⁰⁸

En 2006, Preto *y col.*¹⁰⁹ publicaron las estructuras cristalinas (monoclínicas $P2_1$) de complejos de estequiometría 1:1 formados por el ácido cólico con carbonatos cíclicos monosustituídos con grupos *R* metilo y etilo. Sus empaquetamientos son isoestructurales y muy similares a los de otros complejos^{48,65,82,99-100}, con bicapas anfifílicas en las que las capas se encuentran unidas por enlaces de hidrógeno entre las caras α (cara hidrófila) e interacciones de van der Waals entre las β (cara hidrófoba). Los huéspedes quedan alojados en su interior debido a fuerzas de van der Waals y su complementariedad estérica dentro de los canales quirales en las capas lipófilas. Por otra parte, en ambos complejos las cadenas laterales están completamente extendidas (disposición trans) presentando interdigitación tipo α .

Poco más tarde, Wicher *y Gdaniec*¹¹⁰ publicaron la estructura cristalina del complejo de inclusión entre el ácido cólico y la quinoxalina, resultando tener una estequiometría 2:1 y pertenecer al sistema monoclínico $P2_1$. La ordenación estructural

es en bicapas antiparalelas corrugadas en donde la disposición de las moléculas se puede clasificar como α -*trans*. Cuatro moléculas de sustrato generan una secuencia cíclica de enlaces de hidrógeno que ensambla las moléculas en una estructura polimérica bidimensional definiendo con ello la bicapa. Las moléculas de huésped se encuentran alojadas en los canales lipófilos generados entre bicapas vecinas siendo la interacción de van der Waals la dominante entre el sustrato y el huésped. Existen tres tipos de canales diferenciados, dos de ellos relacionados mediante operaciones de translación a lo largo del eje *b* y un tercero en donde se muestra la superposición de los otros dos canales y su relación con estos a lo largo de un eje helicoidal (Figura 2.37).

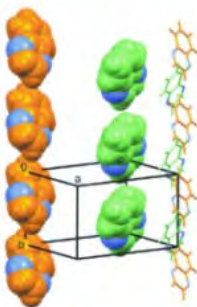


Fig. 2.37. Orientación de las moléculas de quinoxalina en el seno de la red cristalina.¹¹⁰

En cuanto a los *derivados del ácido cólico* debemos de comentar, en primer lugar, los trabajos que hacen referencia al éster metílico. El primero de ellos data de 1965 cuando Norton y Haner¹ publicaron los primeros resultados cristalográficos conocidos para el cristal del *colato de metilo:etanol* con estequiometría 1:1 y perteneciente al sistema monoclinico C2 y que ya habíamos comentado al principio de la introducción.

En 1987 se hizo referencia al cristal del complejo 1:1 *colato de metilo:metanol*²⁰. La estequiometría fue deducida por análisis termogravimétrico y confirmada mediante RMN. El cristal pertenece al sistema monoclinico C2 y el empaquetamiento pone de manifiesto una estructura en bicapas como las vistas hasta el momento, estando atrapado el huésped en la región hidrófila por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos OH de la posición 12.

Ya en 1991, Miyata *y col.* extienden el estudio al huésped *2-propanol*²¹. El cristal también pertenece al sistema monoclinico C2 y su estequiometría es 1:1, siendo por lo tanto isomorfo con el de metanol ya citado. 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. La localización de los alcoholes en los dos cristales analizados en el artículo es prácticamente idéntica, *y se encuentran ligados al éster biliar por medio de enlaces de hidrógeno, aunque no se encuentran en canales*. Las moléculas de éster aparecen *en capas antiparalelas a lo largo del eje cristalográfico c*, disposición similar a

la de cristales de inclusión del ácido cólico⁴⁸. Finalmente, los enlaces de hidrógeno que se ponen de manifiesto son los siguientes: O3-Hⁱ...O12-Hⁱⁱ...O(alcohol)-Hⁱⁱⁱ...O7-H^{iv}...O3^v

Cuatro años más tarde, Scott publicó las estructuras de los cristales del *éster metílico sin huésped y con acetonitrilo*, junto al ácido cólico con este mismo huésped²² (Tabla 2.16).

Tabla 2.16. Datos cristalográficos para sistemas ácido cólico acetonitrilo, colato de metilo sin huésped y con acetonitrilo.²²

sustrato	ácido cólico	colato de metilo	colato de metilo
huésped	acetonitrilo	acetonitrilo	s.h.
estequiometría	1:1		-
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁		Ortorrómico, 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁

En los diagramas de empaquetamiento de *los primeros se forman bicapas unidas por enlaces de hidrógeno entre los esteroides, donde no quedan canales y el acetonitrilo se mantiene en cavidades que quedan entre las bicapas*

En 1996 Miyata y col.²⁵ publicaron tres tipos de compuestos de inclusión de la *colamida con S-butan-2-ol, R-butan-2-ol y una mezcla racémica de butan-2-ol*. Todas las estructuras son isomorfas monoclinicas P2₁, con el mismo ordenamiento en capas para los tres casos, proporcionando espacios en los canales para las moléculas de huésped. *En la mezcla racémica se observa que la inclusión del enantiómero S es más favorable*. Por otro lado la red de enlaces de hidrógeno es común a los tres compuestos: O3-H...O12-H...O=C-N-H...O7-H...O3 y N-H...O(alcohol)-H...O12.

En 1997, Byrn y col.¹¹¹ publicaron la estructura cristalina de la *colamida dihidratada*, perteneciente al sistema monoclinico, P2₁. El complejo está dispuesto en bicapas sin intedigitación en los canales hidrófobos y la cadena lateral en disposición *gauche*. Presenta una red helicoidal de enlaces de hidrógeno y las moléculas de agua participan como puentes entre moléculas vecinas en la secuencia de enlaces de hidrógeno, existiendo también interacciones entre los grupos hidroxilos O7-H y O3-H con moléculas vecinas mediante el átomo de nitrógeno de la amida.

Tras esta revisión bibliográfica, como resumen podemos decir que de los algo más de 100 cristales diferentes de ácido cólico a los que nos hemos referido sólo uno de ellos es hexagonal^{4,65} y, como en el caso del ácido desoxicólico, posee agua como huésped. Aproximadamente un 7% son triclinicos y un 11% ortorrómicos, los restantes son monoclinicos, por lo que es claramente mayoritario para este esteroide.

También debemos mencionar que se han analizado diferentes parámetros y características de las redes cristalinas, que trataremos de aplicar y analizar para los cristales obtenidos en el presente trabajo de investigación. Algunos de los parámetros a

analizar serán la configuración de la cadena lateral, la formación de bicapas, el estudio de inclusión o no de huéspedes en la estructura cristalina, el índice de empaquetamiento de las cavidades y su posibilidad para alojar huéspedes, así como otras características vistas en los artículos publicados por los diferentes grupos de investigación hasta el momento.



2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 AdCH₂CA

Síntesis del compuesto: [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(adamantano-2-acetil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico (AdCH₂CA).

Se ha sintetizado el compuesto AdCH₂CA, cuya fórmula estructural se recoge en la Figura 2.38 fue sintetizado, según se describe en la sección experimental, apéndice A de síntesis, mediante la reacción de adición-eliminación entre el cloruro del ácido adamantano-1-acético y el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico.

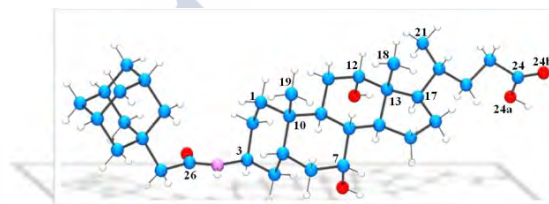


Fig. 2.38 Esquema y numeración para la molécula de AdCH₂CA.

Mediante la técnica de Difracción de Rayos X se han obtenido diferentes cristales en forma de prisma incoloros. Los datos fueron recogidos en un difractorómetro Bruker X8 KappaAPEXII. El resumen de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 2.17.

Para comenzar el estudio de los complejos de inclusión realizados, y siguiendo algunos de los procedimientos vistos en la revisión bibliográfica, analizaremos la conformación del anillo *D* del núcleo esteroideo, en términos del ángulo máximo de torsión, φ_m , y el ángulo de fase de pseudorotación, Δ^{46} .[#] Se puede observar en la Tabla 2.18 que los valores obtenidos para los cristales no presentan diferencias significativas, predominando la conformación en *media silla distorsionada*. Esta conformación es habitual en cristales de ácido desoxicólico (DCA) con diferentes huéspedes¹¹²⁻¹¹⁴ y del ácido quenodesoxicólico entre otros⁵. La conformación intermedia entre *media silla* y *sobre* fue encontrada para el complejo con 2-butanol y en la bibliografía podemos ver que es común para los complejos de inclusión del ácido cólico (CA) con diferentes alcoholes^{45,51} así como del DCA con *o*-xileno^{64,115}, ácido salicílico¹¹⁵ o también para el ácido ursodesoxicólico con algunos alcoholes entre otros.^{45,51}

[#] En la introducción se encuentra una explicación más exhaustiva de estos términos.

Tabla 2.17. Datos cristalográficos para los complejos de AdCH₂CA en acetona/agua, dmsó, 2-propanol, 2-butanol, 2-pentanol, 3-metil-butanol y acetofenona.

Disolvente	Acetona/Agua	DMSO	Acetofenona
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · C ₃ H ₆ O·H ₂ O	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · C ₂ H ₆ OS·H ₂ O	2C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · C ₈ H ₈ O·H ₂ O
Estequiometría	1:1(acetona) 1(agua)	1:1(dmsó) 1(agua)	1:1(acetofenona) 1(agua)
Fórmula en peso	659.92	679.78	1323.83
Temperatura (K)	100 (2)	110 (2)	100 (2)
Longitud de onda (Å)	0.7107	0.7107	0.7107
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	9.2519(2)	9.270(3)	8.2039(6)
b (Å)	17.5830(4)	17.538(6)	18.7635(11)
c (Å)	22.3231(6)	22.381(8)	24.6144(16)
α (°)	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.207	4, 1.241	5, 1.16
Coefficiente de Absorción μ (mm ⁻¹)	0.081	0.138	0.08
F(000)	1448	1488	1448
Tamaño cristal (mm ³)	0.23×0.22×0.19	0.31×0.23×0.2	0.65×0.14×0.11
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	2.31-31.34	2.15-26.25	2.8-26.2
Intervalos de los índices	-14≤h≤14 0≤k≤27 0≤l≤34	-11≤h≤11 0≤k≤21 0≤l≤28	-9≤h≤9 0≤k≤22 0≤l≤29
Datos/restricciones/parámetros	13889/0/453	7523/0/454	3915/3/446
mejor ajuste en F ²	1.006	1.026	1.047
índices R finales [I>2σ(I)]	R1=0.0484 wR2=0.1049	R1=0.0508 wR2=0.1128	R1=0.0378 wR2=0.0919
Índices R (todos los datos)	R1=0.0682 wR2=0.1121	R1=0.0863 wR2=0.1335	R1=0.0447 wR2=0.092
Diferencia de densidad máxima y mínima (Å ⁻³)	0.417 y -0.209	0.349 y -0.402	0.18 y -0.19

Disolvente	2-Propanol	2-Butanol	2-Pentanol	3-Metil-Butanol
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · 2H ₂ O	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · C ₄ H ₁₀ O·H ₂ O	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · 2H ₂ O	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅ · C ₅ H ₁₁ O
Estequiometría	1:2(agua)	1:1(2-butanol) 1(agua)	1:2(agua)	1:1(3-Metil-Butanol)
Fórmula en peso	619.86	675.96	619.86	670.96
Temperatura (K)	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)
Longitud de onda (Å)	0.7107	0.7107	0.7107	0.7107
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁

a (Å)	8.4432 (4)	9.4616 (16)	8.4382 (5)	9.6524 (4)
b (Å)	18.2709 (9)	17.690 (2)	18.2690 (11)	17.8354 (7)
c (Å)	21.9283 (10)	22.405 (4)	21.9586 (14)	21.7634 (10)
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.217	4, 1.197	4, 1.216	4, 1.189
Coefficiente de Absorción μ (mm ⁻¹)	0.08	0.08	0.08	0.08
F(000)	1360	1488	1360	1476
Tamaño cristal (mm ³)	0.25 × 0.23 × 0.08	0.19 × 0.08 × 0.07	0.51 × 0.22 × 0.04	0.58 × 0.15 × 0.13
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	2.4-28.6	1.82-21.97	2.9-22.4	2.3-23.8
Intervalos de los índices	-11 ≤ h ≤ 11 0 ≤ k ≤ 22 0 ≤ l ≤ 29	-9 ≤ h ≤ 9 0 ≤ k ≤ 18 0 ≤ l ≤ 23	-10 ≤ h ≤ 10 0 ≤ k ≤ 22 0 ≤ l ≤ 26	-11 ≤ h ≤ 11 0 ≤ k ≤ 22 0 ≤ l ≤ 26
Datos/restricciones/parámetros	4704/3/428	2606/2/455	3504/4/424	7359/2/586
mejor ajuste en F ²	1.067	1.087	0.916	0.916
índices R finales [I > 2σ(I)]	R1=0.0416 wR2=0.1026	R1=0.0468 wR2=0.1091	R1=0.0506 wR2=0.1246	R1=0.0841 wR2=0.2447
Índices R (todos los datos)	R1=0.0654 wR2=0.1189	R1=0.0773 wR2=0.1252	R1=0.088 wR2=0.1470	R1=0.1014 wR2=2642
Diferencia de densidad máxima y mínima (Å ⁻³)	0.504 y -0.263	0.244 y -0.259	0.413 y -0.285	1.149 y -0.678

Tabla 2.18 Ángulos de torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudo-rotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el AdCH₂CA con los siguientes huéspedes: acetona, DMSO, agua (i obtenidos en 2-propanol/2-pentanol respectivamente), 2-butanol, isopentanol y acetofenona.

Ángulos de Torsión (°)	Acetona	DMSO	Agua ⁱ	2-Butanol	isopentanol	Acetofenona
Δ (°)	16.86	14.81	15.30/15.52	18.29	14.22	13.55
φ_m	47.97	47.57	48.70/48.60	44.59	46.06	49.09
C17-C13-C14-C15	47.45	47.17	48.27/48.15	44.02	45.71	48.75
C16-C17-C13-C14	-41.33	-40.93	-41.83/-41.83	-39.31	-39.59	-41.61
C15-C16-C17-C13	21.43	20.89	21.39/21.39	20.71	19.98	20.90
C14-C15-C16-C17	7.62	8.3	8.14/7.95	6.52	8.26	8.79
C13-C14-C15-C16	-34.50	-34.65	-35.12/-35.07	-31.69	-33.76	-35.89
Conformación del anillo D	Media-Silla distorsionada			Intermedio entre Media-Silla y Sobre	Media-Silla distorsionada	Media-Silla distorsionada

También se estudia la conformación de la cadena lateral de la posición 17 β mediante sus ángulos de torsión (Ψ_1 - Ψ_4), entre los átomos C13 y O24a. Los valores experimentales obtenidos se resumen en la Tabla 2.19.

Tabla 2.19 Ángulos de Torsión para la cadena lateral en complejos de inclusión del AdCH₂CA con acetona, DMSO, agua, 2-butanol y acetofenona. ⁱ conformación intermedia entre *gauche*(60°, -60°) y *trans*(180°), ⁱⁱ posibles localizaciones de la cadena lateral.

Ángulos de Torsión (°)	Acetona	DMSO	2-Propanol	2-Butanol	2-Pentanol	Isopentanol ⁱⁱ	Acetofenona
$\Psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	172.12	172.82	-177.90	172.13	-177.70	166.83/179.41	-177.11
$\Psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	62.21	61.93	-176.05	63.75	-175.69	59.35/66.66	-171.21
$\Psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	174.01	172.32	169.20	170.76	168.86	-171.96/-176.97	68.05
$\Psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	38.12	35.71	58.89	-147.32	59.46	33.42/-51.59	-171.49
$\Psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-62.79	-62.08	-55.09	-61.97	-54.80	-68.54/-56.05	-54.34
Conformación de la cadena lateral	tggtg	tggtg	tttg	gtti ⁱ	tttg	gtti ⁱ /tggtg	ttgt

Alternativamente, podemos estudiar la orientación de la cadena lateral alquílica así como la cadena de unión del extremo hidrófobo con respecto al núcleo esteroideo mediante la comparación de las distancias del grupo carboxílico, en particular, de su átomo de carbono C24 y el centroide del extremo hidrófobo, con los dos planos esteroideos⁵, un plano horizontal, *h*, definido mediante 15 átomos de carbono (C1/C6-C17/C20), y un plano vertical, *v*, definido por los dos grupos metilos C19 y C18 así como sus átomos de carbono vecinos C10 y C13, además del C3. Los dos planos son casi perpendiculares, el valor del ángulo medio interplanar para los cinco cristales estudiados ha sido de $88.3 \pm 0.4^\circ$ que es acorde con los valores obtenidos para el ácido ursodesoxicólico, quenodesoxicólico y sus epímeros⁵. La proyección se toma en la dirección cola (polar-posición 24) cabeza (apolar-grupo hidrófobo) considerando la parte hidrófoba de la molécula en sentido positivo del plano vertical como muestra la Figura 2.39. La Tabla 2.20 resume los datos experimentales obtenidos para las diferentes distancias y ángulos.

Tabla 2.20 distancias y ángulos de enlace medidos para los diferentes compuestos de inclusión con AdCH₂CA.

Disolvente	Acetona	DMSO	2-Propanol	2-butanol	2-Pentanol	Isopentanol	Acetofenona
Ángulo h-v (°)	88.39	88.46	88.86	87.89	88.75	87.17/88.09	87.78
Distancia C24 a h/v (Å)	-2.519/ -0.805	-2.553/ 0.778	-1.068/ 0.378	-2.211/ 0.721	-1.076/ 0.380	-1.945/-0.858 -1.806/-0.858	-0.836/-0.093
D. Centroides hidrófobo a h/v (Å)	0.022/3.336	0.144/3.296	0.410/2.698	0.076/3.249	0.311/2.578	-0.393/2.929 -0.480/2.929	-1.751/3.700
distancia C17-C24 (Å)	4.45	4.43	5.01	4.42	5.00	4.231/4.578	4.47
Ángulo plano h y plano amida (°)	45.2	45.0	39.8	39.0	37.8	39.69/38.60	66.4
interdigitación/ conformación de la cadena lateral considerando Ψ_2	no / gauche	no / gauche	tipo α / trans	tipo β / gauche	tipo α / trans	tipo β / gauche	no / trans

Representando las distancias obtenidas con respecto a los ejes formados por la intersección de ambos planos *h* y *v*, obtenemos la Figura 2.39.

Los valores de las coordenadas del C24-*h/v* son negativos para los cinco cristales lo cual nos indica que el grupo carboxílico está orientado hacia la cara α o hidrófila de la

molécula[#]. Las desviaciones con respecto al plano vertical definido son pequeñas, todas ellas negativas siguen el siguiente orden de distancias al plano *v*: acetofenona < 2-pentanol < 2-butano < DMSO y acetona < 3-metilbutanol.

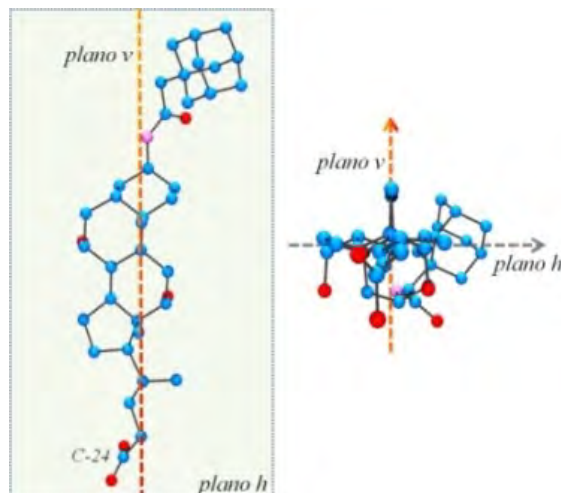


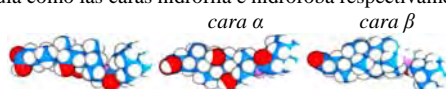
Fig. 2.39 Perspectivas para la molécula AdCH₂CA según los planos *h* y *v* definidos.

Se observa que la proyección de la cadena lateral con el huésped acetofenona es similar al obtenido para el epímero 3 α ,7 β del ácido ursodesoxicólico (UDCA) y para los complejos con DMSO y 2-butanol la orientación es similar a los derivados 3 α ,7 α y 3oxo,12 α ⁵. (Figura 2.40)

El plano horizontal del núcleo esteroideo forma un ángulo con el plano del enlace amida que va desde 39° en el caso s.h. y 2-butanol, 45° para la acetona y el DMSO y 66° en el caso de la acetofenona como muestra la tabla anteriormente citada. También se muestran las distancias del centroide del grupo adamantilo con respecto a los planos *h* y *v* que se muestran también en la figura anterior. Se observa que para la mayoría de los cristales estudiados este grupo se encuentra orientado por encima del plano horizontal hacia la región hidrófoba de la molécula, a excepción del complejo con acetofenona (en gran medida) y el 3-metilbutanol (en menor medida), en los cuales la posición del centroide se sitúa por debajo de este plano, es decir, hacia la región hidrófila.

Para los complejos con huésped se observa como la cadena lateral presenta una conformación tipo *gauche* o plegada, mientras que en el cristal sin huésped esta es *trans* o estirada. Para el caso del complejo con acetofenona, en el que la red estructural es algo diferente, la conformación de la cadena lateral se encuentra entre los dos casos

[#] Se definen las caras α y β de la molécula como las caras hidrófila e hidrófoba respectivamente, como se ilustra en las figuras siguientes:



citados anteriormente, más próxima a una conformación *trans* si atendemos al ángulo de torsión C20-C22. Si analizamos los valores de d_{17-24} (próximos a 4.45 Å) para la mayoría de los cristales obtenidos a excepción del complejo sin huésped, observamos que están en concordancia con una conformación de la cadena lateral *tg*tg. Sin embargo, en el complejo sin huésped vemos que hay un aumento de un 10% de la distancia situándose en 5.01 Å, lo que indica que para un cristal ortorrómbico la cadena lateral está completamente estirada[#]. Estas características se evidencian claramente en la Figura 2.41.

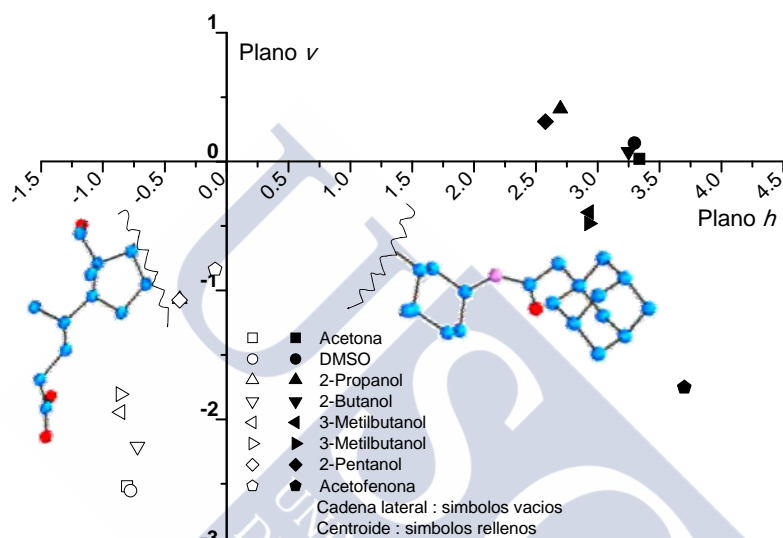


Fig. 2.40. Proyección de los centroides hidrófobos y el C24 sobre el plano perpendicular a los planos *h*, *v* definidos para los diferentes complejos de inclusión obtenidos para AdCH₂CA.

En todos los cristales se observa la formación de una cavidad cóncava en la que se podrían alojar las moléculas de los huéspedes. Esta cavidad está formada por el anillo A del núcleo esteroideo, el grupo metilo 19, el enlace amida y el grupo adamantilo hidrófobo. Sin embargo, se observa que la conformación de la cadena y su longitud no dejan el espacio suficiente para que esto ocurra. La distancia entre los centroides del grupo hidrófobo y el anillo A así lo confirman, siendo 6.33, 6.37, 6.40, 6.66 y 6.77 Å para los complejos s.h., acetona, DMSO, 2-butanol y acetofenona, respectivamente. Se observa pues que los valores son prácticamente idénticos, y a medida que aumenta el tamaño del huésped se observa un leve crecimiento en la distancia entre los dos centroides. Algunos de ellos, como en los casos de la acetona, DMSO, agua y 2-butanol, forman enlaces de hidrógeno con el grupo amida.

[#] La longitud máxima esperada para una cadena alquílica ideal compuesta por cinco átomos de carbonos completamente estirada es de 5.0 Å, considerando $d_{C-C}=1.53$ Å y un $\text{ángulo}_{C-C-C}=109.5^\circ$ y 5.3 Å si el ángulo es de 120° .

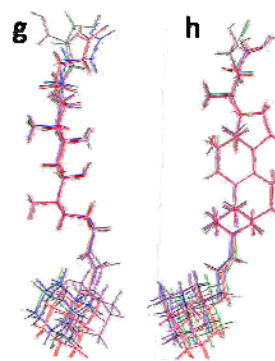
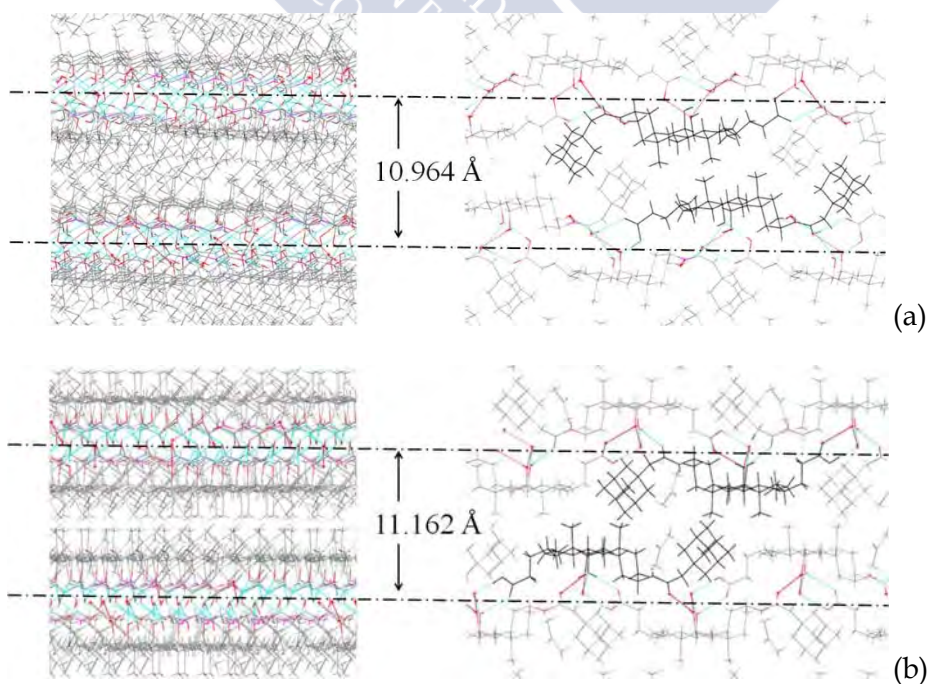


Fig. 2.41. Vista del AdCH₂CA a lo largo del plano h. a) agua, b) DMSO, c) acetona, d) 2-butanol, e) isopentanol f) acetofenona, g y h) diagramas de superposición del AdCH₂CA en DMSO (azul), s.h. (verde), 2-butanol (negro), isopentanol (rojo), acetofenona (violeta).

Los empaquetamientos del AdCH₂CA en acetona, DMSO, s.h. y 2-butanol a lo largo del eje *c* se muestran en la Figura 2.42. En ella se observan claramente la disposición en bicapas de la estructura cristalina en regiones hidrófilas e hidrófobas. Las caras β o hidrófobas de las moléculas están orientadas hacia la misma zona facilitando así las interacciones de tipo hidrófobo, en todos estos casos las moléculas presentan una orientación antiparalela (cabeza-cola). Esta conformación según Miyata *y col.*⁵⁵ es más típica de cristales de ácido desoxicólico que suelen presentar este tipo de disposición, mientras que los cristales de ácido cólico suelen presentar disposiciones cola-cola.



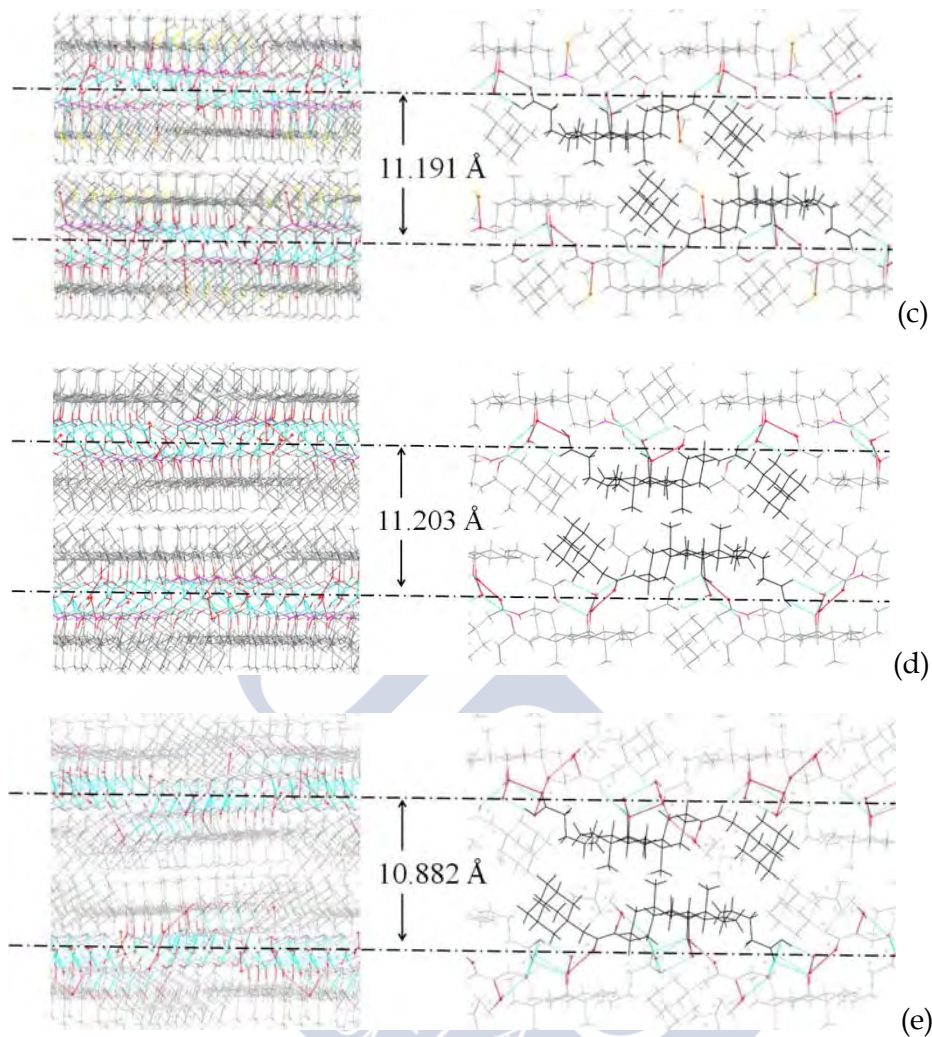


Fig. 2.42 Empaquetamiento del cristal AdCH₂CA en (a) 2-propanol y 2-pentanol; (b) acetona; (c) DMSO; (d) butanol; (e) isopentanol. Red de enlaces de hidrógeno que unen las regiones hidrófobas de las estructuras laminares dibujadas como líneas negras.

Los grupos carboxílicos e hidroxílicos de la molécula forman la región hidrófila estabilizando la estructura mediante enlaces de hidrógeno. El ancho de la bicapa en los cristales se puede observar en la anterior figura, calculada como la distancia entre capas hidrófilas obteniendo los siguientes valores: 10.964, 11.162, 11.191, 11.203 y 10.882 Å para los cristales sin huésped, acetona, DMSO, 2-butanol y isopentanol respectivamente, valores que se corresponden con la mitad de la longitud de la celda unidad en la dirección *c*.

Para el complejo de AdCH₂CA/Acetona observamos que dos moléculas de huésped se alojan en el interior de los huecos o canales generados en las capas lipófilas e interactúan mediante enlaces de hidrógeno con el grupo amida. Las capas lipófilas se mantienen unidas mediante contactos de van der Waals débiles mientras que los canales hidrófilos están formados por redes de enlaces de hidrógeno que muestra la

Figura 2.43 y en la cual participan cuatro moléculas del derivado de sal biliar y una de agua. Debemos mencionar la posición alternada de los grupos adamantano como indican las flechas de la figura a lo largo del eje cristalográfico *b*.

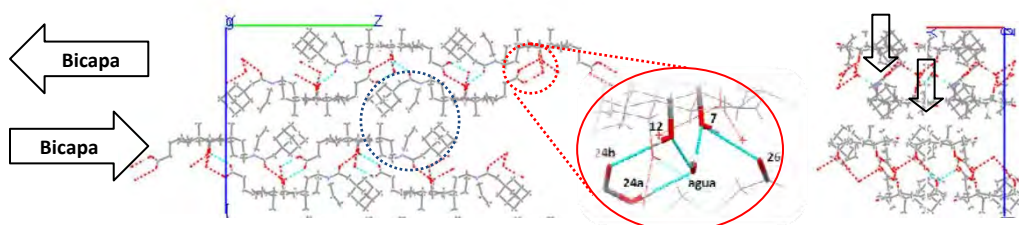


Fig. 2.43 Empaquetamiento del complejo de inclusión AdCH₂CA:Acetona a lo largo de los ejes cristalográficos *a* y *b*.

El compuesto de inclusión obtenido con DMSO presenta la misma disposición y secuencia de enlaces de hidrógeno que en el caso de la acetona, solamente decir que las moléculas de DMSO están formando enlaces de hidrógeno con el grupo amida N25-H^{IV}··O(DMSO) con una distancia donante(D)-aceptor(A) que ha aumentado de 2.091 Å (ángulo <DHA 167°) en el del complejo con acetona a 2.958 Å y 173° para el DMSO. Tanto en los complejos de inclusión con acetona como con DMSO, el ordenamiento se presenta sin interdigitación entre los metilenos 18 y 19. Para los cristales obtenidos en 2-propanol y 2-pentanol, el hecho más destacable es la ausencia de moléculas de huésped en los canales hidrófobos, lo que origina un deslizamiento de 3.5 Å en las bicapas de forma que los canales hidrófobos en donde anteriormente se alojaban las moléculas de huésped quedan bloqueados por los residuos de adamantilo. Este hecho origina un ordenamiento con interdigitación tipo α , presentando una conformación de la cadena lateral *trans* o estirada como ya se comentó anteriormente.

Se observa que al igual que describían Polonski *y col.*⁸⁰ cuando definían el polimorfismo dependiente del huésped, la forma y geometría de los canales se ven modificados por la conformación de la cadena lateral y por el desplazamiento de las bicapas, dando lugar a un tipo de polimorfismo conformacional que puede ser aplicado también a los derivados del CA⁸². Al comparar el desplazamiento de las moléculas de esteroide entre AdCH₂CA:acetona o DMSO con respecto a los cristales obtenidos en 2-propanol y 2-pentanol, (véase la Figura 2.44), se observa que existe el deslizamiento de 3,5 Å de una capa hidrófoba sobre la otra que provoca la transformación α -*trans* → sin interdigitación-*gauche*. En cuanto a la red de enlaces de hidrógeno se observa que existe una red cíclica similar a los dos primeros casos además de otra helicoidal infinita que se muestran en la misma figura. Se observa que en la red cíclica se produce una rotación conformacional respecto al C24 y que las moléculas de aguas participan dando continuidad a la red helicoidal de enlaces de hidrógeno. Una de estas moléculas está formando un enlace de hidrógeno con el grupo amida N25-H^V··O(agua) con una distancia D-A de 2.940 Å y un ángulo <DHA 158°, posición ocupada anteriormente por la acetona o DMSO.

Red cíclica: O12-H^{IV} ··· O(agua^I)-H ··· O24b=C-O24a-H^{III} ··· O12^{IV}

Red helicoidal: ...O=C26-N-H^V ··· O(agua^{II})-H ··· O(agua^I)-H ··· O^I=C26 ··· H-O7^{II}...

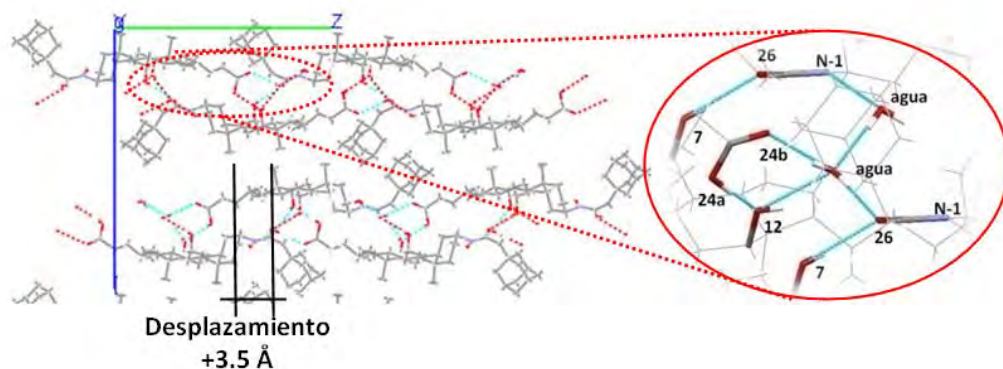


Fig. 2.44 Empaquetamiento del complejo de inclusión AdCH₂CA:agua a lo largo del eje cristalográfico a

El complejo de inclusión AdCH₂CA/2-butanol presenta varias diferencias con respecto a los anteriormente estudiados. Por un lado la conformación de la cadena lateral ahora es tipo *gauche* al igual que sucedía con la acetona y el DMSO pero existe interdigitación de tipo β entre los metilos 18 y 19, lo que sugiere que el desplazamiento observado para el cristal sin huéspedes aumenta para el 2-butanol siendo ahora de 8.7 Å (Figura 2.45), por lo que se produce un nuevo deslizamiento de 5.2 Å de una capa hidrófoba sobre la otra con respecto los complejos anteriores. Ello provoca la transformación isoestructural pasando de sin interdigitación *gauche* \rightarrow β -*gauche*.

Las moléculas de 2-butanol tratan de mimetizar la estructura hidrófoba del núcleo esteroideo, lo que se traduce en que si miramos el cristal a lo largo del eje *a*, la molécula parece tener tres grupos metilo unidos al núcleo esteroideo lo que se resalta con las flechas verdes de la Figura 2.45. En cuanto a la red de enlaces de hidrógeno se observa la existencia de una red cíclica idéntica a la obtenida con 2-propanol que se completa con la red helicoidal descrita a continuación:

Red cíclica: O12-H^{IV} ··· O(agua)-H ··· O24b=C-O24a-H^{III} ··· O12^{IV}

Red helicoidal: O(2-butanol)-H--O(agua)-H ··· O7-H^{II} ··· O26^I

En los cristales vistos hasta el momento, se observa que el grupo amida siempre participa en la red de enlaces de hidrógeno, a través, de las moléculas del huésped o agua, pero en este caso el N25-H queda libre.

En el caso del cristal con isopentanol (Figura 2.46), debido a la deslocalización en la cadena lateral del ácido biliar y del disolvente en la red cristalina, podemos determinar dos posiciones relativas con sus correspondientes redes de enlaces de hidrogeno que se describen más adelante (Figura 2.47).

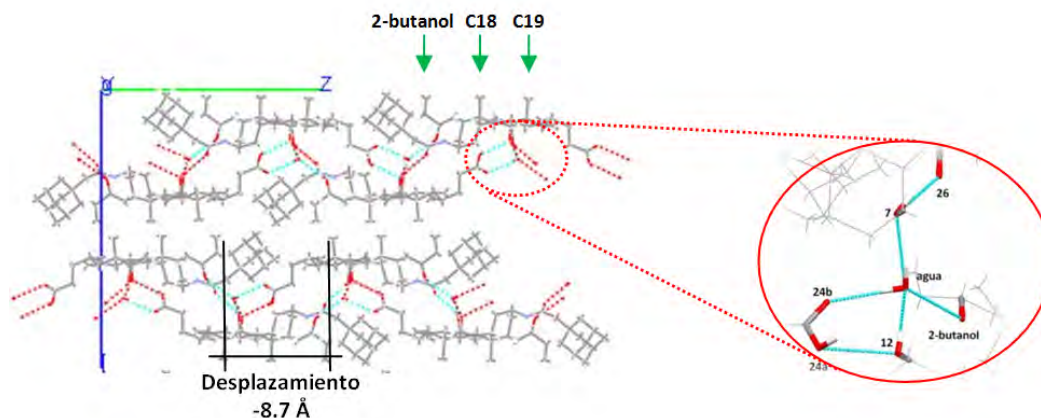


Fig. 2.45 Empaquetamiento del complejo de inclusión $AdCH_2CA:2\text{-butanol}$ a lo largo del eje cristalográfico a .

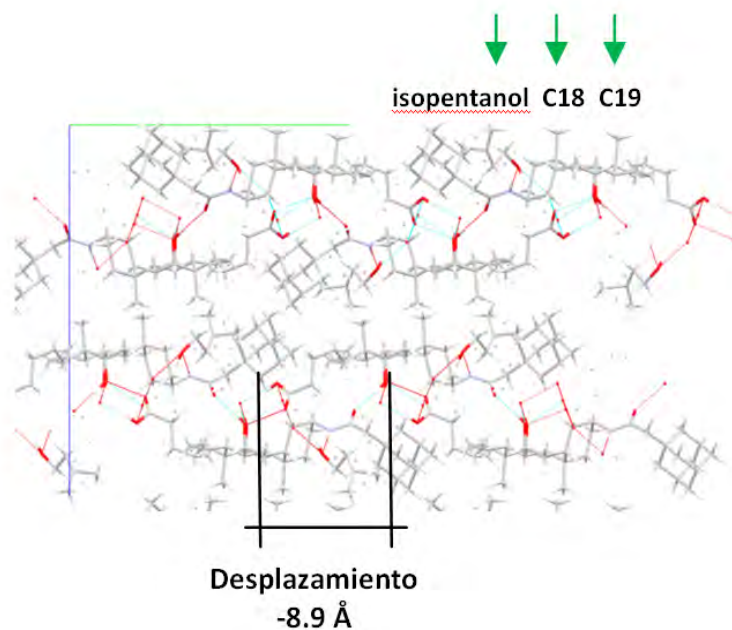


Fig. 2.46 Empaquetamiento del complejo de inclusión $AdCH_2CA:\text{isopentanol}$ a lo largo del eje cristalográfico a .

En la Figura 2.48 se muestran la forma y el volumen por molécula de cada huésped estudiado: agua, 9(23) Å³; acetona, 118(68) Å³; DMSO, 123(76) Å³; 2-propanol, 128 Å³; 2-butanol, 152(92) Å³; isopentanol, 181(106) Å³; acetofenona, 194(124) Å³, y 2-propanol 128(70) Å³, calculados a partir de sus densidades en estado líquido a 25 °C.

Los valores entre paréntesis están calculados teniendo en cuenta los siguientes radios de van der Waals H: 1.20Å, C: 1.70Å, N: 1.65Å, O:1.60Å y S:1.81 Å. La molécula de $AdCH_2CA$ tendría un volumen medio así calculado de 603 Å³.

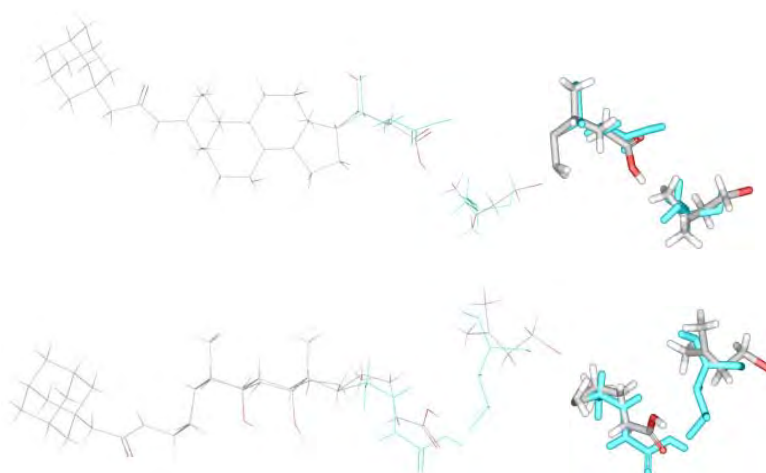


Fig. 2.47 Posiciones relativas del isopentanol.

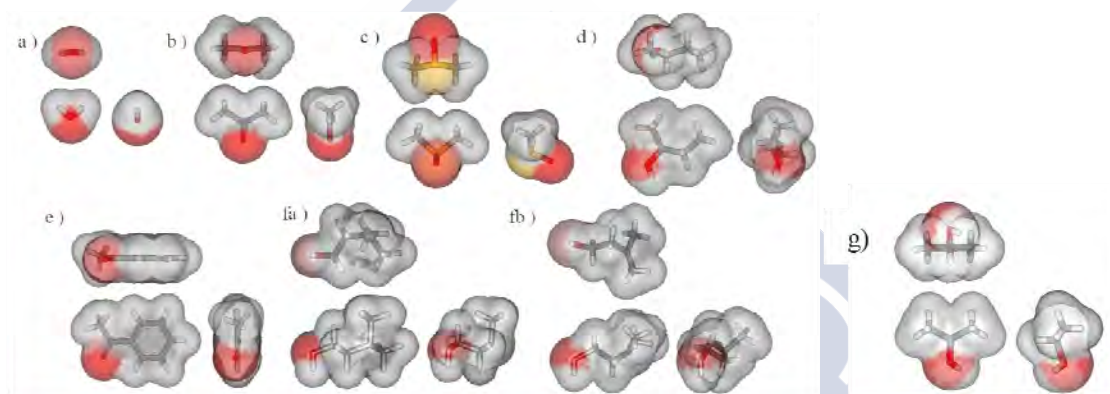


Fig. 2.48 Volúmenes moleculares en alzado, planta y perfil de las diferentes moléculas ocluidas teniendo en cuenta los radios de van der Waals: a) agua, b) acetona, c) DMSO, d) 2-butanol, e) acetofenona f) isopentanol (dos posiciones relativas en el cristal); g) 2-pentanol

Miyata y col.⁸⁷ realizaron un estudio sistemático de las estructuras cristalinas de complejos de inclusión del ácido cólico con bencenos monosustituídos.

A partir del tamaño y la forma de las cavidades, establecieron el siguiente orden de sus volúmenes: α -gauche < α -trans y β -gauche < β -trans. Atendiendo a esta clasificación, en nuestro caso el orden de volúmenes seguiría la siguiente secuencia: α -trans (agua) bicapas < s.i.-gauche (acetona y DMSO) bicapas < β -gauche (2-butanol e isopentanol) bicapas < s.i.-trans (acetofenona) cruzada.[#]

La mayoría de los complejos presentan una cavidad en la que se alojan los huéspedes y una molécula de agua, a excepción de los complejos con acetofenona e isopentanol.

[#] s.i. significa sin interdigitación

Al calcular los volúmenes asociados a las moléculas alojadas considerando sus radios de van der Waals (Figura 2.49), resultan los siguientes volúmenes: agua:agua (42\AA^3), acetona:agua (94\AA^3), DMSO:agua (96\AA^3), isopentanol (106\AA^3), 2-butanol:agua (112\AA^3) y una molécula de acetofenona (124\AA^3).

Estos valores han sido calculados mediante el programa Accelrys DS Visualizer v 2.0.1.

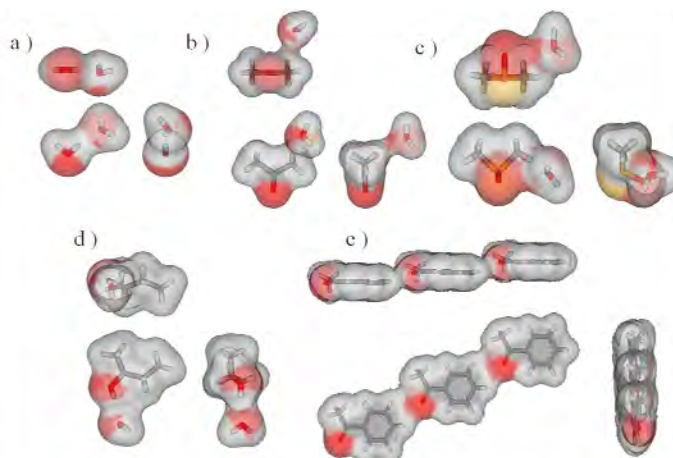


Fig. 2.49 Volúmenes de la superficie de los huéspedes en las cavidades de la red cristalina tomando como referencia los radios de Van der Waals para el alzado, planta y perfil de las diferentes moléculas ocluidas: a) agua, b) acetona, c) DMSO, d) 2-butanol y e) acetofenona.

Mediante el program PLATON v 1.15 se realizaron los cálculos correspondientes a la celda unidad para estudiar los posibles huecos existentes que pudieran alojar diferente tipo de moléculas. Para ello, hemos utilizado los mismos radios de van der Waals ya citados y se realiza una búsqueda en la red cristalina de huecos en los cuales se puedan incorporar esferas cuyo radio sea de 0.7\AA , observando también los índices de empaquetamiento de los cristales. Los resultados obtenidos para los diferentes complejos se describen en la Tabla 2.21.

El volumen de la cavidad va en orden creciente en relación con el tamaño del huésped a excepción de la acetofenona en la que se observa claramente una redistribución de la red cristalina. El factor de empaquetamiento se encuentra en el intervalo de los coeficientes de empaquetamiento para cristales de inclusión y huéspedes encapsulados, 55-75 %, dados por Miyata *y col.*⁸⁷ para los huéspedes acetona, DMSO y 2-butanol presentándose el radio de 1.2\AA como el que daba mejores resultados. Se observa también que para el caso del complejo sin huésped el coeficiente de empaquetamiento calculado tiene una gran dependencia en función del radio de prueba escogido. PLATON da unos valores esperados de referencia para los volúmenes de disolvente, 40\AA^3 para una molécula de H_2O unida mediante enlaces de

hidrógeno, valores entre 100-300Å³ para moléculas de pequeño tamaño como el tolueno.

Tabla 2.21 [a] Volumen molecular calculado con los radios de van der Waals para los huéspedes presentes en las cavidades mediante el programa Accelrys DS Visualizer v 2.0.1. [b] volumen de la cavidad en la celda unidad calculada con un radio de prueba de 0.7 Å y 1.2 Å respectivamente, [c] coeficiente de empaquetamiento (vide supra)⁸⁷, [d] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculado sin los huéspedes presentes y [e] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculados con el programa PLATON.

	Volumen molecular ^[a] [Å ³]	Vol. cavidad ^[b] (Å ³)	PC cavidad ^[c] [%]	índice empaquetamiento huecos ^[d] [%]	índice empaquetamiento cristal ^[e] [%]
2H ₂ O	42	162/46	26/91	65	69
acetona/agua	94	204/148	46/64	61	69
DMSO/agua	96	206/152	47/63	61	70
isopentanol	106	238/154	45/69	desorden estructural	desorden estructural
2-butanol/agua	112	265/187	42/60	58	69
acetofenona	124	235/156	53/80	60	68

Estudiando las redes de enlaces de hidrógeno podemos observar que en los cristales s.h. una molécula de agua participa como aceptor del grupo amida, como lo hacían la acetona y el DMSO en sus correspondientes complejos.

En el complejo con 2-butanol, ninguna molécula de huésped participa formando enlaces de hidrógeno con este grupo. Sin embargo, se forma un enlace de hidrógeno con una molécula de agua con una distancia D-A de 2.96 Å y un ángulo <DHA de 174°, rompiendo con ello la red helicoidal de enlaces de hidrógeno que se daba en el caso del complejo sin huésped.

Existe una red cíclica común a todos los complejos obtenidos con una leve diferencia en la rotación de la cadena lateral del C24 de forma que para la acetona y DMSO la secuencia es diferente que en el cristal s.h. y con 2-butanol (Figura 2.50).

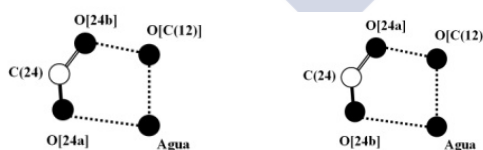


Fig. 2.50 Red cíclica de enlaces de hidrógeno para complejo AdCH₂CA: acetona, DMSO y AdCH₂CA: s.h., 2-butanol, respectivamente.

Para todos los complejos obtenidos, cada molécula de esteroide se relaciona con otras cuatro vecinas mediante enlaces de hidrógeno, así como con las moléculas de agua o los diferentes huéspedes. Las longitudes y ángulos de enlaces para los diferentes enlaces de hidrógeno se resumen en la Tabla 2.22. Todos los datos se corresponden con valores habituales para interacciones de enlace de hidrógeno.

Tabla 2.22 Enlaces de hidrógeno para las diferentes estructuras cristalinas de AdCH₂CA obtenidas.

Huésped	Donante – H ··· Aceptor	D ··· A	<DHA (°)
acetona	O12–H ^{II} ··· O24b ^I	2.7911(14)	170(2)
	O24a–H ^I ··· O(agua)	2.5990(15)	174.3(16)
	O7–H ^{III} ··· O26 ^{IV}	2.7524(13)	161.6(18)
	N25–H ^{IV} ··· O(acetona)	2.0912(16)	167.1(16)
	O(agua)–H(A) ··· O7 ^{III}	2.7648 (14)	176.6(17)
	O(agua)–H(B) ··· O12 ^{II}	2.7746(14)	159(2)
2-dimetil sulfóxido	O12 – H ^{II} ··· O24b ^I	2.800 (3)	164(3)
	O24a – H ^I ··· O(agua)	2.588(4)	170(3)
	O7 – H ^{III} ··· O26 ^{IV}	2.760(3)	170(4)
	N25 – H ^{IV} ··· O(DMSO)	2.958(4)	173(3)
	O(agua)–H(A) ··· O7 ^{III}	2.748(4)	161(8)
	O(agua)–H(B) ··· O12 ^{II}	2.76(3)	161(5)
sin huésped	O(agua) ⁱ –H(A) ··· O24b ^{III}	2.756 (3)	171(3)
	O24a – H ^{III} ··· O12 ^{IV}	2.623(3)	168(4)
	O7–H ^{II} ··· O26 ^I	2.782(3)	161(4)
	N25 – H ^V ··· O(agua) ⁱⁱ	2.940(4)	158(3)
	O12 – H ^{IV} ··· O(agua) ⁱ	2.803(3)	147(3)
	O(agua) ⁱ –H(B) ··· O26 ^I	2.738(3)	174(4)
2-butanol	O(agua) ⁱⁱ –H(A) ··· O(agua) ⁱ	2.788(3)	172(3)
	O(agua)–H(A) ··· O24b ^I	2.713(5)	164(4)
	O24a–H ··· O12 ^{II}	2.717	132
	O7–H ^{III} ··· O26 ^{IV}	2.717(5)	155(5)
	O12–H ^{II} ··· O(agua)	2.768(6)	165(5)
	O(agua)–H(B) ··· O7 ^{III}	2.814 (6)	169(7)
Isopentanol	O(2-butanol)–H ··· O(agua)	2.960(6)	174
	N25 – H ··· O(isopentanol) ⁱ	2.841	169
	O(isopentanol) ⁱⁱ –H ··· O24b	2.632	149.2
	O24a–H ··· O12	2.703(8)	128(5)
	O12–H ··· O(isopentanol) ⁱⁱⁱ	2.792(7)	128.6(17)
	O(isopentanol) ^{iv} –H ··· O7	2.757(7)	134(5)
O7–H ··· O26 ^{II}	2.729(5)	157(5)	

La distribución molecular de las unidades de ácido biliar en la red cristalina se muestra en la Figura 2.51. Podemos observar la interacción de una molécula de ácido biliar con sus cuatro moléculas vecinas, como ya hemos comentado con anterioridad. El hecho más destacable es que el enlace O7H ··· O26 se repite en todos los cristales, mientras que el enlace O12H ··· O24b se presenta en los complejos con acetona y DMSO, siendo el grupo hidroxilo donante, para el cristal sin huésped. Con 2-butanol e isopentanol se produce la inversión actuando como aceptor, O24aH ··· O12. Para todos los complejos el O24a y el O26 se presentan como donante y aceptor, respetivamente.

Toda esta red de enlaces de hidrógeno interconecta los grupos hidrófilos de la estructura laminar como se mostraba en las figuras anteriormente vistas.

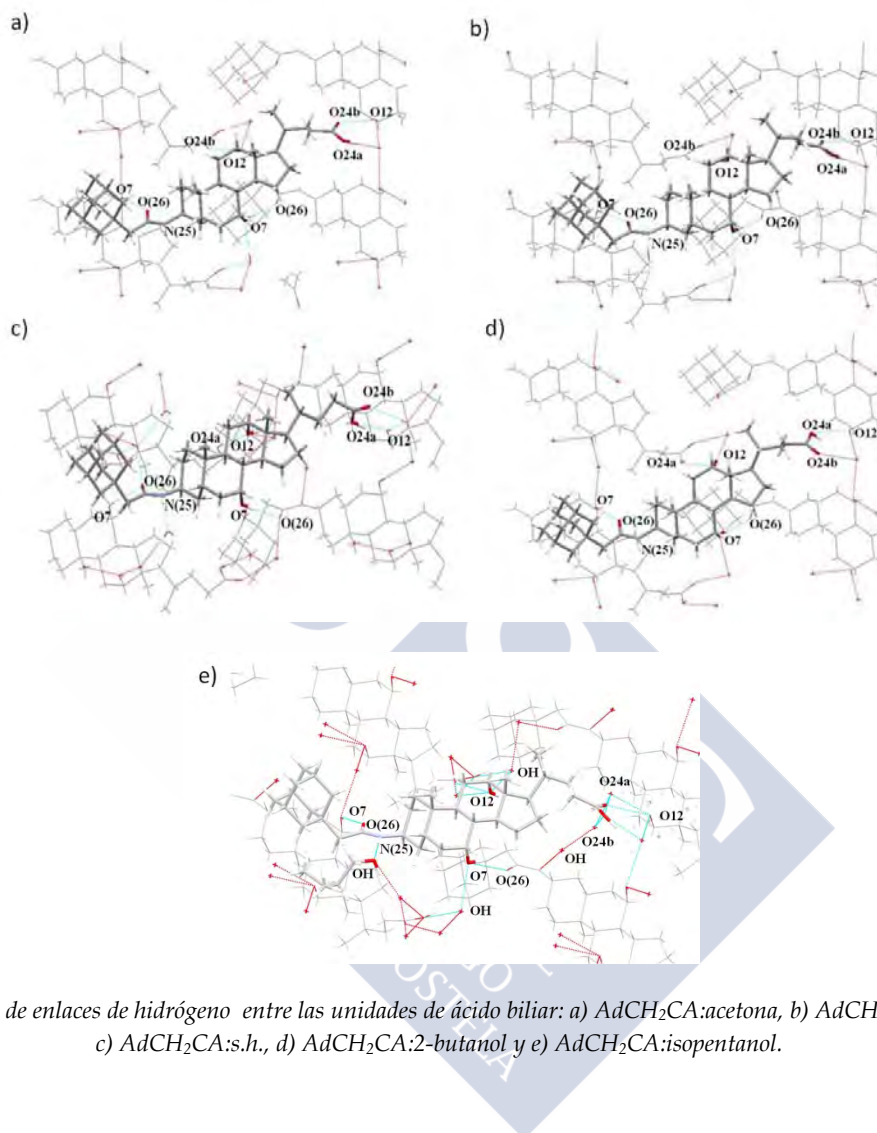


Fig. 2.51 Red de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar: a) $AdCH_2CA:acetona$, b) $AdCH_2CA:DMSO$, c) $AdCH_2CA:s.h.$, d) $AdCH_2CA:2-butanol$ y e) $AdCH_2CA:isopentanol$.

2.3.1.1 ENANTIOSELECTIVIDAD ENTRE EL $AdCH_2CA/2-butanol$

Al recrystalizar el complejo $AdCH_2-CA/2-butanol$, se hizo uso de 2-butanol racémico. Sin embargo, el complejo de inclusión es enantioselectivo a la hora de albergar la molécula de huésped en su interior. Miyata *et al.* han realizado estudios de resolución enantiomérica en derivados de ácidos biliares con mezclas racémicas de alcoholes proponiendo un modelo de cuatro¹². Por otro lado Bortolini y col.¹¹⁶ en una reciente revisión bibliográfica dan una idea amplia y clara de la multitud de variables que pueden tener importancia en la optimización de los procesos de resolución enantiomérica mediante la utilización de derivados de ácidos biliares. Entre algunas de las variables que pueden tener influencia se encuentran: el número de grupos

hidroxilo, la orientación de dichos grupos (α o β), la longitud de la cadena lateral, el tipo de sustituyentes y las modificaciones en las superficies hidrófilas o hidrófobas.

Las moléculas de huésped encontradas en el complejo de inclusión se presentan con la configuración S(+)-2-butanol, por lo que el complejo de inclusión produce una separación enantiomérica de la mezcla racémica de partida. En la Figura 2.52 se muestra en detalle la posición y orientación del huésped en la red cristalina.

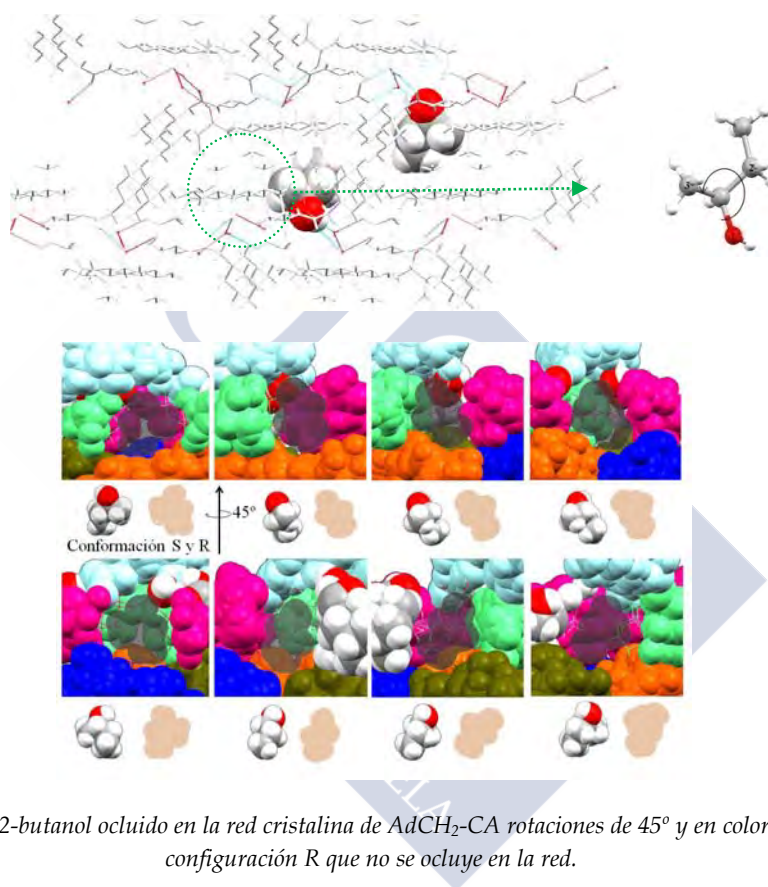


Figura 2.52. S(+)-2-butanol ocluido en la red cristalina de AdCH₂-CA rotaciones de 45° y en color salmón cavidad configuración R que no se ocluye en la red.

La estequiometría del cristal indica que por cada molécula de ácido biliar se separan una de S(+)-2-butanol. Este hecho, junto con la posibilidad de hacer soluble el cristal en dimetilformamida u otro solvente de alto punto de ebullición, indica que el S(+)-2-butanol podría ser recuperado mediante diferentes métodos como extracción, destilación, o recristalización (Figura 2.53). El ácido biliar puede ser recuperado y utilizado en sucesivos ciclos. Debido a la simplicidad y sencillez de los procedimientos y condiciones experimentales, la capacidad y bajo coste de los ácidos y derivados biliares, son factores que se pueden considerar importantes para el éxito que pueda alcanzar este tipo de metodología enantioselectiva en posibles aplicaciones a escala industrial¹¹⁷.

La resolución óptica de compuestos orgánicos mediante la utilización de complejos de inclusión utilizando como huéspedes ácidos esteroideos como el ácido cólico y derivados han sido ampliamente estudiados por Miyata M. et al.¹¹⁸, destacando su particular interés en el campo de reconocimiento de sustancias orgánicas de importancia biológica, como las lactonas utilizadas en perfumes, feromonas, etc. así como la alta eficiencia de este tipo de sistemas. En diversos artículos publicados por estos autores se estudia la resolución enantiomérica de alcoholes alifáticos mediante la formación de complejos de inclusión con litocolamida²⁴ y colamida²⁸. En su trabajo con la colamida se sugiere como posible causa del reconocimiento quiral de alcoholes alifáticos a la posibilidad de los enlaces de hidrógeno con los grupos amida y alcohol, originando lo que denominan *ganchos*, y el entorno estérico asimétrico de la cavidad formada en la red cristalina.

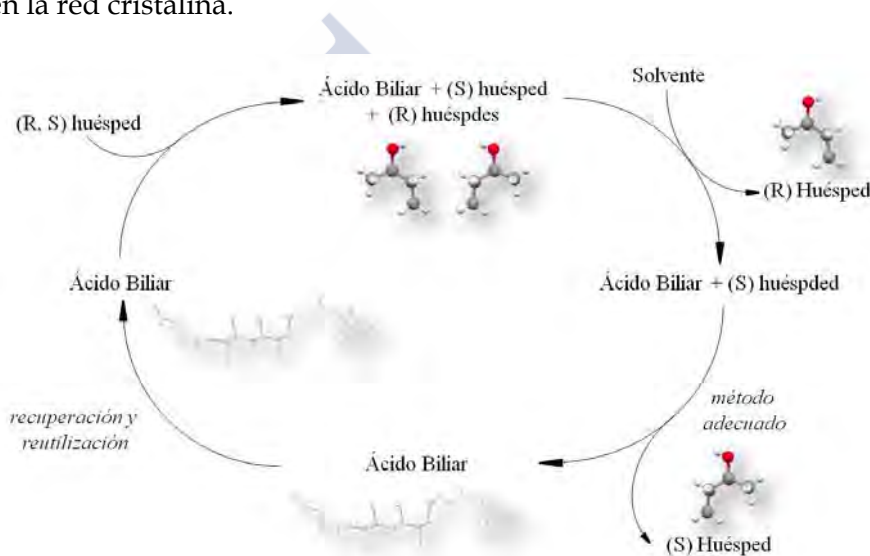


Fig. 2.53 Complejación de inclusión enantioselectiva de huéspedes racémicos. La incorporación del enantiómero S es genérica.¹¹⁷

En nuestro caso debemos de atribuir principalmente al segundo efecto el hecho del reconocimiento quiral ya que se observa que no existe una interacción clara con los grupos amida del ácido biliar sintetizado. Otro hecho destacable es que para todos los alcoholes estudiados la configuración predominante en la red cristalina es la R(-), mientras que sólo en el caso del 2-butanol se incorporaba la S(+). Este fenómeno ha sido asociado a un reordenamiento estructural de la red de ácido biliar en cuestión.

Bortolini et al.^{82,116-117,119-120} también han publicado diferentes trabajos en los cuales estudian la resolución de cetonas cíclicas, sulfóxidos, racematos orgánicos, epóxidos y amidas cíclicas, mediante inclusión enantioselectiva en ácidos biliares utilizando el ácido cólico y desoxicólico para tal fin. También destacan la gran eficiencia y simplicidad, en cuanto a las condiciones empleadas y cantidades recuperadas de

huéspedes y ácidos biliares, así como un amplio número de procedimientos de inclusión.

Hemos realizado medidas de rotación específica α_D , para confirmar la enantioselectividad de la molécula sintetizada. Para dichas medidas se ha empleado un polarímetro Automático Digital Propol Dr. Kernchen, con una resolución de 0.0001° , fuente de Na (589nm) y una cubeza de cuarzo de 2 cm de paso de luz.

El sistema medido está compuesto por el derivado del ácido cólico AdCH₂CA, y como disolvente se ha utilizado una mezcla racémica de 2-butanol (2-butanol Panreac p.a., riqueza mínima 99%, densidad a 20/4 0.805-0.809, p.m. 74.12). Cabe mencionar que la rotación específica para el 2-R(-)-butanol es de -13.52 y el 2-S(+)-butanol es de 13.52, $\alpha_{20/D} +14 \pm 2$, c = 10% en metanol (Fluka) (Figura 2.54).

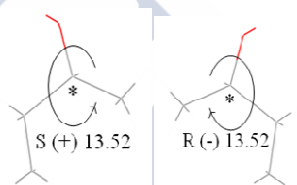


Fig. 2.54 Rotación específica del 2-R(-)Butanol y 2-S(+)-butanol.

El polarímetro se ha calibrado con la cubeta vacía y agua, comprobando que las mediciones de rotación eran de 0.0000° en ambos casos. También se midió la mezcla racémica de 2-butanol, obteniendo el mismo valor que en los dos casos anteriores.

Se preparó una disolución 64 mM de AdCH₂CA en 2-butanol, obteniéndose un valor para el ángulo de rotación de $\alpha = 0.1554^\circ$, por lo que $\alpha_{20/D} = 20.64^\circ$. Se puede considerar pues que la rotación específica de $+20.64^\circ$ es la correspondiente a la molécula de AdCH₂CA, siendo debida a sus 11 centros quirales. Posteriormente se realizó una comprobación estudiando la rotación en función de la concentración de AdCH₂CA en la mezcla racémica de 2-butanol, representando la rotación medida α frente a la concentración (g/ml) obteniéndose los resultados de la Figura 2.55).

Del valor de la pendiente y la ecuación que relaciona la rotación experimental con la concentración $\alpha = (\alpha_{20/D} l')C$, (siendo l' el ancho de la cubeta en dm y $\alpha_{20/D}$ la rotación específica medida a 20 °C con fuente de sodio de 589 nm), resulta un valor $\alpha_{20/D} \cdot l' = 4.1 \pm 0.0$, por lo que la rotación específica es $\alpha_{20/D} = +20.50 \pm 0.07^\circ$.

Por otra parte, se recrystalizó la muestra y se recogieron 82.95 mg de cristales, los cuales han sido filtrados mediante un filtro Whatman, lavados varias veces con 2-butanol y secados a vacío durante 24 h en un desecador con P₂O₅ como agente

desecante. Tras este procesado se preparó una disolución de concentración inicial 81 mM (55 mg/ml), a partir de la que se preparó una serie de disoluciones diferenciadas entre sí por un factor de dilución de 2/3. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 2.23. La Figura 2.56 muestra la dependencia experimental observada entre la rotación óptica y la concentración.

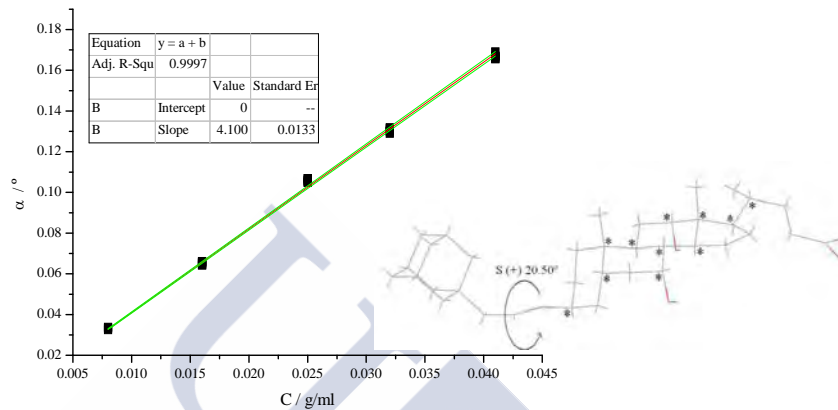


Fig. 2.55 – Rotación frente a la concentración para AdCH₂CA en 2-butanol.

Tabla 2.23. Concentraciones y medidas teóricas y experimentales realizadas con los cristales.

	C (g/ml)	AdCH ₂ CA (g/ml)	2-butanol (g/ml)	α_{AdCH_2CA}	$\alpha_{2-butanol}$	$\alpha_{teórico (S)}$	$\alpha_{teórico (R)}$	$\alpha_{experimental}$
C ₀	0.0551	0.0476	0.0060	0.1951	0.0163	0.2115	0.1788	0.2241±0.0017
C ₁	0.0367	0.0317	0.0040	0.1301	0.0109	0.1410	0.1192	0.1380±0.0009
C ₂	0.0245	0.0212	0.0027	0.0867	0.0073	0.0940	0.0795	0.0944±0.0020
C ₃	0.0163	0.0141	0.0018	0.0578	0.0048	0.0627	0.0530	0.0612±0.0014
C ₄	0.0109	0.0094	0.0012	0.0385	0.0032	0.0418	0.0353	0.0454±0.0018
C ₅	0.0073	0.0063	0.0008	0.0257	0.0022	0.0278	0.0235	

Al redissolver los cristales en la mezcla racémica de 2-butanol, hay que considerar que la rotación óptica observada es la suma de las contribuciones de los dos componentes ópticamente activos: el 2-S-(+)-butanol y el AdCH₂CA, $\alpha = \alpha_{S-2-butanol} + \alpha_{AdCH_2CA}$, la contribución de cada uno se puede escribir como, $\alpha_i = \alpha_{20/D} \times l' \times c_i/100$, siendo c_i , la concentración del i-ésimo componente en g/100mL. Debido a la estequiometría del cristal, la concentración de los dos componentes es la misma, por lo que se puede desarrollar la siguiente expresión:

$$\alpha = \left(\alpha_{20/D} (s-2-but) + \frac{M_{AdCH_2CA^{20}}}{M_{S-2-but_D}} \alpha_{20/D} (AdCH_2CA) \right) \times l \times c_{S-2-but} / 100 \quad \text{Ec.2.1}$$

en la que M_{AdCH_2CA} y $M_{S-2-but}$ se corresponden con la masa molar de ambos componentes.

Las medidas de rotación óptica fueron hechas en el intervalo de concentración entre 0.8-6.0 mg/mL de $c_{S-2-but}$, y el valor experimental para la pendiente fue de $34.8 \pm 0.2^\circ$, coincidente con el teórico (Figura 2.56). Ahora bien, si el huésped fuera la especie enantiomérica *R*, el valor de la pendiente debería de ser de 29.6° .

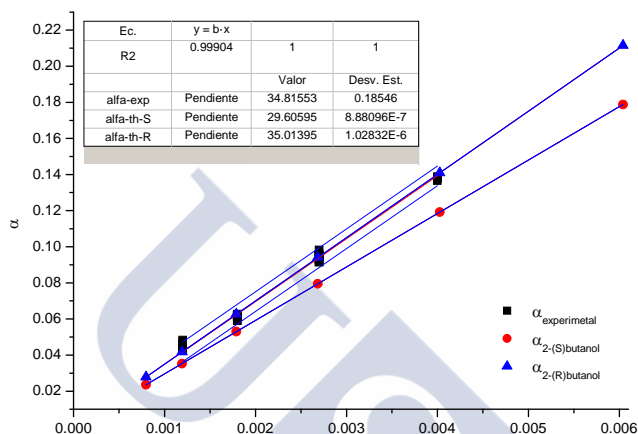


Figura 2.56 – Comparativa de los datos teóricos y experimentales de rotación óptica obtenidos.

Por lo tanto, la representación de α frente a $c_{S-2-but}$ debe ser lineal y su pendiente deberá tener un valor teórico de 35.0° . Este valor surge a partir de la utilización de los valores de $+20.64^\circ$ y 13.52° para $[\alpha]_D^{20}(AdCH_2CA)$ y $[\alpha]_D^{20}(S-2-but)$, respectivamente.

Finalmente, al tener en cuenta el error experimental del $\approx 1\%$, puede afirmarse que el S-2-butanol aislado del cristal debe ser considerado como enantioméricamente puro.

2.3.1.2 COMPLEJO DE INCLUSIÓN $AdCH_2CA/acetofenona$

El complejo de inclusión de $AdCH_2-CA/acetofenona$ resultó dar lugar a una estructura cruzada que difiere en bastantes aspectos de las estructuras en bicapas vistas hasta el momento, incluso para los complejos de inclusión de los ácidos cólico, desoxicólico y apocólico (ACA) con acetofenona.

Para CA, DCA y ACA las moléculas se ordenan en una matriz unidimensional en la cual los grupos OH y CH₃ se asocian para la formación de capas hidrófilas e hidrófobas, respectivamente, variando únicamente la dirección de las capas formadas.⁴⁸ Por su parte, Miyata y col. asociaban las estructuras en bicapas como las más idóneas con huéspedes grandes mientras que las estructuras cruzadas las relacionaba

más comúnmente a huéspedes pequeños¹⁵. En definitiva, se observa que este comportamiento se ha invertido con la modificación realizada sobre la molécula de partida.

En la bibliografía se encuentra descrita una estructura para el derivado 3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colamida(CAM), con 2 moléculas de diisopropilmetanol como huésped¹⁰⁷, la cual es muy similar al complejo de inclusión aquí obtenido. Los huecos o canales hidrófobos que ocupaban anteriormente las dos moléculas de 2,4-dimetil-3-pentanol ahora son ocupados por una unidad de acetofenona y dos unidades adamantilo. La comparativa entre estas dos estructuras se muestra en la Figura 2.57 en la que se observa claramente que la longitud del canal hidrófobo no ha cambiado substancialmente, pero si lo ha hecho la altura del mismo, debido probablemente a la influencia de los grupos adamantilo.

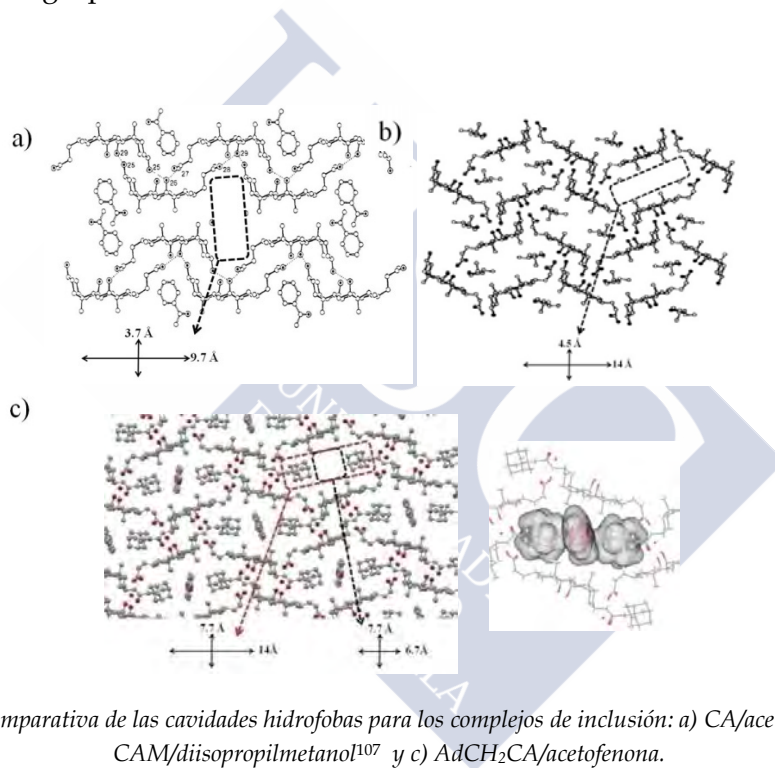


Fig. 2.57 comparativa de las cavidades hidrofobas para los complejos de inclusión: a) CA/acetofenona, b) CAM/diisopropilmetanol¹⁰⁷ y c) AdCH₂CA/acetofenona.

Al tener en cuenta los volúmenes moleculares, calculados a partir de las densidades en estado líquido a 20 °C y los radios de van der Waals ya indicados, se observa que el complejo CA/acetofenona alberga 2 moléculas de acetofenona 194(124) Å³/unidad, con una estructura en bicapas con interdigitación tipo α y la cadena lateral en conformación *gauche* o plegada. Para el complejo CAM/diisopropilmetanol la estructura es cruzada con una conformación de la cadena lateral más estirada y alberga también otras dos moléculas de huésped con un volumen molecular de 234 Å³/unidad. El cristal con acetofenona posee también una estructura y conformación similar al complejo anterior pero sólo alberga una molécula de huésped de volumen 194(124) Å³,

lo que no justificaría la transformación de la bicapa. Pero si consideramos el grupo adamantilo como un grupo hidrófobo alojado en esta región tendríamos un volumen molecular total de 421 \AA^3 (asociado a una unidad de acetofenona mas los dos grupos adamantilo), lo que podría explicar la pérdida de la estructura en bicapas con respecto al CA y la aproximación hacia la estructura del complejo con CAM (véase la figura anterior).

La red de enlaces de hidrógeno es un poco diferente a las vistas hasta el momento como se muestra en la Figura 2.58. Delimita las regiones hidrófobas, contribuyendo a la estabilidad estructural del complejo. En las regiones hidrófilas de la estructura cristalina las moléculas de sustrato se mantienen unidas mediante secuencias de enlaces de hidrógeno en las cuales participan moléculas de agua cerrando las redes cíclicas y formando parte de una red helicoidal de enlaces de hidrógeno. Mediante esta red de enlaces de hidrógeno una molécula de ácido biliar se interconecta con otras cuatro moléculas homólogas. Además el enlace amida también participa mediante los átomos O26 y N25-H en la secuencia cíclica de enlaces de hidrógeno de la red estructural.

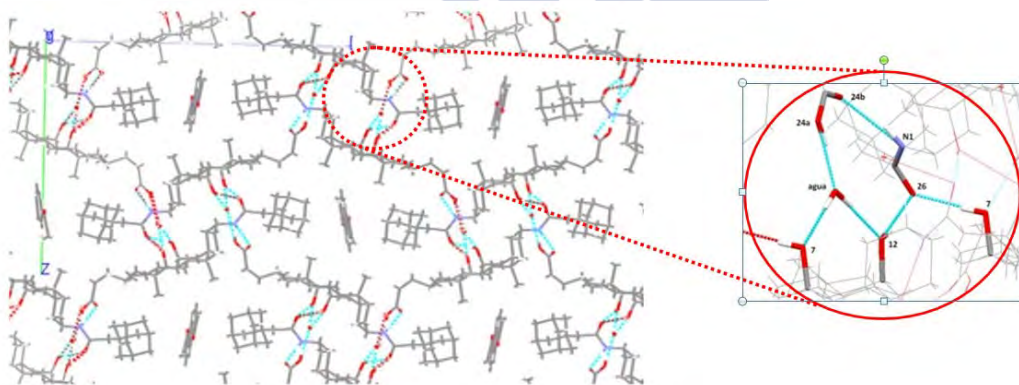


Fig. 2.58 Red y esquema de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar para el complejo de inclusión $AdCH_2CA$: Acetofenona.

La red de enlaces de hidrógeno (Figura 2.59) muestra diferencias significativas con las encontradas en la bibliografía hasta el momento, como podemos ver en la comparación que se recoge en la Figura 2.60.

Los datos referidos a las distancias y ángulos de enlaces de hidrógeno para el sistema $AdCH_2CA$:Acetofenona se resumen en la siguiente Tabla 2.24.

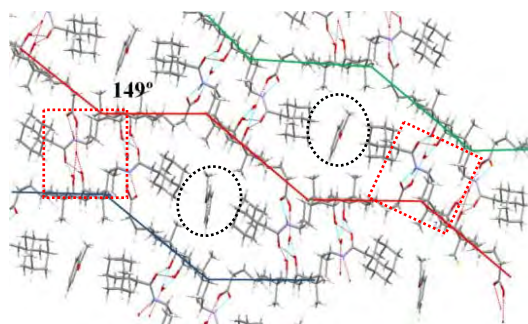


Fig. 2.61. Red de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar: a) AdCH₂CA:acetofenona.

La distancia entre moléculas consecutivas de acetofenona a lo largo del canal hidrófobo es de 8.20 Å, ligeramente superior al 8.09 Å para el CA y 7.25 Å para el DCA. También hay que destacar que *para nuestro compuesto los planos fenilo de las moléculas huésped son paralelos a la dirección de los canales al igual que sucedía con el DCA, alejándose del comportamiento del CA en el cual se disponían casi perpendiculares a la dirección de dichos canales.* Todo ello es indicativo de la variación que hemos realizado en la molécula de partida, el CA (Figura 2.62)⁴⁸.

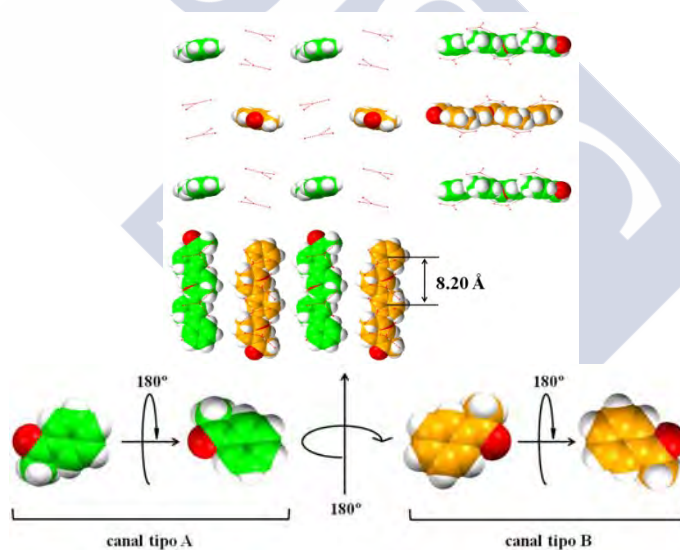


Fig. 2.62. Orientación de las moléculas de acetofenona en el interior de los canales hidrófobos sin las unidades biliares y operaciones de simetría que las relacionan.

2.3.2. NbCH₂CA

Síntesis del compuesto: [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(norbornano-2-acetil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico (NbCH₂CA).

Con perspectivas análogas, aunque también complementarias, a las del compuesto anterior, hemos sintetizado el compuesto [3β,5α,7α,12α]-3[(norbornano-2-acetil)-

amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico que denominaremos abreviadamente como NbCH₂CA. El compuesto (cuya fórmula estructural se recoge en la Figura 2.63) fue sintetizado, según se describe en la sección experimental, mediante la reacción de adición-eliminación entre el cloruro del ácido norbornano-2-acético y el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico. Debemos de destacar que el producto comercial de partida es en realidad una mezcla de diastereoisómeros del ácido 2-norbornanoacético por lo que el producto final obtenido ha sido una mezcla.

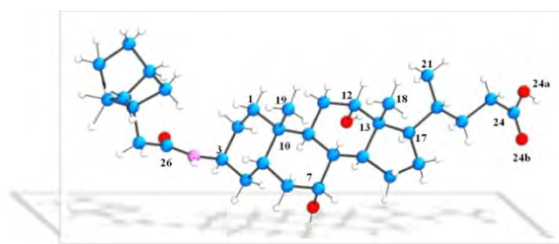


Fig. 2.63 Esquema y numeración de la molécula de NbCH₂CA.

Se han obtenido diferentes cristales, prismáticos e incoloros, que fueron estudiados mediante la técnica de difracción de Rayos X. Los datos fueron recogidos en un difractómetro Bruker X8 KappaAPEXII. El resumen de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 2.25. La mezcla fue recristalizada en su forma ácida. Se observa que en los cristales siempre aparecen varias especies de los diastereoisómeros.

Como se puede ver en la tabla, los complejos de inclusión obtenidos con acetona y DMSO dan lugar a sistemas ortorrómbicos (P2₁2₁2₁), mientras que con el 2-propanol, 2-butanol y 2-pentanol, el sistema es monoclinico (P2₁). Los dos primeros mantienen una estequiometría 1:1 mientras que con el 2-propanol es 1:2, con el 2-butanol se añade también una molécula de agua por lo que también puede considerarse como 1:2. Para el 2-pentanol la estequiometría y el cristal obtenido muestra una complejidad mayor que los casos anteriores.

La conformación del anillo D del núcleo esteroideo en términos del ángulo máximo de torsión, φ_{mv} , y el ángulo de fase de pseudorrotación, Δ , se recogen en la Tabla 2.26. Se puede observar que la conformación predominante es la de *media-silla*, la cual se asocia a menudo con complejos de inclusión del ácido desoxicólico con diferentes huéspedes¹¹²⁻¹¹⁴, ácido quenodesoxicólico⁵ y el isómero 3β,7β derivado del ácido ursodesoxicólico. Ya hemos visto que esta conformación es también común para los complejos AdCH₂CA: s.h., acetona, DMSO y acetofenona.

La conformación de la cadena lateral 17β está definida mediante sus ángulos de torsión, ψ_1 - ψ_4 , en la Tabla 2.27. Los valores de ψ_1 están de acuerdo con el rango

encontrado por Giglio y Quagliata¹²¹, autores que observaban una variación en un estrecho rango de unos 20° alrededor de -53° y -60° y que se correspondía con un mínimo en el perfil de energía para los ácidos colánicos. Así para el resto de ángulos de torsión los valores podrían ser de 60° y -170° para ψ_2 , 50°, 165° y -95° para ψ_3 y -120°/-60° para ψ_4 . Los valores experimentales resumidos en la tabla 2.26 muestran una coincidencia con los calculados a excepción de ψ_4 para el NbCH₂CA con los huéspedes 2-propanol y 2-butanol. Este efecto puede ser asociado al hecho de que la posición del grupo carboxílico está controlada por la formación de enlaces de hidrógeno.

Tabla 2.25 Datos cristalográficos para los complejos de NorCH₂CA en acetona, dmsó, 2-propanol, para el 2-pentanol encontramos dos unidades de derivado biliar ligeramente diferentes debido a que el ácido 2-Norbornanoacético de partida presentaba los dos enantiómeros.

Disolvente	Acetona/ Agua	DMSO	2-Propanol	2-butanol	2-pentanol
Fórmula empírica	C ₃₃ H ₅₃ NO ₅ · C ₃ H ₆ O	C ₃₃ H ₅₃ NO ₅ · C ₂ H ₆ OS	C ₃₃ H ₅₃ NO ₅ · 2(C ₃ H ₈ O)	C ₃₃ H ₅₃ NO ₅ · C ₄ H ₁₀ O·H ₂ O	2(C ₃₃ H ₅₃ NO ₅), C ₅ H ₁₂ O, 3(H ₂ O)
Estequiometría	1:1(acetona)	1:1(dmsó)	1:2(2-propanol)	1:1:1	2:1:3
Fórmula en peso	601.84	621.89	663.95	635.9	1229.71
Temperatura (K)	100 (2)	100(2)	100(2)	100(2)	100 (2)
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Monoclínico, P2 ₁	Monoclínico, P2 ₁	Monoclinico, P2 ₁
a (Å)	9.3879(2)	9.0591(2)	9.6279(3)	9.3405(5)	8.4246 (6)
b (Å)	17.7193(4)	18.4651(4)	18.1356(5)	17.8492(7)	18.1282 (11)
c (Å)	19.9442(4)	19.8385(3)	11.9009(3)	11.2776(5)	22.1016 (14)
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	113.526(2)	107.809 (2)	95.193 (3)
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Z, densidad calculada (g/cm³)	4, 1.205	4, 1.245	2,1.157	2,1.179	2, 1.215
Coefficiente de Absorción μ (mm⁻¹)	0.08	0.143	0.078	0.08	0.083
F(000)	1320	1360	732	700	13523
Tamaño cristal (mm³)	0.49×0.42×0.4	0.27×0.14×0.1	0.68×0.44×0.02	0.42×0.35×0.16	0.270×0.190×0.020
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	2.042-33.239	1.507-28.312	1.866-28.312	1.897-29.158	0.925-26.418
Intervalos de los índices	-12≤h≤14 -27≤k≤27 -30≤l≤30	-12≤h≤12 -21≤k≤24 -26≤l≤21	-12≤h≤12 -24≤k≤24 -15≤l≤15	-12≤h≤12 -24≤k≤24 -15≤l≤15	-10 ≤ h ≤ 10, -22 ≤ k ≤ 22, -27 ≤ l ≤ 26
Datos/restricciones/parámetros	12728/0/469	8268/147/479	9390/195/512	9423/160/502	13713/1016/1035
mejor ajuste en F²	1.016	1.014	1.020	1.044	0.958
índices R finales [I>2σ(I)]	R1=0.0419 wR2=0.0975	R1=0.0484 wR2=0.0861	R1=0.0548 wR2=0.1069	R1=0.0482 wR2=0.1167	R ₁ = 0.0756, wR ₂ = 0.1264
Índices R (todos los datos)	R1=0.0538 wR2=0.1029	R1=0.0727 wR2=0.0938	R1=0.0859 wR2=0.1179	R1=0.0613 wR2=0.1245	R ₁ = 0.1968, wR ₂ = 0.1735
Densidad diferencial máxima y mínima (Å⁻³)	0.293 y -0.217	0.247 y -0.295	0.351 y -0.367	0.450 y -0.227	0.296 and -0.318

Tabla 2.26 Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para los complejos de inclusión NbCH₂CA con acetona, DMSO y 2-propanol, debemos de destacar que en el cristal de 2-pentanol nos encontramos con dos unidades de ácido 2-norbornanoacetamida diferentes.

Ángulos de Torsión (°)	acetona/agua	DMSO	2-Propanol	2-butanol	2-pentanol
Δ (°)	0.84	13.86	11.01	13.02	14.51 18.89
φ_m	44.22	45.08	47.84	49.11	48.16 46.55
$\psi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15}$	44.22	44.75	47.62	48.79	47.78 45.92
$\psi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14}$	-35.02	-38.40	-40.39	-41.77	-41.45 -40.88
$\psi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13}$	14.11	19.10	19.37	20.70	20.82 21.85
$\psi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17}$	12.84	8.08	9.89	9.24	8.65 6.27
$\psi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16}$	-35.29	-32.67	-35.75	-36.09	-34.89 -32.94
Conformación del anillo D	media silla distorsionada	media silla distorsionada	media silla distorsionada	media silla distorsionada	Media silla distorsionada en ambos casos

Tabla 2.27 Principales ángulos de torsión y conformación de la cadena lateral considerando, *i**significa un intermedio entre la conformación *gauche*, "g" (60°, -60°) y *trans*, "t" (180°).

Ángulos de Torsión (°)	Acetona/agua	DMSO	2-Propanol	2-Butanol	2-Pentanol
$\Psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	-175.14	-175.30	176.60	176.73	-176.77 167.98
$\Psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	-179.32	-178.23	64.66	64.34	-169.16 62.10
$\Psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	-177.39	176.93	176.58	-176.53	173.51 173.74
$\Psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	135.58	140.47	-42.10	-42.05	62.36 -165.87
$\Psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-51.95	-51.40	-58.18	-58.13	-53.98 -65.98
Conformación de la cadena lateral	titi	titi	tgtg	tgtg	tttg/tgtt

La orientación de la cadena alquílica lateral con respecto al núcleo esteroideo puede ser visualizada mediante la distancia del grupo carboxílico (particularmente, su átomo de carbono C24) con respecto a los planos esteroideos, *h* y *v*, descritos anteriormente, y la distancia de los átomos C17 a C24, d_{17-24} . El valor del ángulo medio entre los planos

para los cinco cristales estudiados es de $88.2 \pm 0.6^\circ$, (Tabla 2.28) lo que está de acuerdo con los resultados anteriormente descritos para el AdCH₂CA.

Tabla 2.28 distancias y ángulos de enlace medidos para los diferentes compuestos de inclusión con NbCH₂CA.

Disolvente	acetona/agua	DMSO	2-propanol	2-butanol	2-pentanol
Ángulo h-v (°)	87.64	87.86	88.38	88.73	88.13 88.57
Distancia entre C24 y los planos h/v (Å)	-0.518/0.462	-0.614/0.430	-2.716/-0.403	-2.523/-1.069	0.806/0.318 2,271/0,718
D. Centroide hidrófobo planos h/v (Å)	1.143/2.213	1.285/2.463	-0.345/2.248	-1.281/2.865	0.293/2.700 0.335/1,509
d _{C17-C24} (Å)	5.05	5.04	4.47	4.41	4.98 4.53

Los valores de las coordenadas C24-*h* son negativas (lo que indica que el grupo carboxílico está orientado hacia la cara α de la molécula) excepto para el cristal con 2-pentanol. Se observan pequeñas variaciones tanto positivas como negativas para la coordenada C24-*v*. Finalmente, los valores de $d_{17-24} > 5 \text{ \AA}$, obtenidos en los cristales ortorrómbicos, indican que la cadena lateral está estirada, lo que coincide con sus conformaciones *ttti*. Sin embargo, para los complejos NbCH₂CA con 2-propanol y 2-butanol, se observa una reducción del 10% en estos valores ($d_{17-24} = 4.47$ y 4.41 \AA , respectivamente) que estarían en concordancia con una conformación de la cadena lateral tipo *gtg*, plegada. Los valores para las dos moléculas no simétricamente equivalentes del cristal de 2-pentanol, corresponden a las dos situaciones indicadas para los otros cristales, siendo este como una combinación de los otros vistos anteriormente. Las distancias entre el átomo de carbono carboxílico, C24, y los dos planos se muestra en la Figura 2.64. Los parámetros para los cristales con DMSO o acetona son casi idénticos.

El núcleo esteroideo y el grupo hidrófobo están localizados en la misma región del plano definido por el enlace amida de la cadena 3β . El plano horizontal del núcleo esteroideo forma un ángulo que varía entre $40-45^\circ$ con el plano del grupo amida. Las distancias entre el centroide del grupo hidrófobo norbornilo y los planos *h* y *v* se muestran en la Figura 2.64. Los centroides del grupo hidrófobo están localizados, con respecto al plano *h* de la molécula, en la cara β para la acetona y DMSO, y hacia la cara α en los cristales de los tres alcoholes. En todos los casos, el grupo carbonilo de la cadena lateral se encuentra en la cara α . Este comportamiento se observa claramente en la Figura 2.65, en la que las estructuras de los esteroides están dibujadas a lo largo del plano *h*.

En todos los cristales, el anillo A, el grupo metilo C19 y el sustituyente norbornilo forman una superficie cóncava en la que, *a priori*, podrían alojarse moléculas de

disolvente. Sin embargo, la conformación de la cadena y su longitud no deja el suficiente espacio para alojar las moléculas de disolvente o huésped. Las distancias entre el centroide del residuo norbornilo y el centroide del anillo A del núcleo esteroideo son muy similares para todos los complejos (6.07, 6.12, 6.53, 6.67 y 6.62 Å en acetona, DMSO, 2-propanol, 2-butanol, y 2-pentanol, respectivamente) lo que nos confirma este hecho. Consecuentemente, el enlace amida de esta cadena presenta una orientación que le permite formar un enlace de hidrógeno con las moléculas de huésped o disolvente, los cuales se localizan en el exterior de esta cavidad.

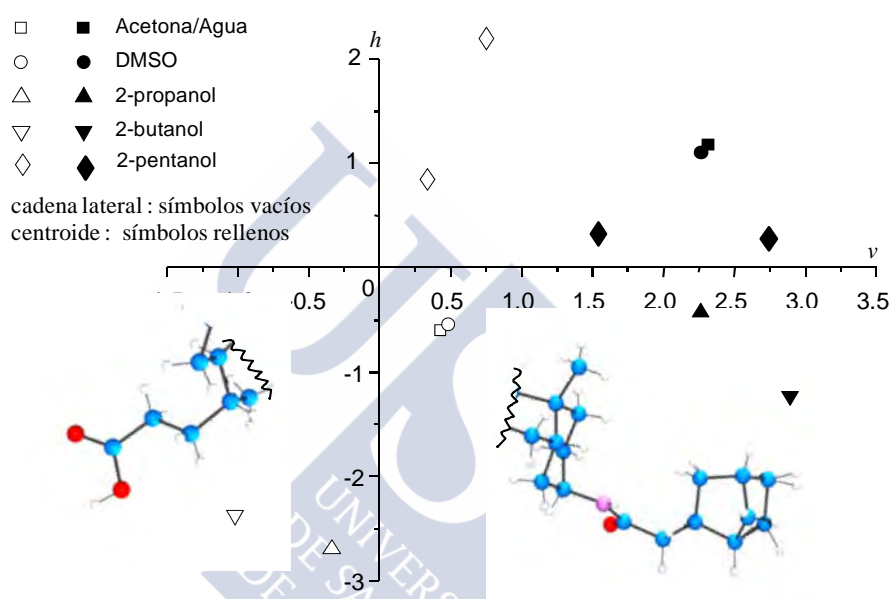


Fig. 2.64. Coordenadas del átomo carboxílico C24 y del centroide del grupo hidrófobo con respecto a los planos h y v .

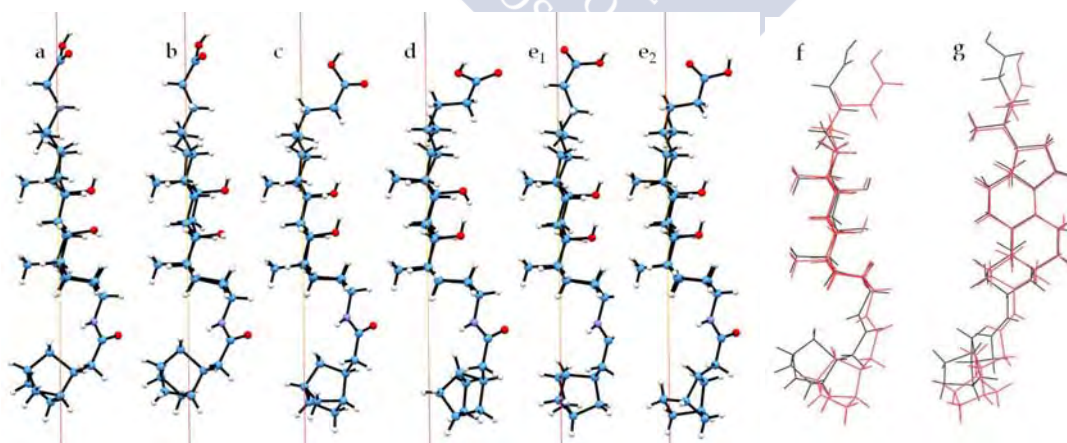


Fig. 2.65. Vista de $NbCH_2CA$ a lo largo del plano h . a) acetona; b) DMSO; c) 2-propanol; d) 2-butanol; e) 2-pentanol. Diagrama de superposición de $NbCH_2CA$ en DMSO (negro) y en 2-propanol (rojo) a lo largo de los planos h (f) y v (g).

Como ya se ha comentado en diversas ocasiones a lo largo del presente trabajo, es bastante común que el carácter anfifílico de este tipo de moléculas conduzca a la formación de cristales en los cuales se forman canales o láminas hidrófobas e hidrófilas^{122,123}. Para los complejos de inclusión con acetona y DMSO observamos que dos moléculas de huésped se alojan en el interior de los huecos o canales generados en las capas lipófilas e interaccionan mediante enlaces de hidrógeno con los grupos amida, carboxilo e hidroxilo. Las capas lipófilas se mantienen unidas mediante contactos de van der Waals débiles, mientras que los canales hidrófilos están formados por redes de enlaces de hidrógeno que se muestran en la Figura 2.66 (a) y en la cual participan cuatro moléculas de derivado de ácido biliar. Debemos mencionar la posición casi alineada de los grupos norbornilo en el seno de la región hidrófoba como indican las flechas en la Figura 2.66 (b).

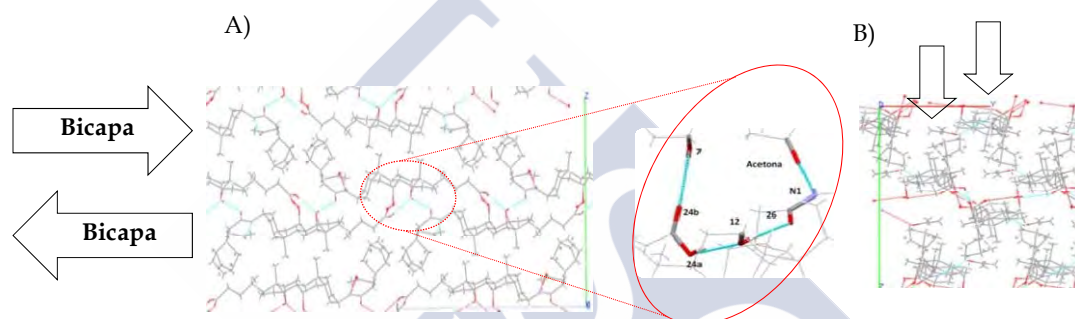
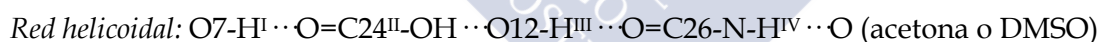


Fig. 2.66. Cristal NbCH₂CA/acetona a lo largo de los ejes a y c respectivamente, se indican las bicapas hidrófobas, la secuencia de enlaces de hidrógeno y la posición de los residuos norbornilo.

Cabe señalar que los complejos con acetona y DMSO tienen la misma disposición estructural y secuencia de enlaces de hidrógeno:



Los metilos de las posiciones C18 y C19 se encuentran situados muy próximos los unos de los otros dando lugar a una interdigitación tipo β . Evidentemente, los grupos carboxílicos e hidroxilos forman regiones hidrófilas estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno. El grosor de estas bicapas en el cristal, determinada mediante la distancia entre capas hidrófilas, es de 8.859 y 9.231 Å para la acetona y DMSO respectivamente. Estos valores se corresponden con la mitad del valor de la longitud de la celda unidad en la dirección *b*. Tanto la acetona como el DMSO forman enlaces de hidrógeno con el grupo amida N25-H^I⋯O(huésped) con una distancia de 2.061 y 2.930 Å, donante-aceptor, y un ángulo <DHA de 169 y 173°, respectivamente. Los dos grupos metilos del huésped interaccionan con las partes hidrófobas de (i) el anillo A y el residuo norbornilo que está cercado por dos moléculas, a lo largo del eje *a*, y (ii) con el grupo metilo C18 y la cadena lateral de una tercera molécula localizada en un plano intermedio entre las otras dos.

La red de enlaces de hidrógeno en el complejo con 2-propanol ha cambiado considerablemente con respecto a los dos casos anteriores, hecho que se puede observar claramente en la Figura 2.67. La secuencia de enlaces de hidrógeno es la siguiente:

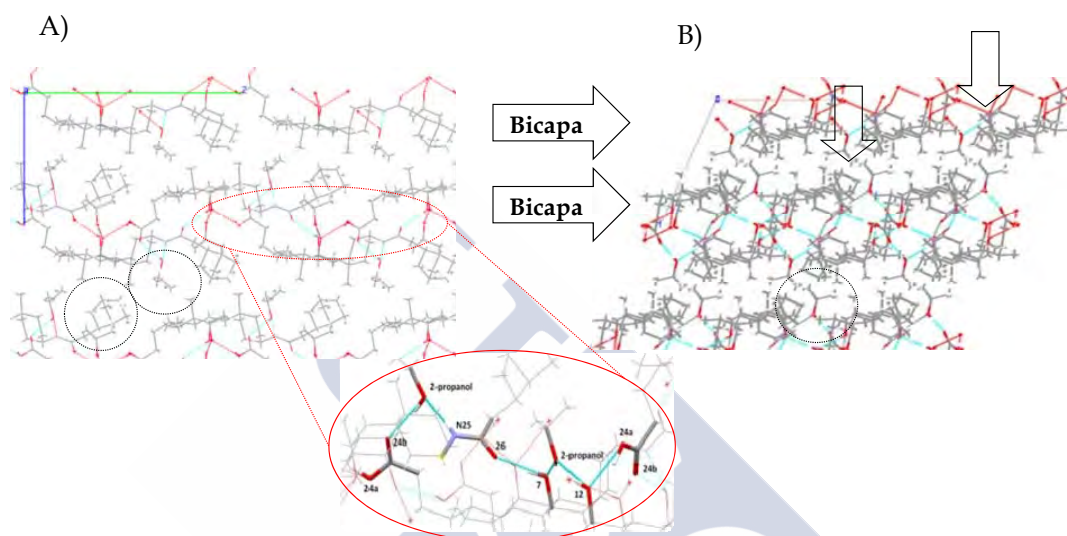
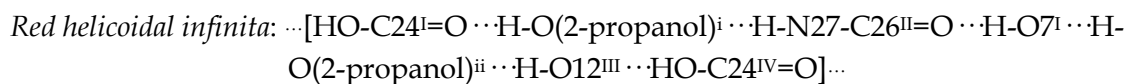


Fig. 2.67. Cristal $\text{NbCH}_2\text{CA}/2\text{-propanol}$ a lo largo de los ejes a y b respectivamente. Se indican las bicapas hidrófobas, la secuencia de enlace de hidrógeno, así como la posición de las moléculas de huésped y los residuos norbornilo.

La Figura 2.68, recoge la disposición de las moléculas de 2-butanol en la red cristalina, así como, la secuencia helicoidal de enlaces de hidrógeno que se extiende a lo largo de toda la estructura cristalina (Figura 2.69).

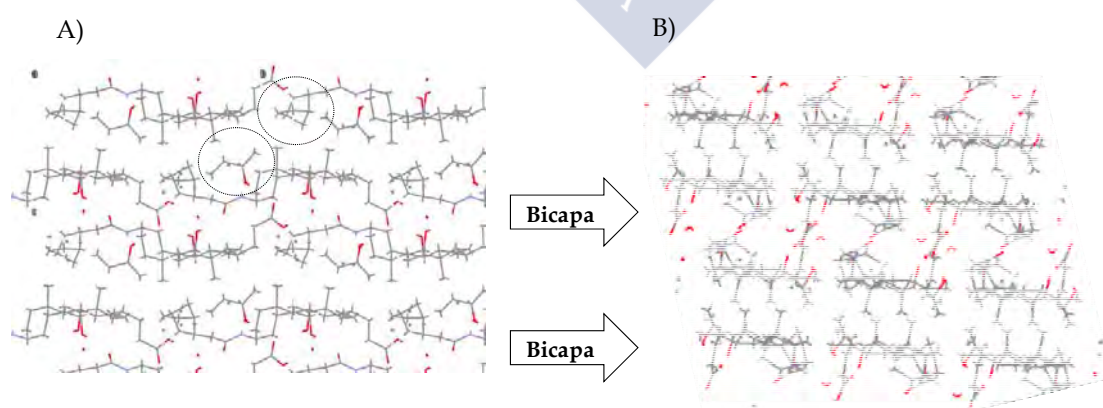


Fig. 2.68. Cristal $\text{NbCH}_2\text{CA}/2\text{-butanol}$ a lo largo de los ejes a y b respectivamente, se indican las bicapas hidrófobas, así como la posición de las moléculas de huésped y los residuos norbornilo.

La secuencia de enlaces de hidrógeno es similar a las ya comentadas para el compuesto AdCH₂CA, s.h. y en 2-butanol. Si bien hay que mencionar que en este caso la mimetización del 2-butanol a lo largo del eje cristalográfico *a* con los grupos metilos del núcleo esteroideo no es tan buena como era en aquel caso. Esto es debido en parte a que el norbornilo tiene un volumen menor que el adamantilo.

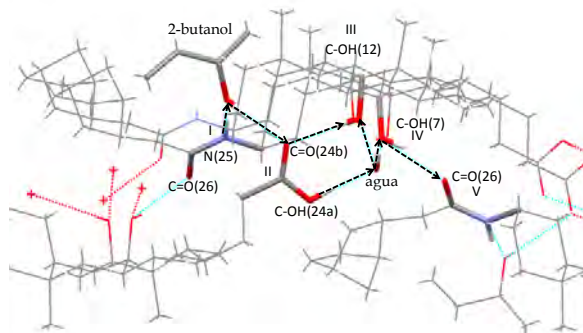


Fig. 2.69. Cristal NbCH₂CA/2-butanol secuencia de enlaces de hidrógeno de la red cristalina.

El empaquetamiento de los complejos NbCH₂CA:2-propanol y 2-butanol se muestran en la Figura 2.70.

Aunque es evidente la formación de una estructura laminar (con un grosor de 11.90 y 11.28 Å, igual a la longitud del eje *c* de la celda unidad), el empaquetamiento es claramente diferente a los dos anteriores. Se observa un ligero desplazamiento entre los grupos esteroides, lo que es bastante evidente al comparar las distancias entre los centroides de los residuos hidrófobos de dos moléculas antiparalelas. Los valores son 10.25 Å para NbCH₂CA:2-propanol, 11.75 Å para NbCH₂CA:2-butanol, 16.58 Å para el cristal en DMSO y 16.72 Å en acetona. La consecuencia de este desplazamiento es que se pierde la interdigitación de los grupos metilos al igual que veíamos con el compuesto sintetizado anteriormente⁸⁴.

La Figura 2.71 muestra la existencia de dobles bicapas implicando cada una de ellas moléculas con el mismo tipo de simetría, estando apiladas en una estructura tipo sandwich. La separación entre moléculas de simetría azul separadas por una bicapa de verdes (medida como distancia entre planos) es de 12.269 Å. Los planos horizontales de las moléculas verdes y azules forman entre sí ángulos de 9.1 °.

La Figura 2.72 muestra el entorno del S(+)-2-butanol en el cristal. Las moléculas de esteroide en azul se encuentran detrás del huésped (resaltada en *spacefill*) mientras que las dibujadas como *capped sticks*, con los átomos de carbono en negro, se encuentran delante del alcohol. El cristal está visto a lo largo del eje *a*. Puede observarse que los grupos alquilo del alcohol interactúan con las partes hidrófobas del NbCH₂CA como son sus grupos norbornilo, metilo y cara β en general y el anillo A del esteroide.

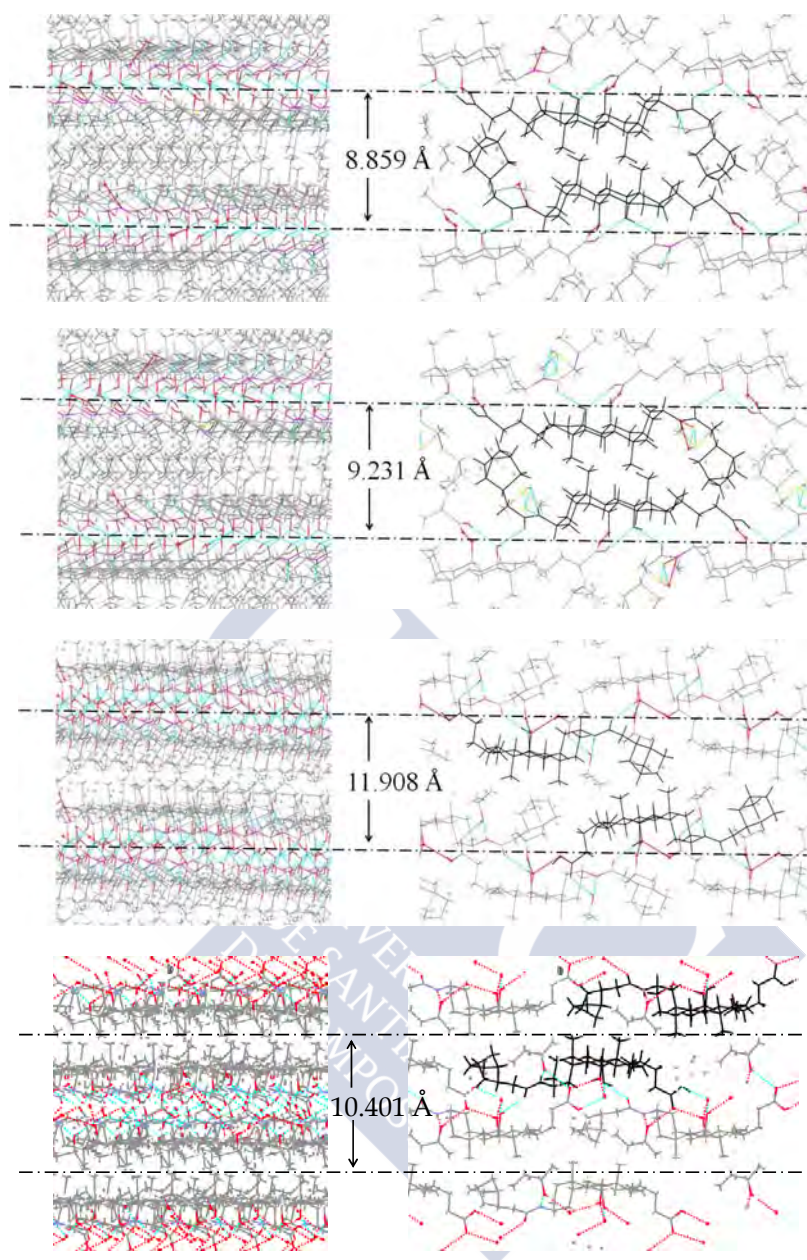


Figura 2.70. Empaquetamiento cristalino de NbCH_2CA en acetona; DMSO, 2-propanol y 2-butanol respectivamente. Se dibujan con líneas rojas y azules los enlaces de hidrógeno que interconectan las regiones hidrófilas de las estructuras laminares.

Es obvio que podríamos llevar a cabo un análisis similar, incluidas las figuras correspondientes, con la ubicación del *R*-(-)-2-butanol con su diastereoisómero del NbCH_2CA . Tal análisis no aportaría nada significativo respecto a lo ya comentado y con el fin de no ser repetitivos queremos simplemente hacer constancia que su existencia y la facilidad de su visualización mediante, por ejemplo, el programa Olex2.

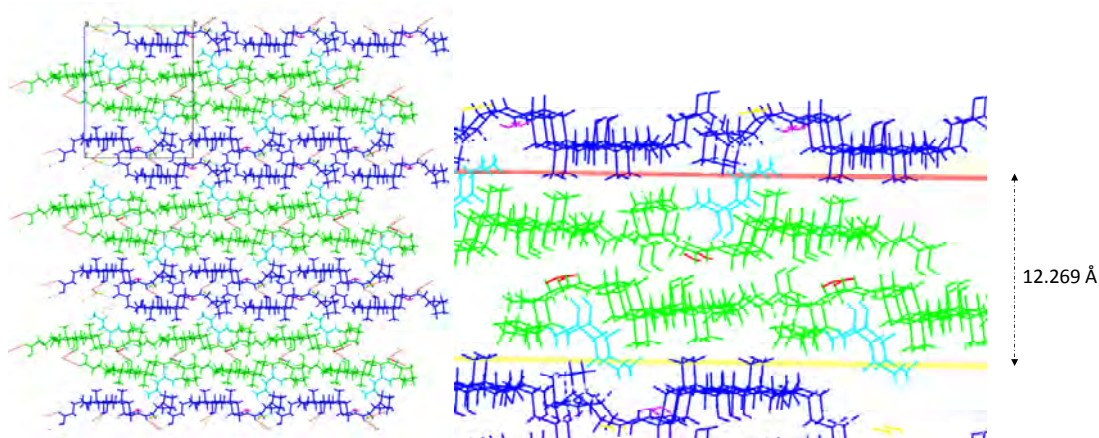


Figura 2.71. Empaquetamiento cristalino de NbCH₂CA en 2-pentanol

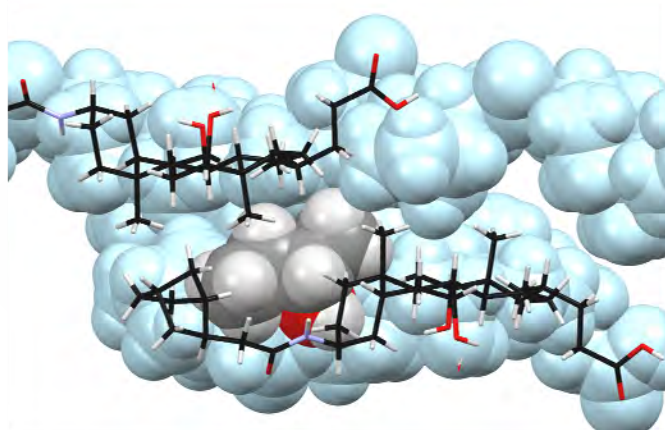


Figura 2.72. Ubicación del S-(+)-2-butanol en su cristal con NbCH₂CA

Análogamente, la Figura 2.73 muestra el entorno del R-(-)-2-pentanol en el cristal. De nuevo, las moléculas de esteroide dibujadas en *spacefill* se encuentran ubicadas detrás lateralmente en relación con la molécula del huésped (resaltada en *spacefill* y colores habituales de los elementos) mientras que las dibujadas como *capped sticks*, con los átomos de carbono en negro, se encuentran delante del alcohol. El cristal está visto a lo largo del eje *a*. Como en el caso anterior, puede observarse que los grupos alquilo del huésped interactúan con las partes hidrófobas del NbCH₂CA, particularmente con el anillo A del esteroide. En este caso, se observa que el grupo propilo se proyecta hacia la concavidad del esteroide (moléculas en azul) definido por el anillo A, el grupo hidrófobo norbornilo y puente de unión entre ambos. El otro extremo de la molécula hace lo propio respecto a la concavidad de las moléculas de esteroide con la otra simetría (moléculas dibujadas en verde).

En la Figura 2.48, y párrafos adyacentes, mostramos la forma y el volumen por molécula de diversos huéspedes, entre los que se incluyen los estudiados: con este derivado NbCH₂CA. Añadamos que la molécula de NbCH₂CA tiene un volumen

medio de 585 \AA^3 , calculado con el procedimiento que allí se indicó. Esto significa una reducción del 3% con respecto a la molécula de AdCH_2CA . Los complejos no presentaron moléculas de agua ocluidas en la red cristalina como ocurría para el AdCH_2CA , a excepción del complejo con 2-butanol.

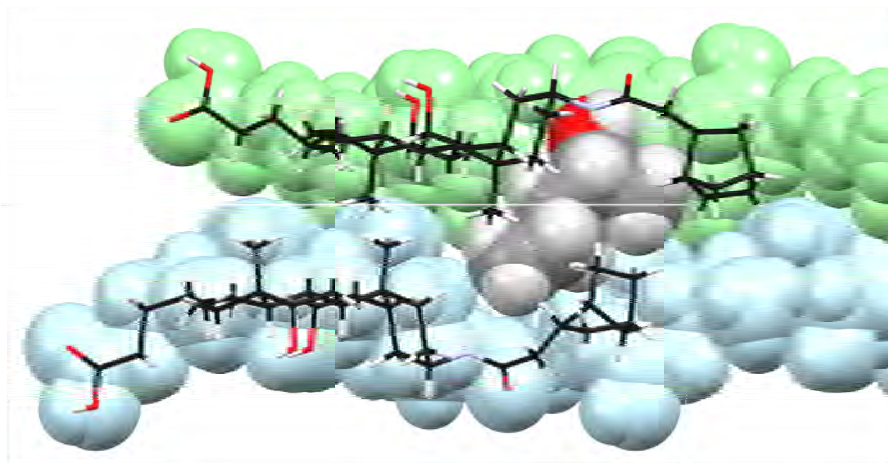


Figura 2.73. Ubicación del R-(-)-2-pentanol en su cristal con NbCH_2CA , verde molécula con cadena lateral *trans*, azul molécula con cadena lateral *gauche*.

Atendiendo al estudio ya mencionado por Miyata y col.⁸⁷ y al tener en cuenta los datos obtenidos para los complejos con AdCH_2CA : α -*trans* (agua) bicapas < *s.i.-gauche* (acetona y DMSO) bicapas < β -*gauche* (2-butanol) bicapas < *s.i.-trans* (acetofenona) cruzada, vemos que en este caso el orden de volúmenes de las cavidades son *s.i.-gauche* (2-propanol) bicapas < β -*trans* (acetona y DMSO) bicapas < *s.i.-gauche* (2-butanol) < paralela α -*gauche-trans* (2-pentanol). En el cristal con 2-pentanol se ha encontrado que existe una mezcla de moléculas de derivado biliar en posición *trans* y *gauche*, con una orientación paralela tipo α .

Mediante el program PLATON v 1.15 se realizaron los cálculos correspondientes a la celda unidad para estudiar los posibles huecos existentes que pueden alojar diferente tipo de moléculas, para ello definimos los mismos radios de van der Waals ya citados anteriormente y se realiza una búsqueda, en la red cristalina, de huecos en los cuales se pueden incorporar esferas cuyo radio es de 0.7 \AA , observando también los índices de empaquetamiento de los cristales. Los resultados obtenidos para los diferentes complejos se describen en la Tabla 2.29.

En este caso se observa que el volumen molecular es muy similar para los huéspedes implicados, a excepción del 2-butanol que aumenta al incorporar también una molécula de agua en la unidad cristalina y en el caso del 2-pentanol en el que participa una molécula de huésped y tres de agua. El factor de empaquetamiento se encuentra en el intervalo de los coeficientes de empaquetamiento para cristales de

inclusión y huéspedes encapsulados, 55-75 %, dados por Miyata *y col.*⁸⁷ para los huéspedes, presentándose el radio de 1.2Å como el que daba mejores resultados.

Tabla 2.29 [a] Volumen molecular calculado con los radios de Van der Waals para los huéspedes presentes en las cavidades mediante el programa Accelrys DS Visualizer v 2.0.1. [b] volumen de la cavidad en la celda unidad calculada con un radio de prueba de 0.7 Å y 1.2 Å respectivamente, [c] coeficiente de empaquetamiento calculado como $PC = (\text{vol. molécula } r.v.w)/(\text{vol. cavidad calculada}) \cdot 100^{87}$, [d] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculado sin los huéspedes presentes y [e] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculados con el PLATON.

	Volumen molecular ^[a] [Å ³]	Vol. cavidad ^[b] (Å ³)	PC cavidad ^[c] [%]	índice empaquetamiento huecos ^[d] [%]	índice de empaquetamiento cristal ^[e] [%]
2-butanol/Agua	93	272/190	34/48	58	68.6
2-propanol	70	176/122	40/58	54	67.1
acetona	68	202/101	34/67	62	71.7
DMSO	76	202/107	38/71	62	71.0
2-pentanol/agua	142	352/265	40/54	64	69.7

Si tenemos en cuenta las diferencias en volumen por molécula para los cuatro huéspedes DMSO, acetona, 2-propanol, 2-butanol y 2-pentanol (91Å³), se observa que estos son bastante similares y relativamente pequeños. Es por ello el comportamiento distinto del 2-propanol, 2-butanol y 2-pentanol, sea debido en gran medida a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, ya que en el caso de estos huéspedes el grupo hidroxilo puede ser un grupo donador o aceptor de enlaces de hidrógeno, situación que no sucede en caso de la acetona o DMSO, que son exclusivamente aceptores. Si la acetona o DMSO fueran substituidos por el 2-propanol en sus cristales correspondientes, el alcohol podría actuar solamente como aceptor de enlaces de hidrógeno del grupo amida, ya que sin otro grupo hidroxilo o carboxílico en las proximidades la molécula de 2-propanol no podría ejercer su papel de donador en los enlaces de hidrógeno y se perdería la estabilidad de la estructura cristalina.

Consecuentemente pequeños cambios en el empaquetamiento cristalino permitiría y facilitaría este doble papel asignado al grupo hidroxilo del 2-propanol. La celda unitaria del complejo NbCH₂CA/2-propanol es asimétrica y posee dos molécula de alcohol, una de ellas está unida mediante enlace de hidrógeno al grupo N25-H de la amida actuando como aceptor y simultáneamente, también actúa como donador con el grupo O24b con una molécula de ácido biliar de una capa vecina. La interacción entre estas dos moléculas está reforzada por la formación del enlace de hidrógeno O7-H··O26a, (véase la Tabla 2.30).

Sin embargo, esta situación conduce a la pérdida de interdigitación de los grupos metilos. La interacción hidrófoba entre los grupos metilos interdigitados es substituida por las interacciones entre los grupos metilo y el residuo norbornilo de la molécula, con los grupos metilo de la molécula de 2-propanol. Este hecho se puede confirmar si

observamos las distancias entre los grupos metilos interdigitados en los complejos con DMSO y acetona, 4.1 Å, y las observadas para el cristal en 2-propanol.

Tabla 2.30. Distancias y ángulos de enlace de hidrógeno en los complejos de inclusión del NbCH₂CA con acetona, DMSO y 2-propanol.

Huésped	D---H··A	D··A	D-H··A
Acetona	O7---H··O24b	2.862(16)	156(2)
	O24a---H··O12	2.658(15)	163(2)
	O12---H··O26	2.714(15)	173(2)
	N25---H··O(acetona)	2.961(2)	170(19)
DMSO	O7---H··O24b	2.833 (3)	163 (3)
	O24a---H··O12	2.631 (3)	166 (3)
	O12---H··O26	2.732 (3)	167 (3)
	N25---H··O(DMSO)	2.937 (3)	168 (3)
2-propanol	O7---H··O26	2.687(3)	162.7
	O24a---H··O12	2.651(3)	170(3)
	O12---H··O(2-propanol) ⁱ	2.746(3)	166.7
	N25---H··O(2-propanol) ⁱⁱ	2.877(4)	172(3)
	O(2-propanol) ⁱⁱ ---H··O24b	2.741(3)	173.9
	O(2-propanol) ⁱ ---H··O7	2.782(3)	173.9
2-butanol	O24a---H··O(agua) ⁱ	2.546(3)	176(3)
	O7---H··O26 ⁱⁱ	2.726(2)	160
	O12---H··O24b ⁱⁱⁱ	2.894(3)	168.1
	N25---H··O(2-butanol) ^{iv}	3.004(3)	163(3)
	O(2-butanol) ⁱⁱ ---H··O24b	2.935(3)	171.5
	O(agua)---H··O7 ^{iv}	2.734(3)	174(4)
	O(agua)---H··O12	2.756(3)	156(3)

La Tabla 2.31 recoge las distancias y ángulos de los enlaces de hidrógeno en los complejos de inclusión del NbCH₂CA con 2-pentanol, para cada una de las dos moléculas simétricamente no equivalentes de la célula unidad, debiendo destacar que no existen interacciones a través de estos enlaces entre las moléculas no equivalentes. Ambas moléculas están interconectadas a otras cuatro moléculas del esteroide.

En los cristales de NbCH₂CA/DMSO o acetona, todas las moléculas de esteroide establecen cuatro enlaces de hidrógeno diferentes. Las longitudes y ángulos para estos enlaces se muestran en la Tabla 2.30, todos los valores se encuentran en el ámbito de las interacciones de enlaces de hidrógeno. La Figura 2.74 ilustra el patrón seguido por este tipo de enlaces. Es notorio que cuatro moléculas de esteroide se interconectan a otras cuatro, dos de ellas doblemente enlazadas (con los enlaces de hidrógeno O(12)H-O(26) y O(24a)H-O(12)). La molécula central de ácido biliar es aceptora de enlaces de hidrógeno de una de ellas y donante de la otras, los grupos O(24a) y O(26) son siempre donantes y aceptores, respectivamente. Las otras dos moléculas de ácido biliar están

conectadas a la central a través del enlace O(7)-H··O(24b). Esta red de enlaces de hidrógeno interconecta los grupos hidrófilos de la estructura laminar, como ya habíamos visto en otras ocasiones.

Tabla 2.31. Distancias y ángulos de enlace de hidrógeno en los complejos de inclusión del NbCH₂CA con 2-pentanol.

Huésped	D---H··A	D··A	D-H··A
Molécula simetría I (verde - trans)	(amida) N---H··O pentanol	2.988	160
	pentanolO-H··agua i	2.836	160
	Amida C=O··agua ii	2.786	140
	O12---H··agua iii	2.780	148
	C24=O··agua iv	2.743	164
	O7-H··O=C amida molécula i	2.788	114
	O12···H-OOC molécula ii	2.573	168
	O7-H··O=C amida molécula iii	2.788	166
	COO-H··O12 molécula iv	2.573	168
Molécula simetría II (azul - gauche)	Amida C=O··agua i	2.983	136
	Amida C=O··agua ii	2.808	172
	O12---H··agua iii	2.785	138
	C24=O··agua iv	2.898	154
	Amida C=O··H-O7 molécula i	2.801	151
	O7-H··O=C amida molécula ii	2.801	151
	O12···H-OOC molécula iii	2.694	155
	COO-H··O12 molécula iv	2.694	155

La red de enlaces de hidrógeno del cristal NbCH₂CA:2-propanol es diferente debido a la capacidad del huésped para comportarse como aceptor y donante en los enlaces de hidrógeno, lo cual conduce a un empaquetamiento un tanto diverso. En la red cristalina se presentan dos moléculas de 2-propanol con diferente simetría, mediando en cuatro enlaces de hidrógeno diferentes como se ha podido apreciar en la tabla anterior. Participa como aceptor para el enlace amida y el grupo hidroxilo en C12 y como donador con el grupo carboxilo O24b y el hidroxilo O7H.

La red de enlaces de hidrógeno del cristal con 2-butanol/agua es diferente, debido a la incorporación a la red de las moléculas de agua que intervienen dándole estabilidad a la red cristalina, se produce pues una red de enlaces diferente incluso que a la que se obtenían para el compuesto AdCH₂CA, en este caso el 2-butanol forma enlaces con el grupo amida, y el grupo ácido terminal del esteroide, mientras el agua también se enlaza con el grupo ácido y alcoholes de los núcleos esteroides, sin embargo no se enlaza con el 2-butanol como ocurría en el cristal con AdCH₂CA.

La red de enlaces de hidrógeno del cristal con 2-pentanol/agua es bastante diferente a las vistas hasta el momento, debido a que existen dos moléculas de derivado biliar con disposición espacial diferenciada, con la cadena lateral estirada y

plegada, lo que le confiere características particulares al cristal, se observa que el 2-pentanol forma enlaces con el grupo amida de la molécula que estaba en disposición *trans* y con moléculas de agua, mientras que no interacciona con la molécula que presenta la cadena lateral en disposición *gauche*, véase la Tabla 2.31, mientras que las moléculas de agua se presentan interaccionando con los grupos hidroxilo, ácido, amida, 2-pentanol, por lo que en este cristal se encuentran comportamientos similares al cristal con 2-butanol/agua y con el cristal con AdCH₂CA.

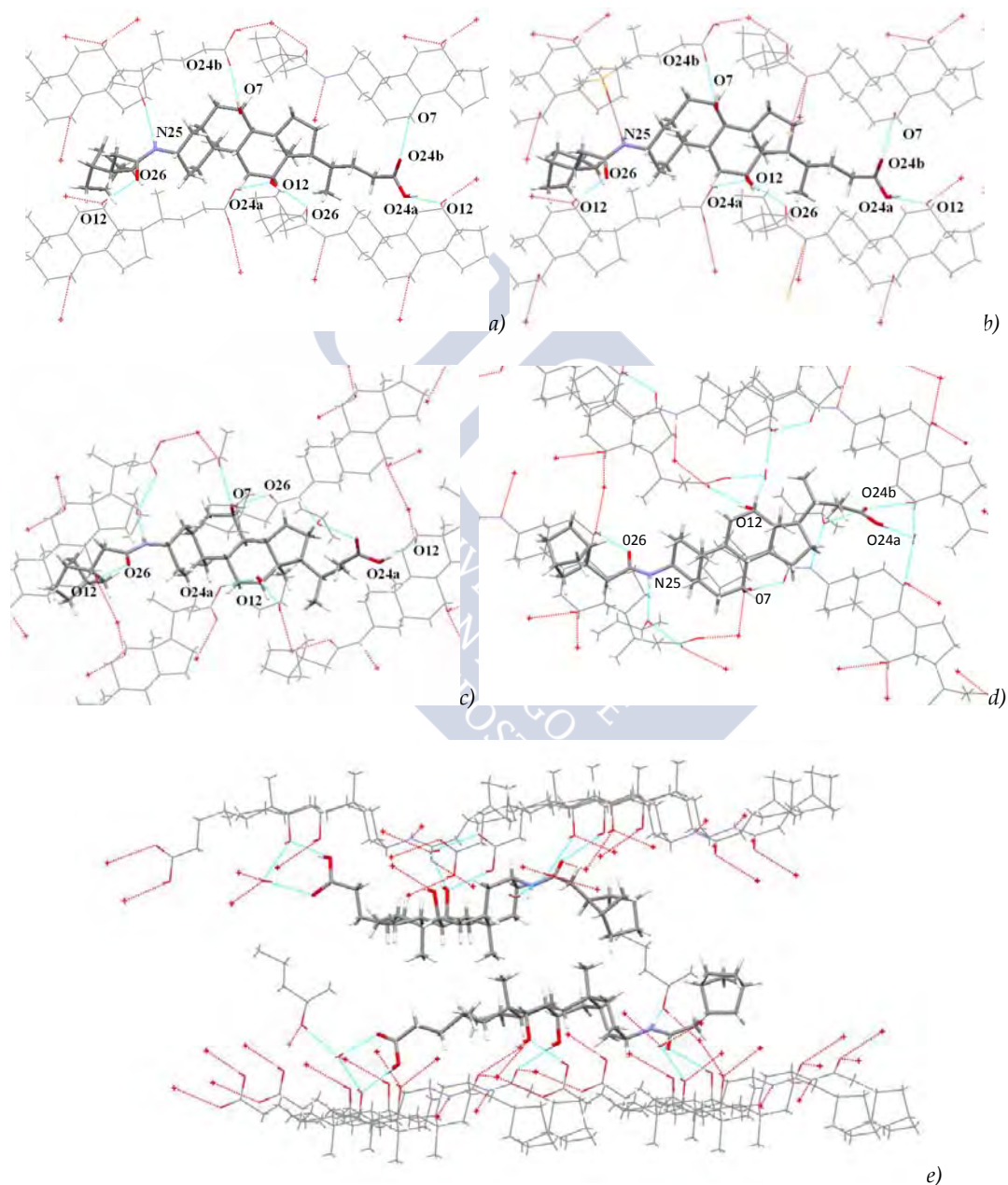


Fig. 2.74 Red de enlaces de hidrógeno en el que participan 5 moléculas de ácido biliar para todos los complejos de inclusión obtenidos: (a) acetona, (b) DMSO, (c) 2-propanol y (d) 2-butanol/agua, (e) 2-pentanol/agua.

De los cristales obtenidos, observamos la aparición de tres especies diferentes del que sería nuestro derivado biliar. Así observamos que en para 2-propanol y DMSO sólo obtenemos uno de los compuestos, por lo que podríamos decir que estos disolventes son selectivos con respecto a dicha configuración como se puede observar en la Figura 2.75. Por otra parte, existen disolventes como Acetona/Agua y 2-butanol en donde aparecen dos especies en el mismo cristal, mientras que una tercera nos aparecía en los cristales con 2-pentanol.

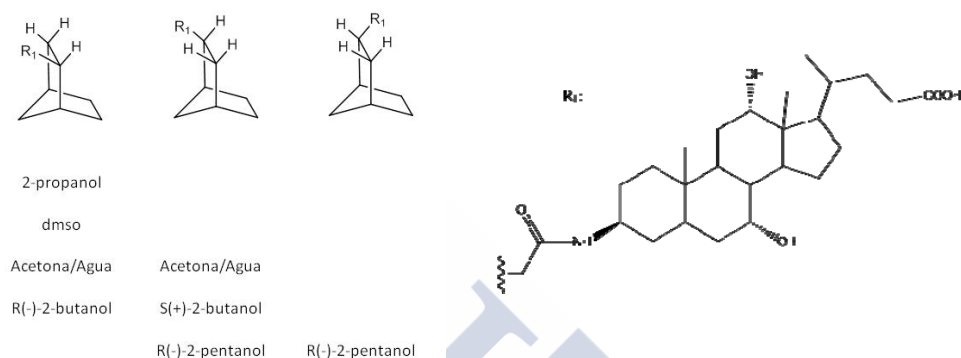


Fig. 2.75 - 3 especies de diferentes de NbAcCA encontrados y los disolventes en los que fueron resueltos.

Se podría separar la primera especie mediante la recristalización en 2-propanol y DMSO. La segunda de las especies podría ser purificada, del crudo no cristalizado en la primera, mediante el empleo de 2-pentanol y luego 2-butanol, pudiendo así separar las tres especies mediante la cristalización en una secuenciación escalonada de diferentes disolventes.

2.3.3 AdCH₂CH₂CA

Síntesis del compuesto: [3 β , 5 α , 7 α , 12 α]-3[3-((adamantano-1-propil)-amino)-7-12-dihidroxicolan-24-oico (AdCH₂CH₂CA).

Se ha sintetizado el compuesto [3 β , 5 β , 7 α , 12 α]-3(adamantano-1-propil)-amino-7-12-dihidroxicolan-24-oico que denominaremos de forma abreviada como AdCH₂H₂CA. El compuesto (cuya fórmula estructural se recoge en la Figura 2.76) fue sintetizado, según se describe en la sección experimental, del presente capítulo, mediante la reacción de adición-eliminación entre el cloruro del ácido adamantano-1-propiónico y el éster de metilo del ácido 3- β -amino-cólico.

Los cristales obtenidos, prismáticos e incoloros, fueron resueltos mediante difracción de Rayos X. Los datos fueron recogidos en un difractorómetro Bruker X8 KappaAPEXII. La Tabla 2.32 muestra un resumen de los datos obtenidos.

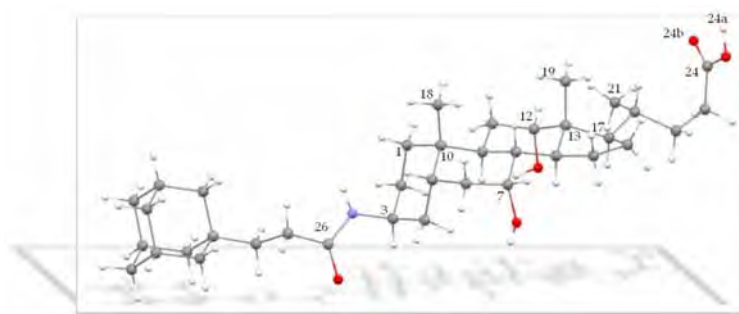


Fig. 2.76 Esquema y numeración para la molécula de AdCH₂CH₂CA.

Tabla 2.32. Datos cristalográficos para los complejos de AdCH₂CH₂CA en Cloroforno, 2-propanol, THF y dioxano.

Disolvente	Cloroforno	2-Propanol	THF	Dioxano
Fórmula empírica	C ₃₇ H ₅₉ NO ₅ ·CHCl ₃ ·H ₂ O	C ₃₇ H ₅₉ NO ₅ ·2(H ₂ O)	C ₃₇ H ₅₉ NO ₅ ·C ₄ H ₈ O·H ₂ O	C ₃₇ H ₅₉ NO ₅ ·C ₄ H ₈ O ₂ ·H ₂ O
Estequiometría	1:1:1	1:2 sin 2-propanol	1:1:1	1:1:1
Fórmula en peso	735.24	633.88	687.97	703.97
Temperatura (K)	100	100	100	100
Longitud de onda (Å)	0.7107	0.7107	0.7107	0.7107
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	7.779 (2)	8.5159 (5)	8.4840 (6)	8.4903 (3)
b (Å)	18.650 (5)	17.8905 (9)	19.2644 (10)	19.4127 (9)
c (Å)	25.958 (6)	22.2895 (12)	23.2353 (13)	23.5282 (11)
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
Z, densidad calculada (g/cm³)	4, 1.297	4, 1.24	4, 1.203	4, 1.206
Coefficiente de Absorción (mm⁻¹)	0.29	0.08	0.08	0.08
F(000)	1584	1392	1512	1544
Tamaño cristal (mm³)	0.65×0.05×0.04	0.66×0.25×0.24	0.57×0.18×0.17	0.48×0.23×0.12
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	1.6-20.8	1.5-26.4	1.4-26.4	1.4-25.4
Intervalos de los índices	-7≤h≤7 0≤k≤18 0≤l≤25	-10≤h≤10 0≤k≤22 0≤l≤27	-10≤h≤10 0≤k≤24 0≤l≤29	-10≤h≤10 0≤k≤23 0≤l≤28
Datos/restricciones/parámetros mejor ajuste en F²	2275/0/448	3919/162/495	4372/90/509	58032/426/572
índices R finales [I>2σ(I)]	R1=0.073 wR2=0.185	R1=0.038 wR2=0.063	R1=0.053 wR2=0.144	R1=0.036 wR2=0.081
Diferencia de densidad máxima y mínima (Å⁻³)	0.39 y -0.47	0.21 y -0.27	0.55 y -0.59	0.15 y -0.17

La Tabla 2.33 recoge los valores para la conformación del anillo D del núcleo esteroideo, en términos del ángulo máximo de torsión, φ_m, y el ángulo de fase de

pseudorotación, Δ^{46} . Los valores obtenidos no presentan diferencias significativas, predominando la conformación entre media silla y sobre. En la bibliografía podemos ver que es común para los complejos de inclusión del ácido cólico (CA) con diferentes alcoholes^{45,51} así como del DCA con o-xileno^{64,115}, ácido salicílico¹¹⁵ o también para el ácido ursodesoxicólico con algunos alcoholes entre otros.^{45,51} Para el cloroformo se ha encontrado una conformación próxima a *sobre* siendo el primer caso que hemos encontrado hasta el momento para los cristales obtenidos en los compuestos estudiados en esta Tesis.

Tabla 2.33 Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el $AdCH_2CH_2CA$ con los siguientes huéspedes, cloroformo, agua, THF y dioxano.

Disolvente	Cloroformo	2-propanol (s.h.)	THF	Dioxano
Ángulos de Torsión (°)				
Δ (°)	29.56	13.83	18.47	18.46
φ_m	48.37	47.56	49.82	49.85
$\psi_0 \Xi C17-C13-C14-C15$	46.77	47.21	49.17	49.20
$\psi_1 \Xi C16-C17-C13-C14$	-43.25	-40.31	-43.05	-43.19
$\psi_2 \Xi C15-C16-C17-C13$	25.85	20.28	23.04	23.14
$\psi_3 \Xi C14-C15-C16-C17$	1.74	8.3	6.76	6.81
$\psi_4 \Xi C13-C14-C15-C16$	-29.38	-34.66	-34.72	-34.91
Conformación del anillo D	Sobre	Intermedio entre Media-Silla y Sobre		

Los valores experimentales obtenidos para los ángulos de torsión (Ψ_1 - Ψ_4) que definen la conformación de la cadena lateral se resumen en la Tabla 2.34. En algunos casos, la cadena lateral no se encontraba bien definida en cuanto que se nos presentan dos posibles posiciones dentro del cristal, por lo que se muestra en paréntesis los valores correspondientes a la otra localización.

Tabla 2.34 Ángulos de Torsión para la cadena lateral en complejos de inclusión del $AdCH_2CH_2CA$ con cloroformo, 2-propanol, THF y dioxano. ⁱ conformación intermedia entre *gauche*(60°, -60°) y *trans*(180°), ⁱⁱ () posibles localizaciones de la cadena lateral.

Disolvente	Cloroformo	2-propanol	THF	dioxano
Ángulos de Torsión (°)				
$\Psi_1 \Xi C13-C17-C20-C22$	179.35	-174.58 (168.57)	-173.99	-175.04
$\Psi_2 \Xi C17-C20-C22-C23$	175.12	-170.24 (58.11)	-167.06	-170.91
$\Psi_3 \Xi C20-C22-C23-C24$	48.99	172.73 (-179.34)	70.95	68.57
$\Psi_4 \Xi C22-C23-C24-O24a$ (OH)	69.78	55.37 (179.91)	177.10	-179.11
$\Psi_5 \Xi C13-C17-C20-C21$	-55.45	-51.37 (-63.35)	-51.63	-52.81
distancia C17-C24 (Å)	4.44	4.974 (4.470)	4.467	4.489
Conformación de la cadena lateral	tti*g	tttg (tggt)	tti*t	ttgt
	sin interdig.	interdig. α	sin interdig.	sin interdig.

Al comparar los valores obtenidos para los ángulos de torsión correspondientes con los mínimos en los perfiles de energía para ácidos colánicos, se observa que la variación de Ψ_5 está en concordancia con los valores encontrados por Giglio y Quagliata, -53°/-60°, para Ψ_2 los valores también se encuentran próximos a 60°/-170°,

a excepción del cristal en cloroformo que toma un valor positivo próximo a 170°. Para Ψ_3 y Ψ_4 se observan diferencias significativas para todos los compuestos con respecto a las regiones más favorables descritas por los autores anteriormente citados, 50, 165 y -95 para Ψ_3 ; 60°/140° y -120°/-60° para Ψ_4 , la única excepción encontrada es el caso del cloroformo y 2-propanol en el cual se ha encontrado valores próximos a los bibliográficos, 50° y 173° para Ψ_3 .

Los dos planos vertical y horizontal del esteroide, definidos como ya hemos indicado, son casi perpendiculares ya que el valor del ángulo medio interplanar para los cuatro cristales estudiados ha sido de 88.2±0.4°, valor que está de acuerdo con los obtenidos para el AdCH₂CA, ácido ursodesoxicólico, quenodesoxicólico y sus epímeros⁵. La proyección se toma en la dirección cola (posición C24)-cabeza (posición C3), considerando la cara β de la molécula en sentido positivo respecto al plano horizontal (Figura 2.77). La Tabla 2.35 resumen los datos experimentales obtenidos para las diferentes distancias y ángulos.

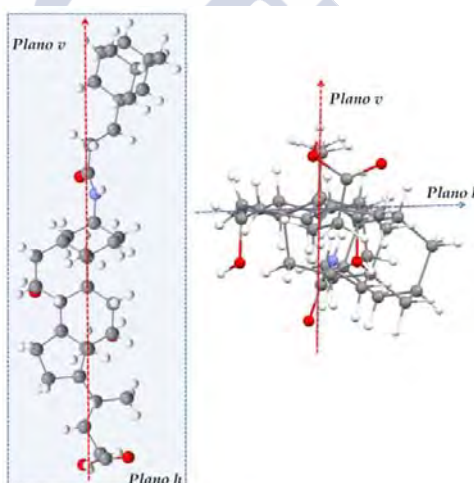


Fig. 2.77 Perspectivas para la molécula AdCH₂CH₂CA según los planos h y v definidos.

Tabla 2.35 Distancias y ángulos de enlace medidos para los diferentes compuestos de inclusión con AdCH₂CH₂CA. Los valores entre paréntesis tienen en cuenta otra posición relativa de algún átomo.

Disolvente	Cloroformo	2-propanol	THF	dioxano
Ángulos h-v (°)	87.8	88.50 (87.8)	88.40	88.45
Distancia C24 a h/v (Å)	0.964/-0.843	-1.297(-1.434) /-0.169	0.598/-0.315	0.716/-0.066
D. Centroide hidrofóbo a h/v (Å)	-1.792/- 2.070	1.046(1.116)/2.558	-1.959/4.997	-1.815(-1.642) / 4.712 (4.378)
Distancia C17-C24 (Å)	4.440	4.974	4.467	4.489
Ángulo plano h y plano amida (°)	68.84	31.52(32.26)	61.90	62.39
Interdigitación/ conformación de la cadena lateral considerando Ψ_2	s.i / t	α / t(g)	s.i. /t	s.i. / t

La Figura 2.78 representa las distancias obtenidas con respecto a los ejes formados por la intersección de los planos h y v.

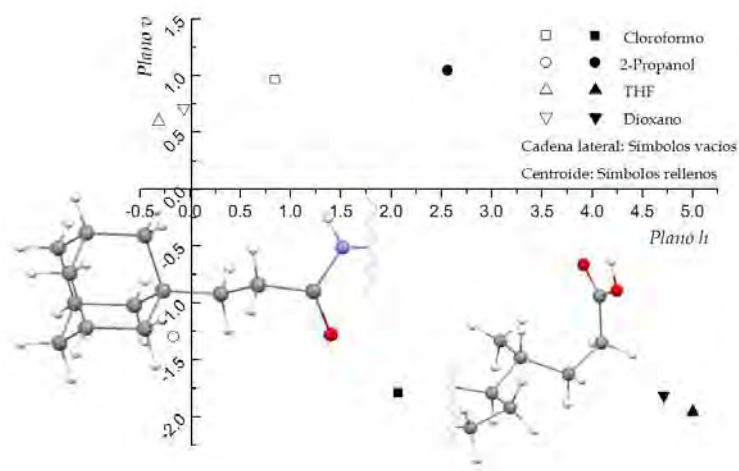


Fig. 2.78. Proyección de los centroides hidrófobos y el C24 sobre el plano perpendicular a los planos h , v definidos para los diferentes complejos de inclusión obtenidos para $\text{AdCH}_2\text{CH}_2\text{CA}$.

El plano horizontal del núcleo esteroideo forma un ángulo con el plano del enlace amida que va desde 30° en el caso del cristal s.h. (comportamiento ya observado en el AdCH_2CA) hasta valores próximos a 60° en el caso de los demás cristales (como sucedía en el caso de la acetofenona/ AdCH_2CA) La Tabla 2.35 también muestra las distancias del centroide del grupo adamantilo con respecto a los planos h y v . Se observa que para la mayoría de los cristales estudiados este grupo se encuentra orientado por encima del plano horizontal hacia la región hidrófoba de la molécula, a excepción del complejo sin huésped y en 2-propanol, en los cuales la posición del centroide se sitúa por debajo de este plano, es decir, hacia la región hidrófila (Figura 2.78). El comportamiento es similar al del AdCH_2CA .

Para los complejos con huésped se observa que la cadena lateral presenta una conformación tipo *trans* o estirada, mientras que en el cristal sin huésped puede ser tipo *trans* o *gauche*. Los valores de d_{17-24} , próximos a 4.45 \AA , para los cristales con THF y dioxano, están en concordancia con una conformación de la cadena lateral *ttgt* y *tti*g* para el Cloroformo. Sin embargo, en el complejo sin huésped hay un aumento de casi un 10% de la distancia situándose en 4.97 \AA , lo que indica que en una de sus configuraciones la cadena lateral está casi completamente estirada. Estas características se evidencian claramente en la Figura 2.79.

En el cristal sin huéspedes se observa la formación de una cavidad cóncava en la cual se podrían alojar las moléculas de los huéspedes. Esta cavidad está constituida por el anillo A del núcleo esteroideo, el grupo metilo C19, el enlace amida y el grupo adamantilo. La conformación de la cadena y su longitud permiten que, con determinados huéspedes de carácter apolar, se cree el espacio suficiente para que esto ocurra. La distancia entre los centroides del grupo hidrófobo y el anillo A así lo

confirman, siendo 7.84, 6.43, 6.84 y 6.84 Å para los complejos con cloroformo, s.h., THF y dioxano, respectivamente.

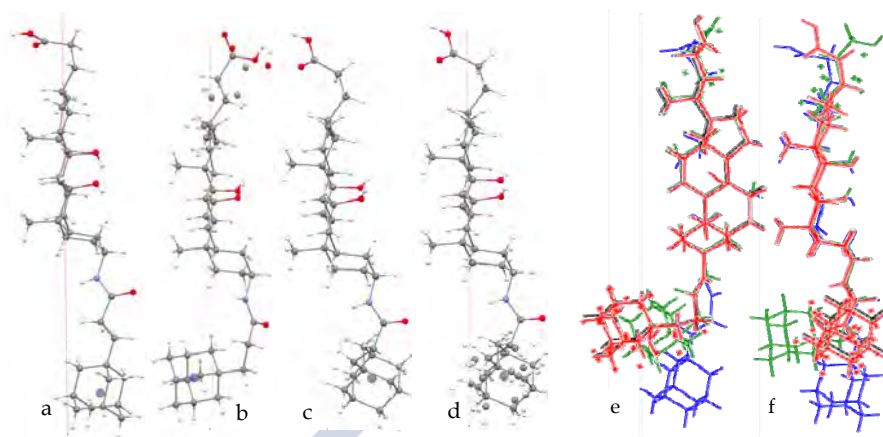


Fig. 2.79. Vista del AdCH₂CH₂CA a lo largo del plano h. a) cloroformo, b) 2-propanol(s.h.), c) THF, d) dioxano, e y f) diagramas de superposición del AdCH₂CH₂CA en cloroformo (azul), s.h. (verde), THF (negro), dioxano(rojo).

El empaquetamiento del AdCH₂CH₂CA para el cristal sin huéspedes se muestra en la Figura 2.80 a lo largo del eje c. En ella se observan claramente la disposición en bicapas de la estructura cristalina en regiones hidrófilas e hidrófobas. Las caras β están orientadas hacia la misma zona facilitando así las interacciones de tipo hidrófobo. En todos estos casos las moléculas presentan una orientación antiparalela (cabeza-cola). Esta conformación según Miyata *et al.*⁵⁵ es más típica de cristales de ácido desoxicólico que suelen presentar este tipo de disposición, mientras que los cristales de ácido cólico suelen presentar disposiciones cola-cola. Este comportamiento es similar al visto hasta el momento para las moléculas modificadas analizadas con anterioridad.

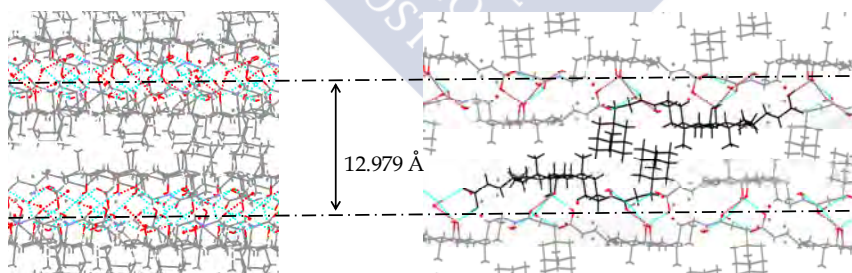


Fig. 2.80 Empaquetamiento del cristal Ad CH₂CH₂CA en (a) 2-propanol. Red de enlaces de hidrógeno que unen las regiones hidrófobas de las estructuras laminares dibujadas como líneas negras.

Los grupos carboxílicos e hidroxílicos de la molécula forman la región hidrófila estabilizando la estructura mediante enlaces de hidrógeno. El ancho de la bicapa en los cristales se puede observar en la Figura 2.79, calculada como la distancia entre capas hidrófilas obteniendo un valor de 12.979 Å para los cristales sin huésped, valor que se corresponde con la mitad de la longitud de la celda unidad en la dirección c.

En la Figura 2.81 podemos observar y comparar la forma y volumen por molécula de los huéspedes estudiados: agua, 17(30) Å³; cloroformo, 75(134) Å³; THF, 103(135) Å³; dioxano, 91(142) Å³, valores calculados teniendo en cuenta los siguientes radios de van der Waals H: 1.20Å, C: 1.70Å, N: 1.65Å, O:1.60Å, Cl:1.75 Å y S:1.81 Å (entre paréntesis se indican los valores calculados a partir de sus densidades en estado líquido a 25 °C). La molécula de AdCH₂CH₂CA tendría un volumen medio así calculado de 588 Å³. Como ya hemos visto con los compuestos anteriores Miyata *y col.*⁸⁷ realizaron un estudio sistemático de las estructuras cristalinas de complejos de inclusión de ácido cólico con bencenos monosustituidos, haciendo un estudio del tamaño y la forma de las cavidades. En nuestro caso el orden de volúmenes seguiría la siguiente secuencia: *α-trans* (sin huésped) bicapas < sin interdigitación-*trans* (cloroformo, dioxano y THF) cruzada.

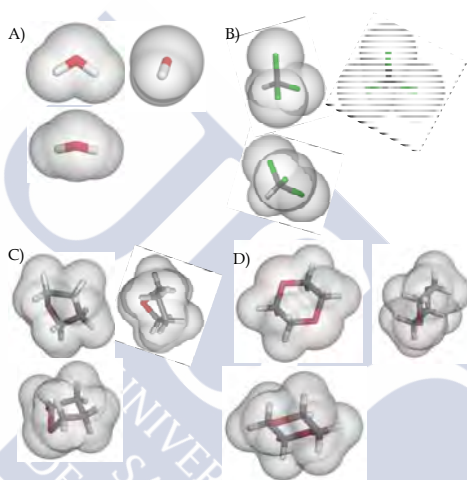


Fig. 2.81 Volúmenes moleculares en alzado, planta y perfil de las diferentes moléculas ocluidas teniendo en cuenta los radios de Van der Waals: a) agua, b) cloroformo, c) THF, d) dioxano.

Mediante el program PLATON v 1.15 se realizaron los cálculos correspondientes a la celda unidad para estudiar los posibles huecos existentes que pueden alojar diferentes tipos de moléculas. El procedimiento seguido ha sido el mismo que en los casos ya descritos. De este modo, se realiza una búsqueda en la red cristalina de huecos en los cuales se puedan incorporar esferas cuyo radio es de 0.7Å, observando también los índices de empaquetamiento de los cristales. Los resultados obtenidos para los diferentes complejos se describen en la Tabla 2.36.

El volumen de la cavidad va en orden creciente en relación con el tamaño del huésped. El factor de empaquetamiento se encuentra en el intervalo de los coeficientes de empaquetamiento para cristales de inclusión y huéspedes encapsulados (55-75 %) dados por Miyata *y col.*⁸⁷

Tabla 2.36 [a] Volumen molecular calculado con los radios de Van der Waals para los huéspedes presentes en las cavidades mediante el programa Accelrys DS Visualizer v 2.0.1. [b] volumen de la cavidad en la celda unidad calculada con un radio de prueba de 0.7 Å y 1.2 Å respectivamente, [c] coeficiente de empaquetamiento⁸⁷, [d] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculado sin los huéspedes presentes y [e] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculados con el PLATON.

	Volumen molecular ^[a] [Å ³]	Vol. cavidad ^[b] (Å ³)	PC cavidad ^[c] [%]	índice empaquetamiento huecos ^[d] [%]	índice de empaquetamiento cristal ^[e] [%]
Agua	42	449/--	9/--	--	69
Cloroformo	94	450/320	21/29	61	69
THF	96	452/320	21/30	62	69
Dioxano	106	485/340	22/31	60	69

Al estudiar las redes de enlaces de hidrógeno podemos observar que en los cristales s.h. dos moléculas de agua participan en la red, mientras que cuando se produce una redistribución de la estructura de la red en bicapas hacia una estructura cruzada, en esta participa una única molécula.

Existe la misma red cíclica en el cristal sin huésped que la encontrada para los cristales de AdCH₂CA s.h. y con 2-butanol (Figura 2.82). Para todos los complejos obtenidos cada molécula de esteroide se relaciona con otras cuatro vecinas mediante enlaces de hidrógeno, así como con las moléculas de agua o los diferentes huéspedes. Las longitudes y ángulos de enlaces para los diferentes enlaces de hidrógeno se resumen en la Tabla 2.37.

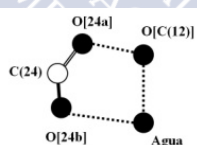


Fig. 2.82 Red cíclica de enlaces de hidrógeno para complejo AdCH₂CH₂CA: s.h.

Todos los valores se corresponden con los habituales para interacciones de enlace de hidrógeno. Toda esta red de enlaces de hidrógeno interconecta los grupos hidrófilos de la estructura laminar como se mostraba anteriormente.

La distribución molecular de las unidades de ácido biliar en la red cristalina se muestra en la Figura 2.83, en la cual se detalla la interacción de una molécula de ácido biliar con sus cuatro moléculas vecinas.

Tabla 2.37 Enlaces de hidrógeno para las diferentes estructuras cristalinas de AdCH₂CH₂CA obtenidas.

Huésped	Donante--H...Aceptor	D...A	< DHA (°)
s.h.	O(7) --H(7) ..O(agua2)	2.799(3)	150(2)
	O(agua1) --H(A)...O(agua2)	2.858(3)	168(2)
	O(agua2) --H(A) ..O(26)	2.857(2)	175(2)
	O(agua2) --H(B) ..O(24b)	2.706(3)	167(2)
	O(7) --H(7) ..O(26)	2.807 (2)	161(2)
	O(24a) --H(24a) ..O(12)	2.622(3)	155
	N(25) --H(25) ..O(agua1)	3.007(2)	163
Cloroformo	O(agua) --H(B) ..O(7)	2.888(11)	166(10)
	O(agua) --H(A) ..O(12)	2.813(11)	158(15)
	O(7) --H(7) ..O(26)	2.826 (11)	147
	O(12) --H(12) ..O(26)	2.714(11)	166
	O(24a) --H(24a) ..O(agua)	2.596(11)	173(11)
	N(25) --H(25) ..O(24b)	2.861(12)	130
THF	O(agua) --H(A) ..O(7)	2.738(4)	173(4)
	O(agua) --H(B) ..O(12)	2.940(4)	166(4)
	O(7) --H(7) ..O(26)	2.723 (3)	179 (6)
	O(12) --H(12) ..O(26)	2.752(3)	159 (4)
	O(24a) --H(24a) ..O(agua)	2.608(4)	170(4)
	N(25) --H(25) ..O(24b)	2.919(4)	174(4)
Dioxano	O(agua) --H(A) ..O(7)	2.755(2)	161(3)
	O(agua) --H(B) ..O(12)	2.725(2)	175(3)
	O(7) --H(7) ..O(26)	2.725 (2)	175 (3)
	O(12) --H(12) ..O(26)	2.755(2)	161 (3)
	O(24a) --H(24a) ..O(agua)	2.602(2)	168(2)
	N(25) --H(25) ..O(24b)	2.920(2)	170(2)

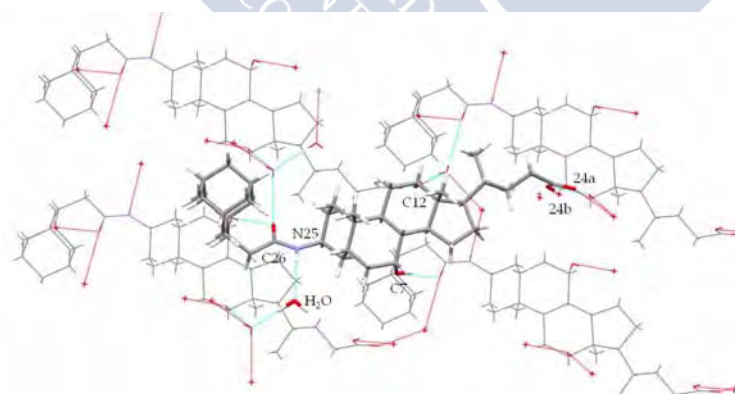


Fig. 2.83 Red de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar: a) AdCH₂CA:acetona, b) AdCH₂CA:DMSO, c) AdCH₂CA:s.h., d) AdCH₂CA:2-butanol y e) AdCH₂CA:isopentanol.

Los complejos de inclusión de AdCH₂CH₂CA con cloroformo, THF y dioxano (Figura 2.84) presentan *estructuras cruzadas* que difieren en bastantes aspectos de las

estructuras en bicapas vistas hasta el momento, incluso para los complejos de inclusión de los ácidos cólico, desoxicólico (DCA) y apocólico (ACA) con acetofenona.

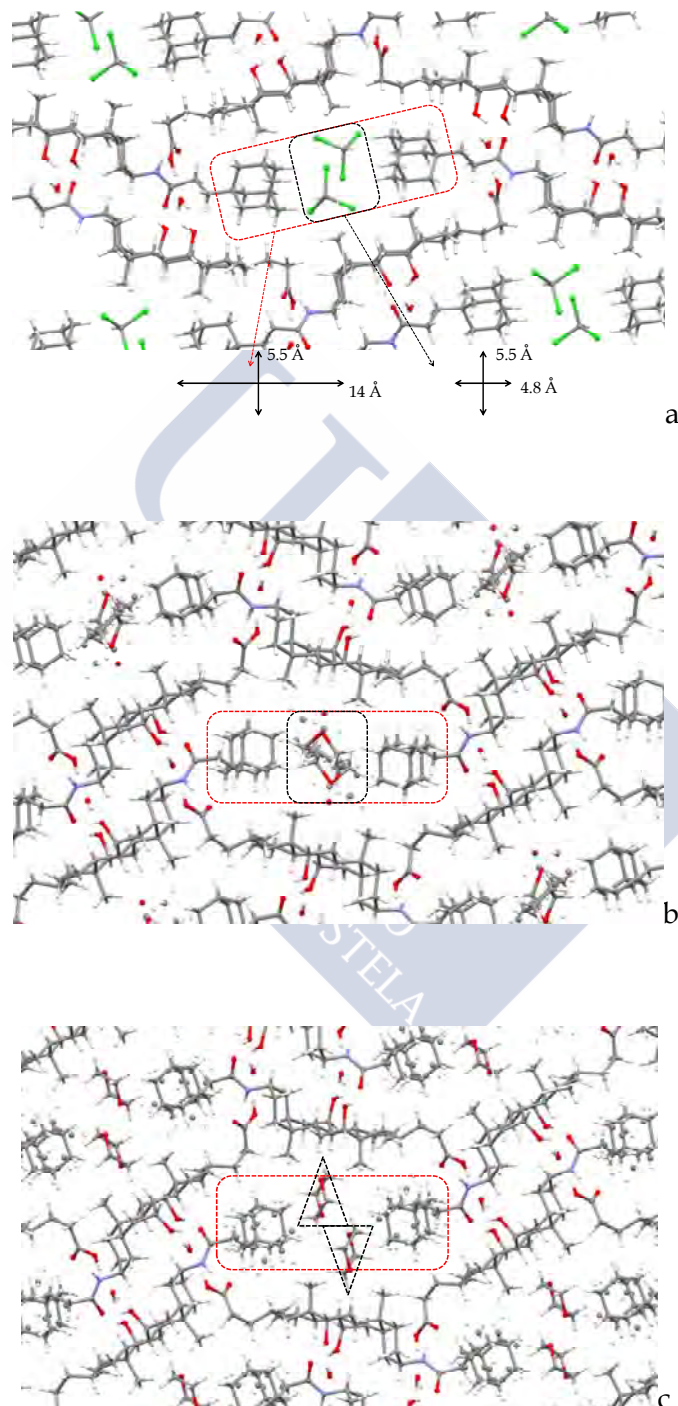


Fig. 2.84 Cavidad hidrófoba para los complejos de inclusión: $AdCH_2CH_2CA$ con a) cloroformo, b) THF y c) dioxano.

Habíamos visto un comportamiento similar para el cristal AdCH₂CA/acetofenona. Observamos, en este caso, que en los huecos hidrófobos generados se ubican dos moléculas de huésped.

El volumen de las dos moléculas de cloroformo, THF y dioxano, no alcanza para justificar la transformación de la bicapa en una estructura cruzada. Ahora bien, si consideramos el grupo adamantilo como un grupo hidrófobo alojado en esta región (aun cuando está unido covalentemente al núcleo esteroide) tendríamos un volumen molecular mayor que nos permitiría explicar la pérdida de la estructura en bicapas con respecto al CA y la aproximación hacia la estructura del complejo con CAM al igual que habíamos hecho anteriormente.

Para el caso del dioxano, debido a que su volumen es ligeramente superior al del THF y cloroformo, este se introduce en la región hidrófoba del cuerpo esteroide, como se muestra en la Figura 2.84 c.

En las regiones hidrófilas de la estructura cristalina las moléculas de sustrato se mantienen unidas mediante secuencias de enlaces de hidrógeno. En ellas participan moléculas de agua, cerrando las redes cíclicas y formando parte de una red helicoidal infinita de enlaces de hidrógeno (Figura 2.85), al igual que habíamos visto para el AdCH₂CA:Acetofenona. Mediante esta red de enlaces de hidrógeno cada molécula de ácido biliar se interconecta con otras cuatro moléculas homólogas. Además el enlace amida también participa mediante los átomos O26 y N25-H en la secuencia cíclica de enlaces de hidrógeno de la red estructural.

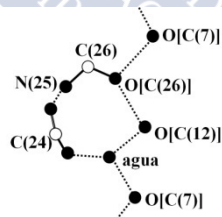


Fig. 2.85 Esquema de la red de enlaces de hidrógeno para los complejos de inclusión: a) AdCH₂CA/acetofenona y AdCH₂CH₂CA/cloroformo/dioxano/THF.

La disposición espacial de las moléculas de ácido biliar y de huésped origina cavidades hidrófobas en la red cristalina a la que contribuyen seis unidades esteroideas y que se pueden ver en la Figura 2.86, representadas por los círculos punteados. Los ángulos formados por los planos de los núcleos esteroideos de la estructura cruzada son de 153° en el caso del diclorometano, 142° para el THF y 141° para el dioxano.

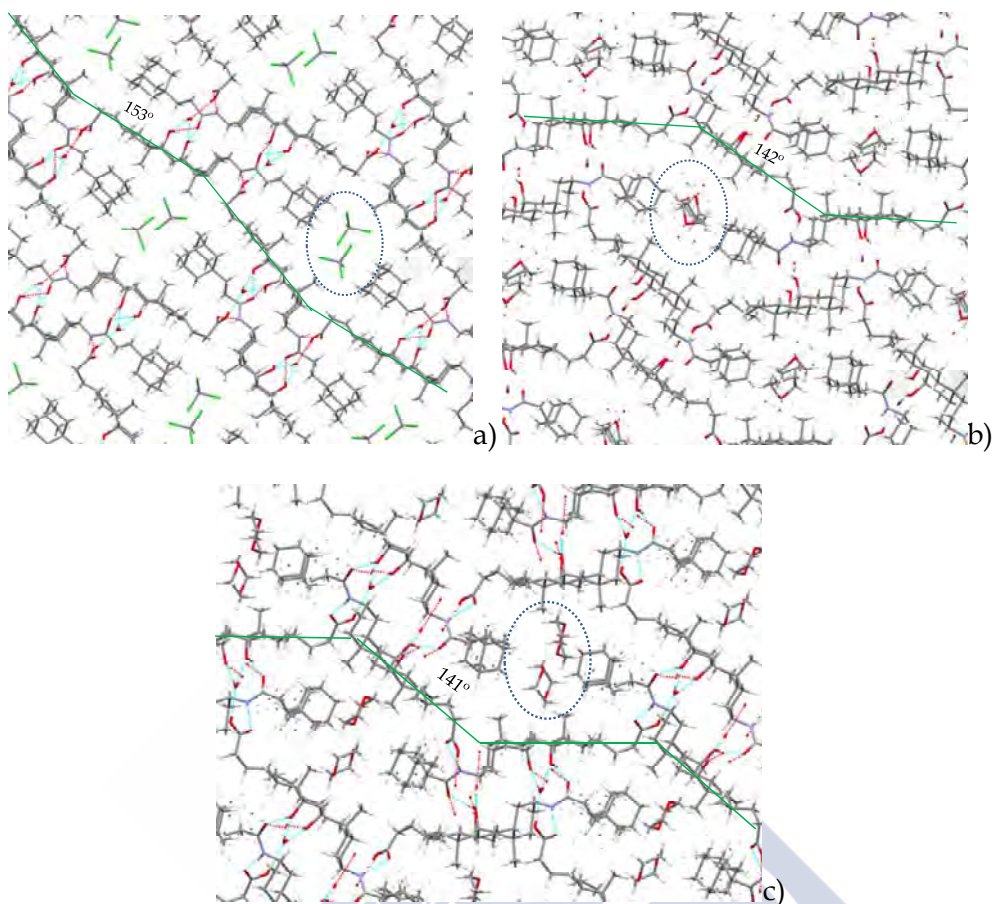


Fig. 2.86. Estructura cruzada para los complejos de inclusión, a) AdCH₂CA:cloroformo, b) THF y c) dioxano.

2.3.4. AdSuccCOOMe

Síntesis del compuesto: [3 β , 5 α , 7 α , 12 α]-3[3-((adamantano-1-il)-carbamoil-propil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de metilo (AdSuccCOOMe).

El compuesto del título, que abreviadamente denominaremos AdSuccCOOMe, Figura 2.87, fue sintetizado, como se describe más adelante, mediante la activación del ácido con dietil cianofosfonato (DEPC) y la posterior reacción de adición-eliminación entre el ácido 3-[(adamantano-1-il)-carbamoil]-propanoico activado y el ester de metilo del ácido 3- β -amino-cólico¹²⁴⁻¹²⁶.

Se obtuvieron diferentes cristales prismáticos e incoloros y que fueron resueltos mediante la técnica de difracción de Rayos X se han obtenido. Los datos fueron recogidos en un difractómetro Bruker X8 KappaAPEXII. El resumen de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 2.38.

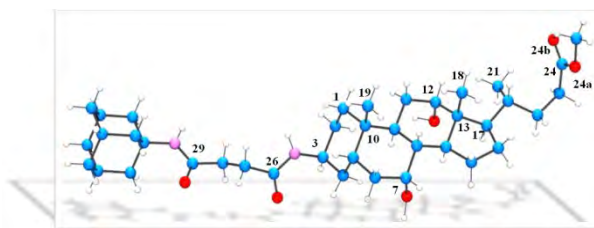


Fig. 2.87. Esquema y numeración de la molécula de AdSuccCOOMe.

Tabla 2.38 Datos cristalográficos para los complejos de AdSuccCOOMe en acetona/agua.

Disolvente	Acetona/Agua
Fórmula empírica	$C_{39}H_{62}N_2O_6 \cdot H_2O$
Estequiometría	1:1(agua)
Fórmula en peso	672.92
Temperatura (K)	110 (2)
Longitud de onda (Å)	0.71069
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico, $P2_12_12_1$
a (Å)	7.6251(1)
b (Å)	18.017(3)
c (Å)	26.709(4)
α (°)	90.00
β (°)	90.00
γ (°)	90.00
Z, densidad calculada (g/cm^3)	4, 1.218
Coefficiente de Absorción μ (mm^{-1})	0.08
F(000)	1472
Tamaño cristal (mm^3)	0.6×0.08×0.05
Intervalo Theta; (datos recogidos) (°)	1.0-65.1
Intervalos de los índices	-8≤h≤8 0≤k≤21 0≤l≤31
Datos/restricciones/parámetros	6153/0/462
mejor ajuste en F^2	1.058
índices R finales [$I > 2\sigma(I)$]	R1=0.0465 wR2=0.1254
Índices R (todos los datos)	R1=0.0482 wR2=0.1275
Densidad diferencial máxima y mínima (Å^{-3})	0.59 y -0.30

Como se puede ver en la mencionada tabla, el cristal obtenido en acetona/agua no posee moléculas de acetona ocluidas, presentando únicamente una estequiometría 1:1 con respecto a las moléculas de agua.

La estructura cristalina obtenida pertenece al sistema ortorrómbico ($P2_12_12_1$), al igual que la mayoría de los complejos obtenidos hasta el momento.

La Tabla 2.39 muestra la conformación del anillo D del núcleo esteroideo en términos del ángulo máximo de torsión, φ_m , y el ángulo de fase de pseudorotación, Δ . La conformación dada por el ángulo de fase de pseudo-rotación es de *sobre*, hecho no muy común para los cristales vistos hasta el momento a excepción del ADCH₂CH₂CA/Cloroformo ya visto. De hecho, el único caso que hemos encontrado a lo largo de la bibliografía ha sido para una conformación del ácido desoxicólico en o-xileno en la cual se obtenía un valor de $\Delta = 20.4^\circ$, bastante alejado del valor ideal de -36 y 36 que se correspondería a una conformación en *sobre*⁶⁴. La Tabla 2.40 recoge los ángulos de torsión, ψ_1 - ψ_4 de la cadena lateral.

Tabla 2.39. Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el cristal sin inclusión de AdSuccCOOMe.

Ángulos de Torsión (°)	s.h.
Δ (°)	32.70
φ_m	47.40
$\psi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15}$	45.48
$\psi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14}$	-43.89
$\psi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13}$	27.07
$\psi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17}$	0.78
$\psi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16}$	-29.12
Conformación del anillo D	<i>sobre</i>

Tabla 2.40. Principales ángulos de torsión y conformación de la cadena lateral considerando, "g" ($60^\circ, -60^\circ$) y *trans*, "t" (180°).

Disolvente	Acetona/Agua
enlaces C-C	Ángulos de Torsión (°)
$\psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	165.85
$\psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	173.32
$\psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	52.58
$\psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	70.08
$\psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-72.56
Conformación de la cadena lateral	<i>ttgg</i>

La variación de los valores de ψ_5 al igual que sucedía en los casos anteriores están de acuerdo con el rango encontrado por Giglio y Quagliata¹²¹, que observaban una variación en un estrecho rango de unos 20° alrededor de -53° y -60° y que se correspondía con un mínimo en el perfil de energía para los ácidos colánicos. Los valores experimentales resumidos en la tabla anterior, muestran una coincidencia con

los calculados a excepción de ψ_2 y ψ_4 , para los cuales los signos de los valores obtenidos han cambiado.

El valor del ángulo entre los planos h y v para este cristal es de 88.8° (Tabla 2.41), acorde con los resultados anteriormente descritos. La coordenada C24- h es positiva lo que indica que el grupo carboxílico está orientado hacia la cara β de la molécula. El valor de $d_{17-24}=4.49 \text{ \AA}$ está en concordancia con una conformación de la cadena lateral tipo *tgtg* o plegada. Las distancias entre el átomo de carbono carboxílico, C24, y los dos planos se muestra en la Figura 2.88.

Tabla 2.41 Ángulos y Distancias características para el cristal de AdSuccCOOMe sin huéspedes.

Disolvente	acetona/agua
Ángulo $h-v$ ($^\circ$)	88.8
Distancia entre C24 y los planos h/v (\AA)	1.323/1.134
D. Centroide hidrófobo planos h/v (\AA)	-1.904/2.721
$d_{C17-C24}$ (\AA)	4.49

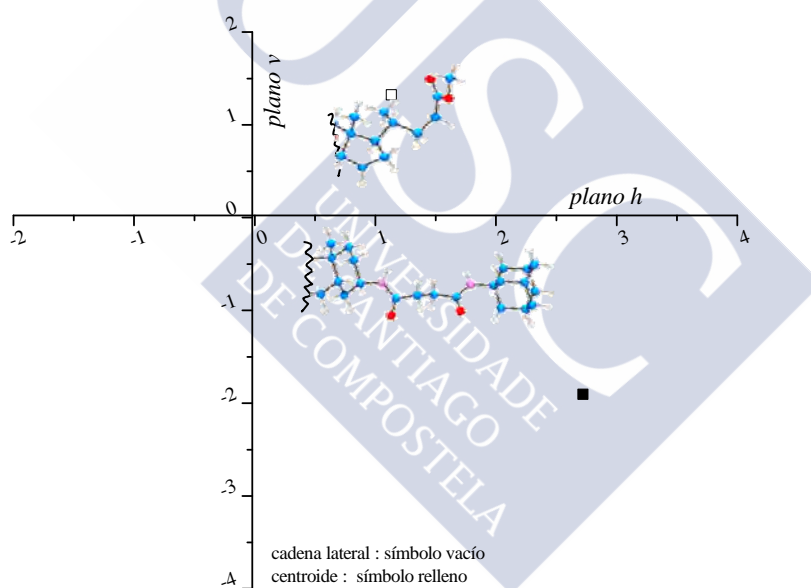


Figura 2.88. Coordenadas del átomo carboxílico C24 y del centroide del grupo hidrófobo con respecto a los planos h y v .

A diferencia de lo que ocurría en los compuestos vistos hasta el momento el núcleo esteroideo y el grupo hidrófobo están localizados en regiones muy diferentes de los planos definidos por los enlaces amida de la cadena 3β . El plano h forma un ángulo de 52° con el plano amida del grupo N25-C26 y un ángulo de 14° con el plano amida del grupo C29-N30. Las distancias entre el centroide del grupo hidrófobo adamantilo y los planos h y v se muestran también en la Figura 2.84. Asimismo, se puede observar que el centroide hidrófobo se encuentra localizado bajo el plano h (cara α de la molécula),

mientras que la cadena lateral se encuentra orientada en el sentido opuesto, por encima del plano h (cara β).

Al alargar la cadena se observa que el anillo A y el grupo metilo C19, junto con el sustituyente adamantilo no forman la superficie cóncava en la que, *a priori*, podrían alojarse moléculas de disolvente. Ahora la distancia entre el centroide del residuo adamantilo y el centroide del anillo A del núcleo esteroideo es de 10.946 Å debido al espaciador succínico incorporado en la molécula. Por otro lado, se observa también un comportamiento un tanto particular de la cadena lateral orientando el grupo metoxilo casi perpendicular al plano formado por el núcleo esteroideo, con un ángulo de 94.56° (véase la Figura 2.89), adoptando una conformación que va a facilitar la participación del grupos carboxílico en la formación de la red de enlaces de hidrógeno.

En el cristal AdSuccCOOMe/s.h. no se originan el mismo tipo de bicapas que se encontraba para la mayoría de los complejos estudiados ya que las moléculas del éster biliar se reorientan para dar lugar a la formación de canales hidrófobos en forma de caja, a lo largo del eje a , en los cuales se alojan a su vez los residuos adamantilo originando una estructura cruzada. Estas regiones hidrófobas son similares a las encontradas para los complejos AdCH₂CA/acetofenona, AdCH₂CH₂CA/(Cloroformo, THF y Dioxano) y CAM/diisopropilmetanol¹⁰⁷, en donde se alojaban los huéspedes, aunque al igual que en los compuestos anteriormente sintetizados, a diferencia del CAM, ahora son los residuos adamantilo unidos mediante enlaces covalentes los que se incorporan en estos canales. Las dimensiones de estas cajas se aproximan mucho a las encontradas para el complejo CAM/diisopropilmetanol y el volumen determinado mediante los radios de van der Waals calculado para los dos residuos adamantilo es de 310 Å³. El volumen correspondiente a la molécula de AdSuccCOOMe calculado a partir de los radios de van der Waals definidos en apartados anteriores es de 671 Å³ que representa un aumento considerable con respecto a los derivados ya descritos (10% con respecto al AdCH₂CA).

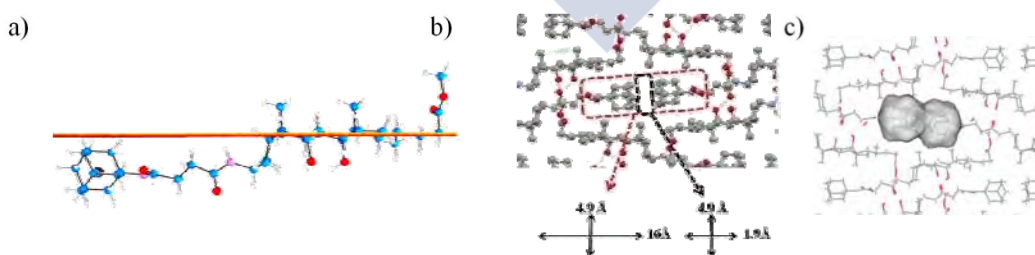


Figura 2.89 a) Vista lateral del AdSuccCOOMe a lo largo del plano h ; b) vista del empaquetamiento a lo largo del eje a ; c) volumen molecular para los residuos adamantilo en el canal hidrófobo.

Los grupos carboxilo, amida e hidroxilos forman regiones hidrófilas estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno siguiendo las secuencias mostradas en la Figura 2.90 a). Cada molécula de sal biliar se interconecta con otras cuatro mediante enlaces de

hidrógeno, dos en el plano horizontal inferior y otras dos en un plano formando ángulos de 168°, tomando como referencia los planos v definidos por las moléculas. También se enlaza con otras tres moléculas de agua mediante el hidroxilo O12 y el enlace amida N30-C29=O, como muestran las Figura 2.90 b). Esta disposición presenta muchas analogías con el complejo AdCH₂CA/acetofenona.

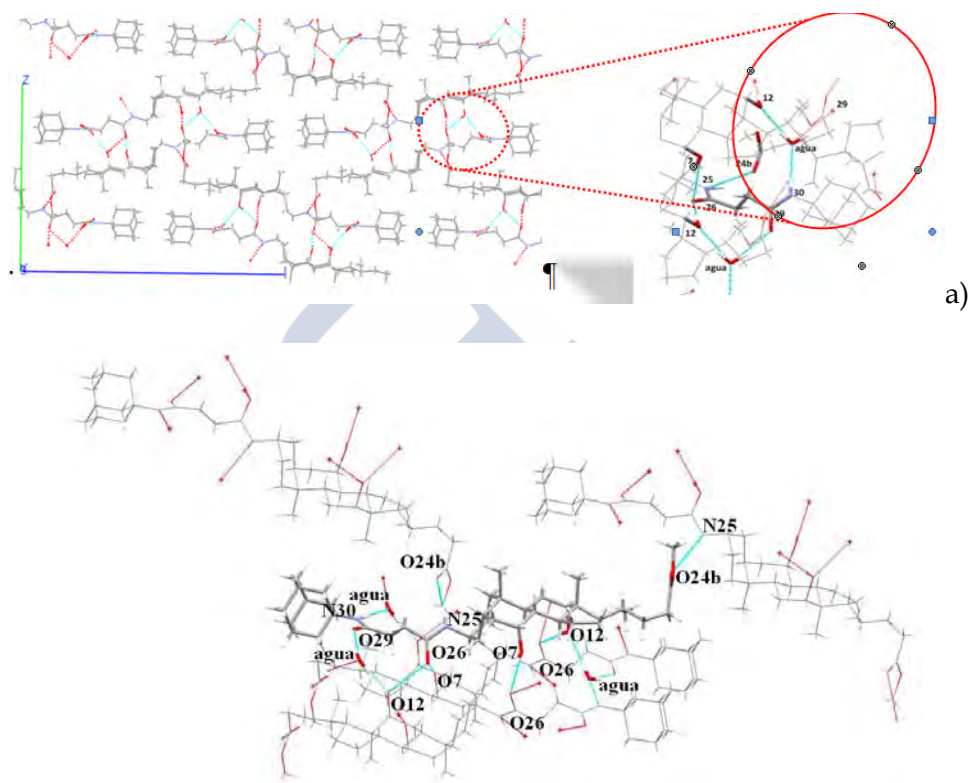


Figura 2.90. a) Cristal AdSuccCOOMe a lo largo del eje a y secuencia de enlaces de hidrógeno, b) enlaces de hidrógeno intramoleculares para el cristal de AdSuccCOOMe.

Se forman redes diferentes de las vistas hasta ahora para los enlaces de hidrógeno, una *red helicoidal infinita*, a lo largo del eje a , que une moléculas mediante este enlace amida y utiliza moléculas de agua como puentes de unión entre las moléculas consecutivas de esteroide dentro de un mismo plano h . A su vez los dos carbonilos de los enlaces amida participan en otra *red cíclica* mediante el puente succínico que une dos unidades de éster biliar antiparalelas del plano inferior o superior según sea el caso mediante los enlaces $O7H \cdots O26$ y $O12H \cdots O26$ propagándose a lo largo del eje a .

Red helicoidal infinita: $\dots [O(\text{agua}^i)H \cdots O=C29^I-N30-H \cdots O(\text{agua}^{ii})] \dots$

Red cíclica: $O(\text{agua}^i)H \cdots O12^{II}-H \cdots O=C26^I-CH_2-CH_2-C29=O \cdots H-O(\text{agua}^i)$

Los grupos amino de los enlaces amida también contribuyen a la red de enlaces, uno de ellos mediante la red helicoidal infinita como ya se ha comentado, mientras que el otro sirve para interconectar moléculas de planos consecutivos mediante el enlace N25-H··O=C24b.

Todos los valores de las distancias y ángulos de enlace se encuentran en el ámbito de las interacciones de enlaces de hidrógeno (Tabla 2.42).

Tabla 2.42 Distancias y ángulos para los enlaces de hidrógeno en el cristal de AdSuccCOMe sin huésped.

Huésped	D---H··A	D··A	D-H··A
s.h.	O7---H··O26	2.805(2)	160(3)
	O12---H··O26	2.782(2)	170(3)
	N25---H··O24b	2.957(3)	153(3)
	N30---H··O(agua)	3.025(3)	174(5)
	O(agua)---H··O29	2.869(2)	166(4)
	O(agua)---H··O12	2.821(2)	169(3)

El empaquetamiento del complejo se muestra en la Figura 2.91. Aunque no es tan evidente la formación de una estructura laminar se puede constatar que existe una estructura similar con un grosor de 18.017 Å, coincidente con la longitud del eje *b* de la celda unidad. El empaquetamiento es claramente diferente al de los compuestos anteriores, observando un gran desplazamiento entre los grupos esteroides. El desplazamiento entre los centroides de los residuos hidrófobos de dos moléculas antiparalelas, vistas a lo largo del eje *a*, es evidentemente mucho mayor a los casos vistos hasta ahora, resultando un valor de 21.229 Å, mientras que si medimos dos moléculas paralelas esta es de 26.709 Å. No existe interdigitación entre los metilos, pero los residuos hidrófobos se encuentran entre los metilos 18, 19 como se puede observar en la Figura 2.91.

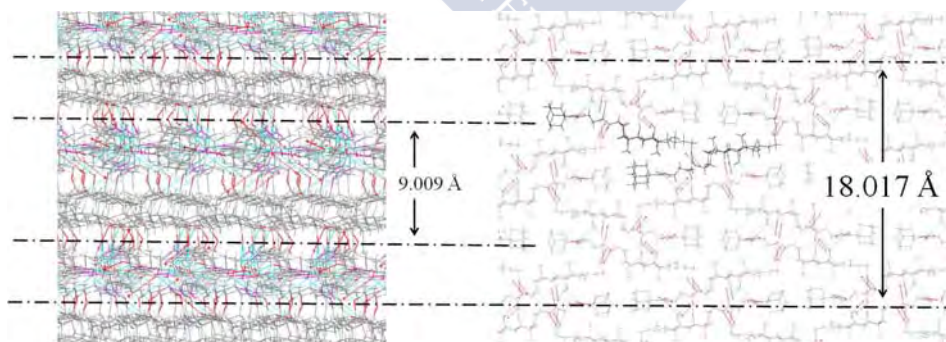


Figura 2.91. Empaquetamiento cristalino de AdSuccCOMe. Se dibujan con líneas negras las zonas de enlaces de hidrógeno que interconecta las regiones hidrófobas de las estructuras laminares.

La disposición espacial de las moléculas del éster biliar origina cavidades hidrófobas en la red cristalina a la que contribuyen seis unidades biliares y que se

pueden ver en la Figura 2.92, similar a la encontrada para los complejos vistos en los apartados anteriores aunque con ángulos para la red cruzada del orden de 10-30° inferiores, (véanse los recuadros punteados).

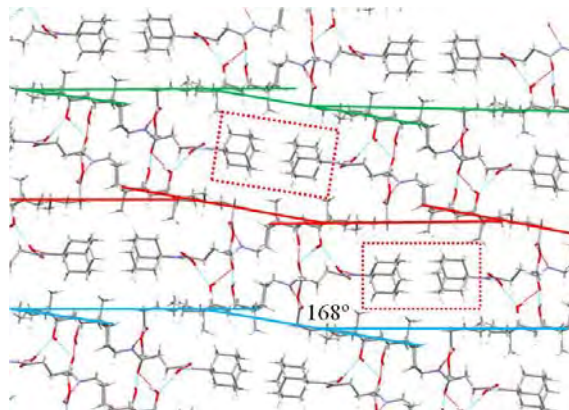


Figura 2.92. Estructura cristalina vista a lo largo del eje a

2.3.6 BocCys(Trt)COOMe

Síntesis del compuesto: [3β, 5a, 7a, 12a]-3[(2-N-tert-butoxicarbonil-3-S-tritil-propil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de metilo (BocCys(Trt)COOMe).

El compuesto (Figura 2.93) fue sintetizado mediante la reacción entre la N-(t-butoxicarbonil)-S-tritil-L-cisteína (BOC-Cys(Trt)-OH) previamente activada con diisopropilcarbodiimida (DIC)¹²⁷ seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico.

Los cristales obtenidos, prismáticos e incoloros, fueron resueltos como en los casos anteriores. Los datos fueron recogidos en un difractómetro Bruker X8 KappaAPEXII. El resumen de los datos obtenidos se muestra en la Tabla 2.43. El cristal obtenido, sin huéspedes, pertenece al sistema ortorrómbico (P2₁2₁2₁), al igual que la mayoría de los complejos obtenidos hasta el momento.

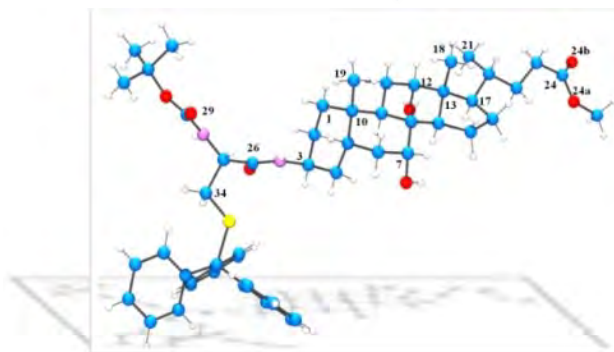


Fig. 2.93 Esquema y numeración de la molécula de BocCys(Trt)COOMe.

Tabla 2.43 Datos cristalográficos para los complejos de BocCys(Trt)COOMe en acetato de etilo/hexano.

Disolvente	Acetato etilo/hexano (8:2)
Fórmula empírica	C ₅₂ H ₇₀ N ₂ O ₇ S
Estequiometría	s.h.
Fórmula en peso	867.16
Temperatura (K)	100 (2)
Longitud de onda (Å)	0.71070
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	14.2301(4)
b (Å)	16.5347(6)
c (Å)	20.1138(7)
α (°)	90.00
β (°)	90.00
γ (°)	90.00
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.217
Coefficiente de Absorción μ (mm ⁻¹)	0.12
F(000)	1872
Tamaño cristal (mm ³)	0.3×0.17×0.1
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	2.5-24
Intervalos de los índices	-17≤h≤17 0≤k≤20 0≤l≤24
Datos/restricciones/parámetros	9336/0/595
mejor ajuste en F ²	1.023
índices R finales [I>2σ(I)]	R1=0.0439 wR2=0.083
Índices R (todos los datos)	R1=0.06 wR2=0.0882
Densidad diferencial máxima y mínima (Å ⁻³)	0.204 y -0.245

La conformación del anillo D (definida en términos del ángulo máximo de torsión, φ_m , y el ángulo de fase de pseudorrotación, Δ ; Tabla 2.44) es la de *sobre*, hecho no muy común para los cristales vistos hasta el momento. El único caso que hemos encontrado a lo largo de la bibliografía ha sido en un cristal del ácido desoxicólico en *o*-xileno en la que se obtenía un valor $\Delta = 20.4^{064}$. A él, hay que añadir el AdSuccCOOMe que hemos visto anteriormente con un valor de $\Delta = 32.7^0$ y AdCH₂CH₂/Cloroformo $\Delta = 29.56^0$.

Los valores de los ángulos de torsión de la cadena lateral, ψ_1 - ψ_4 , se resumen en la Tabla 2.45. La variación de los valores de ψ_5 al igual que sucedía en los casos anteriores están de acuerdo con el rango encontrado por Giglio y Quagliata. Los valores de ψ_1 y ψ_2 coinciden con los calculados, mientras que los de ψ_3 y ψ_4 se alejan de los estimados por los autores.

Tabla 2.44. Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el cristal sin inclusión de BocCys(Trt)COOMe.

Ángulos de Torsión (°)	s.h.
Δ (°)	20.58
φ_m	-71.66
$\psi_0 \equiv \text{C17-C13-C14-C15}$	46.44
$\psi_1 \equiv \text{C16-C17-C13-C14}$	-41.71
$\psi_2 \equiv \text{C15-C16-C17-C13}$	22.63
$\psi_3 \equiv \text{C14-C15-C16-C17}$	5.93
$\psi_4 \equiv \text{C13-C14-C15-C16}$	-32.46
Conformación del anillo D	Conformación en sobre

Tabla 2.45. Principales ángulos de torsión y conformación de la cadena lateral considerando, *i* significa un intermedio entre la conformación gauche, "g" (60°, -60°) y trans, "t" (180°).

Disolvente	Acetona/Agua
Enlaces C-C	Ángulos de Torsión (°)
$\psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	177.72
$\psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	-172.02
$\psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	-176.98
$\psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	-33.21
$\psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-58.80
Conformación de la cadena lateral	<i>ttti</i>

El valor del ángulo entre los planos *h* y *v* para este cristal estudiado es de 87.9° (Tabla 2.46) lo que está de acuerdo con los resultados anteriormente descritos para el AdCH₂CA, NorCH₂CA, AdCH₂CH₂CA y AdSuccCOOMe.

El grupo carboxílico y el grupo trifenilo están orientados hacia la cara α de la molécula. Los centroides hidrófobos asignados a los grupos trifenilo y *t*-butilo se sitúan en regiones opuestas, debido probablemente a impedimentos estéricos al ser grupos muy voluminosos. Esta situación origina que el centroide asociado al grupo trifenilo se encuentre en una región en la que hasta el momento no encontrábamos grupos hidrófobos (Figura 2.94).

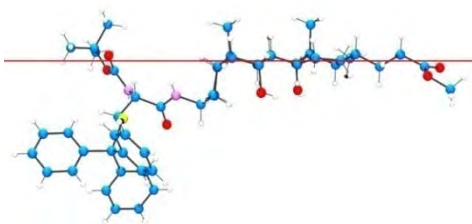


Fig. 2.94. Vista del BocCys(Trt)COOMe lateral a lo largo del plano *h*.

Finalmente, el valor de $d_{17-24} = 5.09 \text{ \AA}$ (Tabla 2.46) indica que la cadena lateral se encuentra estirada, lo que coincide con su conformación *ttti*. El mismo es casi idéntico al encontrado para el cristal de AdSuccCOOMe/s.h. Las distancias entre el átomo de carbono carboxílico, C24, y los dos planos se muestran en la Figura 2.95 y son casi idénticas a las encontradas para los complejos NorCH₂CA/acetona y NorCH₂CA/DMSO, mientras que el centroide asociado al grupo *t*-butilo cae en la misma región que el centroide asociado al residuo norbornilo para estos dos complejos. Los datos de las distancias se pueden consultar en la Tabla 2.46.

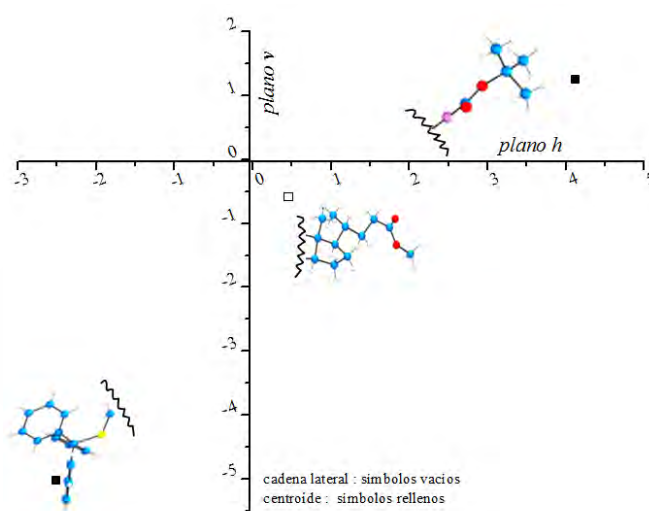


Fig. 2.95 Coordenadas del átomo carboxílico C24 y los centroides de los grupos hidrófobos con respecto a los planos *h* y *v*.

Tabla 2.46 Ángulos y distancias características para el cristal de BocCys(Trt)COOMe sin huéspedes.

Disolvente	acetona/agua
Ángulo h-v (°)	87.87
Distancia entre C24 y los planos h/v (Å)	-0.581/0.460
D. Centroide hidrófobo del trifenilmetilo planos h/v (Å)	-5.029/-2,506
D. Centroide hidrófobo del tert-butilo planos h/v (Å)	1.254/4.120
$d_{C17-C24}$ (Å)	5.09

El núcleo esteroideo y el centroide asociado al *t*-butilo hidrófobo están localizados en la misma región definida por el plano formado por los enlaces amida de la cadena

en la posición 3β . El plano h forma un ángulo de 52° al igual que sucedía para el cristal descrito anteriormente. Las distancias entre los centroides de los grupos hidrófobos y los planos h y v se muestran en la Figura 2.95. El centroide hidrófobo asociado al t -butilo, como ya se comentó anteriormente, se encuentra localizado sobre el plano h (cara β de la molécula), mientras que la cadena lateral y el centro hidrófobo asociado al trifenilo se encuentran orientados en el sentido opuesto, es decir, por debajo del plano h (cara α). Ahora las distancias entre los centroides de los residuos t -butilo y trifenilo con respecto al centroide del anillo A del núcleo esteroideo son 8.564 y 7.780 Å, respectivamente, valores superiores a los encontrados para los casos con residuos adamantilo y norbornilo y menor que en el caso del adamantanosuccinilo.

El anillo A y el grupo metilo C19, junto con los residuos hidrófobos no forman una superficie cóncava en donde, *a priori*, podrían alojarse moléculas de disolvente.

A diferencia del compuesto AdSuccCOOMe, la cadena lateral se encuentra estirada paralela al plano formado por el núcleo esteroideo, adoptando una conformación que le facilita la participación del grupo carboxílico en la formación de la red de enlaces de hidrógeno.

El volumen molecular calculado a partir de los radios de van der Waals es de 871 Å³ lo que nos da una idea del aumento de voluminosidad de la molécula (un 31%) con respecto al AdCH₂CA.

En el cristal BocCys(Trt)COOMe/s.h. se ha producido una distorsión de las bicapas que veíamos para la mayoría de los complejos lo que puede estar asociado a la voluminosidad de los grupos hidrófobos incorporados, lo que conduce también a una rotación del plano h de la molécula con respecto al eje a de la celda unidad. Esta situación conduce a lo que podríamos considerar como una ruptura de las bicapas y a un apilamiento de capas alternas en las que se intercalan capas esteroideas y capas formadas por los residuos hidrófobos, originando dos tipos de canales a lo largo de los ejes a y b con la posibilidad de albergar moléculas apolares. Este hecho se observa claramente en la Figura 2.96.

El empaquetamiento del complejo se muestra en la Figura 2.97 y aunque no es tan evidente la formación de una estructura laminar se puede constatar que existe una estructura similar con un ancho de 20.114 Å, coincidente con la longitud del eje c de la celda unidad. Si se observa la disposición de las moléculas a lo largo del eje b , se observa la rotación del núcleo esteroideo a lo largo de este eje dando lugar a dos orientaciones diferentes con un ángulo de torsión de 88.96° entre ellas. Este hecho se podía ver también en la Figura 2.97.

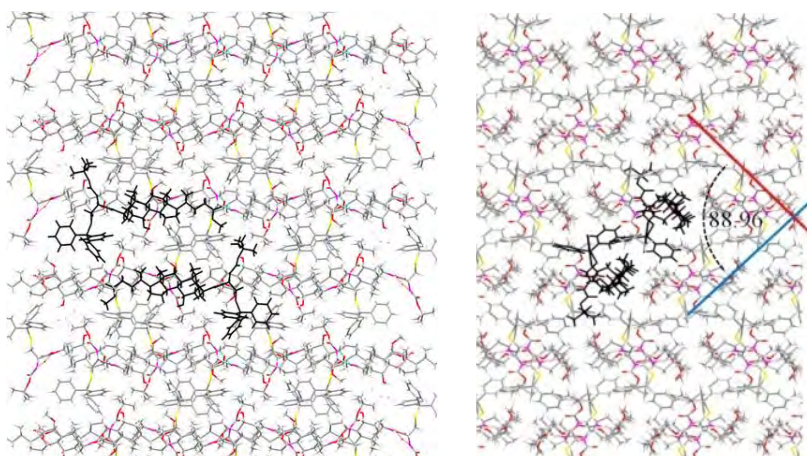


Fig. 2.96. Empaquetamiento del cristal BocCys(Trt)COOMe a lo largo del eje a y b.

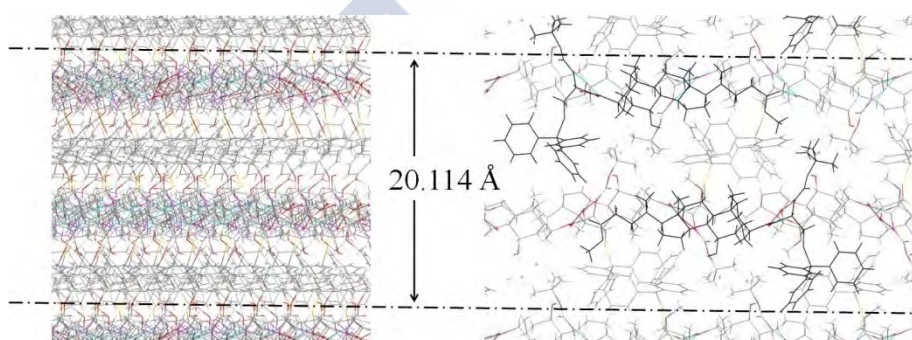


Fig. 2.97. Empaquetamiento cristalino del BocCys(Trt)COOMe. Se dibujan con líneas negras las zonas que interconecta las diferentes regiones de las estructuras laminares.

En este cristal se observa que las interacciones hidrófobas cobran gran relevancia, contribuyendo en gran medida a la estabilidad del cristal. Por otra parte, la red de enlaces de hidrógeno a lo largo de la estructura cristalina se ha visto reducida, presentando solamente tres tipos de enlaces de hidrógeno diferentes (Tabla 2.47). Cada molécula de sal biliar se interconecta con otras cuatro mediante los enlaces de hidrógeno (Figura 2.98).

Tabla 2.47. Enlaces de hidrógeno en BocCys(Trt)COMe sin huésped.

Huésped	D---H...A	D...A	D-H...A
s.h.	O(12)---H...O(26)	2.640(2)	175(2)
	N(25) ---H...O(24b)	2.988(2)	166(2)
	N(28)---H...O(12)	2.975(3)	151(2)

Un hecho destacable es que el hidroxilo de la posición 7 no participa en los enlaces de hidrógeno presentes en la estructura cristalina, lo que puede ser atribuido a la proximidad y orientación del residuo trifenilo evitando que se aproximen otras

moléculas que puedan interaccionar con este grupo y por consiguiente la formación de nuevos enlaces de hidrógeno en esta región de la molécula.

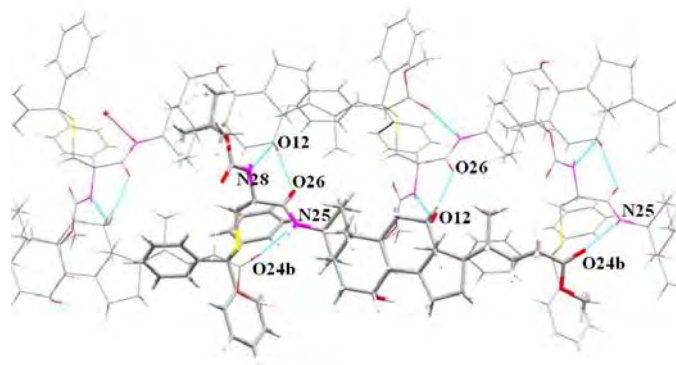


Figura 2.98. Enlaces de hidrógeno de una molécula de BocCys(Trt)COMe con sus vecinas.

2.3.6. PyrCOOMe

Síntesis del compuesto: [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(1-pirenocarboxil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de metilo (PyrCOOMe).

El compuesto mostrado a continuación fue sintetizado mediante la reacción entre el ácido 1-pirenocarboxílico (PyrCOOH) previamente activada con (DEPC) seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico.

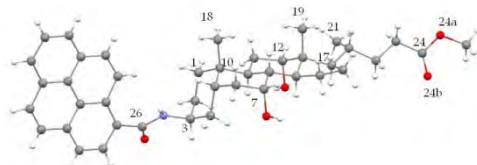


Fig. 2.99 Esquema y numeración de la molécula de PyrCOOMe.

Los cristales obtenidos, prismáticos e incoloros, fueron resueltos mediante la técnica de difracción de rayos-X. Los datos fueron recogidos en un difractorómetro Bruker X8 KappaAPEXII. La Tabla 2.48 resume los datos esenciales de la estructura.

El cristal, sin huéspedes, pertenece al sistema monoclinico P₂₁, al igual que los cristales de NbCH₂CA con 2-propanol y 2-butanol.

La conformación dada por el ángulo de fase de pseudo-rotación (Tabla 2.49) es de *sobre*, conformación que, como ya hemos comentado anteriormente, no es muy común para este tipo de cristales, pero de la que ya hemos encontrado varios casos a lo largo de los cristales estudiados.

Tabla 2.48 Datos cristalográficos para los complejos de PyrCOOMe.

Disolvente	Acetato etilo/hexano (8:2)
Fórmula empírica	2 · (C ₄₂ H ₅₁ NO ₅)
Estequiometría	s.h.
Fórmula en peso	649.84
Temperatura (K)	120
Longitud de onda (Å)	1.54180
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁
a (Å)	7.5149(4)
b (Å)	32.3546(19)
c (Å)	13.8903(8)
α (°)	90.00
β (°)	93.278 (3)
γ (°)	90.00
Z, densidad calculada (g/cm ³)	4, 1.280
Coefficiente de Absorción μ (mm ⁻¹)	0.653
F(000)	1400
Tamaño cristal (mm ³)	0.02×0.07×0.63
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	1.3-18.9
Intervalos de los índices	-6≤h≤6 -29≤k≤27 0≤l≤12
Datos/restricciones/parámetros	5139/0/411
mejor ajuste en F ²	1.10
Índices R (todos los datos)	R1=0.0794 wR2=0.2103
Densidad diferencial máxima y mínima (Å ⁻³)	0.61 y -0.31

Tabla 2.49. Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el cristal sin inclusión de PyrCOOMe.

Ángulos de Torsión (°)	s.h.
Δ (°)	-52.90
φ _m	51.30
ψ ₀ ≡C17-C13-C14-C15	45.93
ψ ₁ ≡C16-C17-C13-C14	36.36
ψ ₂ ≡C15-C16-C17-C13	15.00
ψ ₃ ≡C14-C15-C16-C17	12.89
ψ ₄ ≡C13-C14-C15-C16	-36.08
Conformación del anillo D	sobre

La conformación de la cadena lateral, determinada a partir de los ángulos de torsión, ψ₁-ψ₅, se recoge en la Tabla 2.50.

Tabla 2.50. Principales ángulos de torsión y conformación de la cadena lateral considerando, *i* significa un intermedio entre la conformación *gauche*, "g" (60°, -60°) y *trans*, "t" (180°).

Disolvente	Acetona/Agua
Enlaces C-C	Ángulos de Torsión (°)
$\psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	-179.33
$\psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	-166.06
$\psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	-175.74
$\psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	-166.50
$\psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-50.89
Conformación de la cadena lateral	<i>tttt</i>

Los comentarios vertidos para el cristal anterior son válidos para el aquí analizado no siendo, por ello, necesario repetirlos.

El valor del ángulo entre los planos *h* y *v* para este cristal estudiado es de 88.2° (Tabla 2.51) lo que está de acuerdo con los resultados hasta aquí comentados.

El grupo carboxílico y el grupo pirenilo están orientados entre las dos caras de la molécula. El centroide hidrófobo del grupo pirenilo está ubicado muy cerca del plano vertical y el ángulo formado entre tal plano y el del grupo es pequeño (8.37°). La Figuras 2.100 y 2.101 ilustran estas afirmaciones. El valor de $d_{17-24} = 5.034 \text{ \AA}$ indican que la cadena lateral se encuentra estirada, lo que coincide con la conformación *tttt*. La distancia entre el átomo de carbono carboxílico, C24, y los dos planos se muestra también en la Figura 2.101, la cual también recoge las distancias entre el centroide del grupo hidrófobo y los planos *h* y *v*. Los datos de las distancias se pueden consultar en la Tabla 2.51.

Tabla 2.51 Ángulos y distancias características para el cristal de PyrCOOMe sin huéspedes.

Disolvente	acetona/agua
Ángulo h-v (°)	88.19
Distancia entre C24 y los planos <i>h/v</i> (Å)	-0.461/0.163
D. Centroides hidrófobo del pireno planos <i>h/v</i> (Å)	-5.029/-2,506
D. Centroides hidrófobo del pireno planos <i>h/v</i> (Å)	0.024/-0.271
$d_{\text{C17-C24}}$ (Å)	5.034

En este caso, el plano formado por los enlaces amida de la cadena 3β forma un ángulo de 44.16° con respecto al plano *v* definido y de 47.7° con el plano *h*. Ahora la distancia entre el centroide del residuo pirenilo con respecto al centroide del anillo A del núcleo esteroideo son de 6.972 Å valor similar a los encontrados para los casos con residuos adamantilo y norbornilo y menor que en el caso del adamantanosuccinilo y el residuo del grupo protector visto en la molécula anterior.

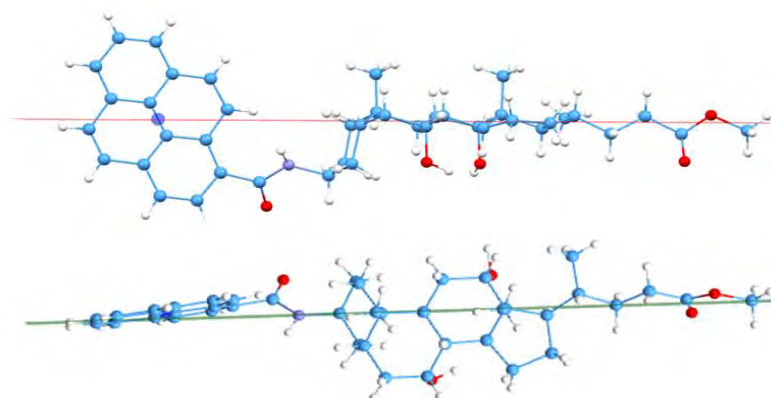


Fig. 2.100. Vista del PyrCOOMe lateral a lo largo del plano h.

El volumen molecular calculado a partir de los radios de van der Waals ya definidos en apartados anteriores es de 647 \AA^3 lo que nos da una idea del aumento de voluminosidad de la molécula respecto al AdCH₂CA.

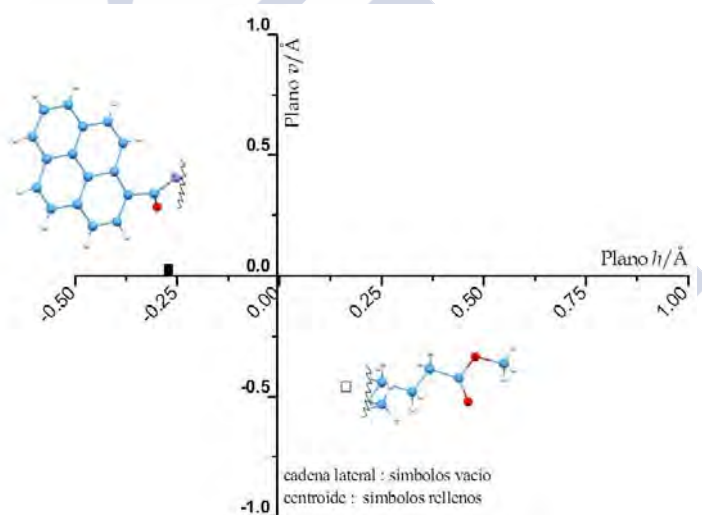


Fig. 2.101. Coordenadas del átomo carboxílico C24 y los centroides de los grupos hidrófobos con respecto a los planos h y v.

En el cristal PyrCOOMe/s.h. se ha producido una distorsión de las bicapas que veíamos para la mayoría de los complejos, originando bicapas cruzadas en las cuales las bicapas consecutivas se encuentran en disposición antiparalela. Este hecho se observa claramente en la Figura 2.102.

En este cristal se observa como las interacciones de tipo hidrófobo cobran gran relevancia, contribuyendo en gran medida a la estabilidad del cristal. Por otra parte se observa claramente como la red de enlaces de hidrógeno a lo largo de la estructura cristalina se ha visto reducida, presentando solamente tres tipos de enlaces de

hidrógeno diferentes, que se muestran en la Tabla 2.52. Al igual que sucedía con el compuesto anterior.

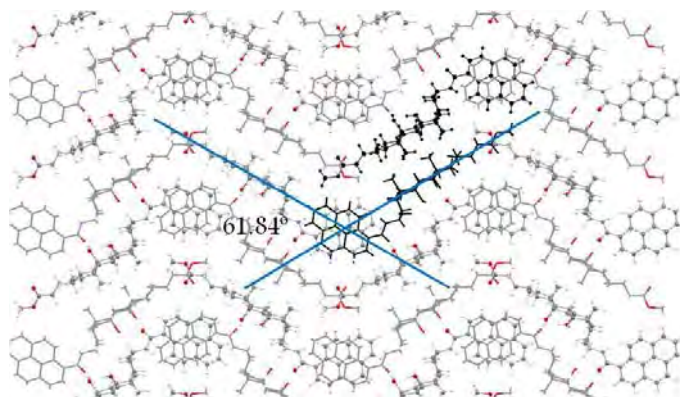


Fig. 2.102. Empaquetamiento del cristal PyrCOOMe a lo largo del eje a, ángulo formado entre moléculas consecutivas.

Tabla 2.52. Enlaces de hidrógeno en PyrCOOMe sin huésped.

Huésped	D---H...A	D...A	D-H...A
s.h.	O7 ^I ---H...O26 ^{II}	2.916(9)	128(7)
	O12 ^I ---H...O26 ^{III}	2.836(8)	167(8)
	O12 ^{II} ---H...O26 ^I	2.968(8)	142(10)

Cada molécula de sal biliar se interconecta con otras dos mediante enlaces de hidrógeno como muestra la Figura 2.103. A diferencia de los cristales encontrados en la bibliografía para colamida con diferentes huéspedes^{11,118}, ninguno de los grupos éster y amida participan en la red de enlaces de hidrógeno.

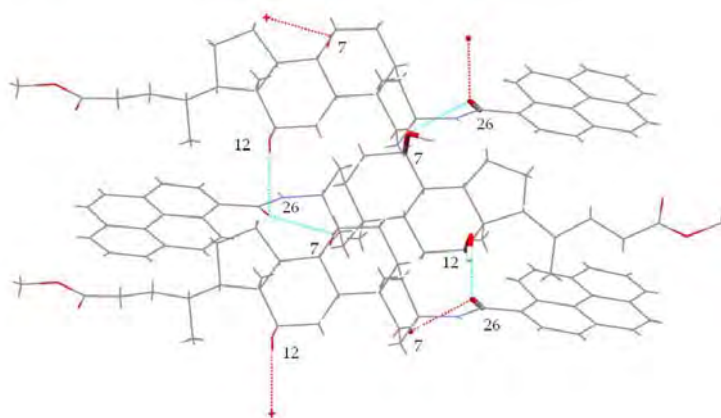


Figura 2.103. Enlaces de hidrógeno de una molécula de PyrCOOMe con sus vecinas.

2.3.7 AdCA y AdCOOMe

Síntesis del compuesto: [3 β , 5 α , 7 α , 12 α]-3[(1-adamantanocarboxil)-amino-7-12-dihidroxicolan-24-oico y 24-oato de metilo (AdCA y AdCOOMe).

Se han analizado los compuestos AdCA y AdCOOMe (Figura 2.104), compuestos ya sintetizados en el grupo y cristalizados en diferentes medios durante trabajos realizados en el grupo durante la elaboración de la presente tesis⁴².

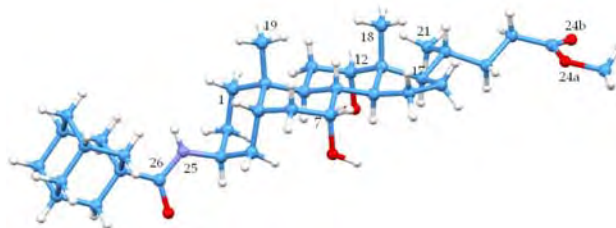


Fig. 2.104 Esquema y numeración para la molécula de AdCOOMe.

Los cristales obtenidos, prismáticos e incoloros, fueron resueltos mediante difracción de Rayos X. Los datos fueron recogidos en un difractor Bruker X8 KappaAPEXII. La Tabla 2.53 resume los datos básicos de la estructura cristalina.

La Tabla 2.54 los parámetros Δ y φ_m del anillo D del núcleo esteroideo para los cuatro cristales obtenidos. Los valores obtenidos para los cristales presentan diferencias significativas con respecto a la bibliografía y la tendencia es a una disposición intermedia entre *media silla* y *sobre*, y en el cristal con diclorometano la conformación se aproxima a *sobre*⁴⁶. Ejemplos de estas conformaciones ya han sido indicados a lo largo de las páginas precedentes.

Los valores experimentales obtenidos para la conformación de la cadena lateral se resumen en la Tabla 2.55.

Los valores de Ψ_2 y de Ψ_5 están en concordancia con los calculados por Giglio y Quagliata (*op. cit.*), mientras que para Ψ_3 y Ψ_4 se observan *diferencias significativas* para todos los compuesto. Para el caso del ácido hidrodexocólico (HDCA) se observa un mínimo de energía de van der Waals en la región $< 50^\circ$ para Ψ_4 que se correspondería con los valores obtenidos en el complejo de la forma éster sin huéspedes¹²¹.

Los dos planos *h* y *v* son casi perpendiculares (Figura 2.105), siendo $88.1 \pm 0.6^\circ$ el valor del *ángulo medio interplanar* para los cuatro cristales estudiados. Los valores de las distancias más significativas del cristal, así como algunos ángulos entre planos se recogen en la Tabla 2.56. Las distancias del centroide y del átomo de carbono C24 se encuentran representadas en la Figura 2.106.

Tabla 2.53. Datos cristalográficos para los complejos de AdCA en diclorometano, metanol y 2-butanol y AdCOOMe en Anisol.

Disolvente	AdCA			AdCOOMe
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	2-Butanol	Anisol
Fórmula empírica	C ₃₅ H ₅₅ NO ₅ · CH ₂ Cl ₂ · H ₂ O	2(C ₃₅ H ₅₅ NO ₅) · 4(CH ₄ O) · H ₂ O	C ₃₅ H ₅₅ NO ₅ · H ₂ O	C ₃₆ H ₅₇ NO ₅
Estequiometría	1:1(diclorometano) :1(agua)	2:4(Metanol) 1(agua)	1:1(agua)	1:s.h.
Fórmula en peso	672.83	1285.78	587.82	583.83
Temperatura (K)	100	100	100	100
Longitud de onda (Å)	0.7107	0.7107	0.7107	0.7107
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ortorrómbico, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a (Å)	7.5270 (6)	17.4943 (10)	7.8091 (10)	7.3463 (11)
b (Å)	18.6958 (12)	25.8151 (14)	18.951 (2)	23.8175 (9)
c (Å)	25.3407 (18)	7.7610 (5)	49.927 (6)	20.6481 (3)
α (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
β (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
γ (°)	90.00	90.00	90.00	90.00
Z, densidad calculada (g/cm³)	4, 1.253	2, 1.197	8, 1.057	4, 1.073
Coefficiente de Absorción μ (mm⁻¹)	0.23	0.08	0.07	0.07
F(000)	1456	1412	2576	1280
Tamaño cristal (mm³)	0.76 × 0.08 × 0.08	0.74 × 0.15 × 0.08	0.6 × 0.18 × 0.08	0.77 × 0.3 × 0.24
Intervalo Theta (datos recogidos) (°)	1.4-26.4	1.4-26.4	0.8-20.8	1.3-25.8
Intervalos de los índices	-9 ≤ h ≤ 9 0 ≤ k ≤ 23 0 ≤ l ≤ 31	-21 ≤ h ≤ 21 0 ≤ k ≤ 32 0 ≤ l ≤ 9	-7 ≤ h ≤ 7 0 ≤ k ≤ 18 0 ≤ l ≤ 49	-8 ≤ h ≤ 8 -29 ≤ k ≤ 29 0 ≤ l ≤ 25
Datos/restricciones/parámetros	6078/10/443	4077/7/457	4412/880/828	3900/102/392
Índices R (todos los datos)	R1=0.067 wR2=0.180	R1=0.041 wR2=0.107	R1=0.074 wR2=0.209	R1=0.055 wR2=0.134
Diferencia de densidad máxima y mínima (Å⁻³)	0.95 y -1.25	-0.47 y -0.27	0.63 y -0.26	0.20 y -0.22

La orientación del grupo carboxílico varía en función del huésped orientándose hacia la cara α de la molécula en el caso de los alcoholes o agua y hacia la cara β en el caso del diclorometano y el éster s.h.

El plano horizontal del núcleo esteroideo forma un ángulo con el plano del enlace amida con valores comprendidos entre 44° y 77° (Tabla 2.57). Se observa que para la mayoría de los cristales estudiados, este grupo se encuentra orientado por debajo del plano horizontal, es decir, hacia la región hidrófila de la molécula.

Tabla 2.54 Ángulos de Torsión del anillo D, Δ ángulo de fase de pseudorotación y φ_m ángulo máximo de torsión para el AdCA con los siguientes huéspedes: diclorometano agua, metanol agua, agua, y el ester de metilo sin huéspedes.

Ángulos de Torsión (°)	AdCA			AdCOOMe
	Diclorometano	Metanol	2-Butanol	Anisol
Δ (°)	-29.42	12.04	30.32/15.53	20.75
φ_m	77.26	47.43	75.93/48.18	46.74
C17-C13-C14-C15	74.73	47.17	73.29/47.74	45.98
C16-C17-C13-C14	-41.72	-40.35	-41.12/-41.20	-41.20
C15-C16-C17-C13	-4.82	19.65	-4.05/21.69	22.12
C14-C15-C16-C17	37.10	9.35	35.56/7.62	5.46
C13-C14-C15-C16	-60.18	-35.34	-59.60/-35.24	-31.95
Conformación del anillo D	Sobre distorsionado	Intermedio entre Media Silla y Sobre	Sobre distorsionado / Intermedio entre Media Silla y Sobre	Intermedio entre Media Silla y Sobre

Tabla 2.55 Ángulos de torsión para la cadena lateral en complejos de inclusión del AdCA y el ester de metilo, ⁱ posibles localizaciones de la cadena lateral.

Ángulos de Torsión (°)	AdCA			AcCOOMe
	Diclorometano	Metanol	2-Butanol	Anisol
$\Psi_1 \equiv \text{C13-C17-C20-C22}$	-173.90	-179.29	-177.54/166.18(-173.48)	172.48
$\Psi_2 \equiv \text{C17-C20-C22-C23}$	-169.79	-167.94	-179.90/61.46(156.97)	-167.38
$\Psi_3 \equiv \text{C20-C22-C23-C24}$	68.88	73.75	66.53/-174.31(148.90)	176.95
$\Psi_4 \equiv \text{C22-C23-C24-O24a (OH)}$	-154.97	-154.43	-150.53/77.21(-61.05)	-43.91
$\Psi_5 \equiv \text{C13-C17-C20-C21}$	-51.23	-57.76	-55.71/-61.89	-63.86
Conformación de la cadena lateral	<i>ttgt</i>	<i>ttgt</i>	<i>tttg/tgtg(tttg)ⁱ</i>	<i>tttg</i>

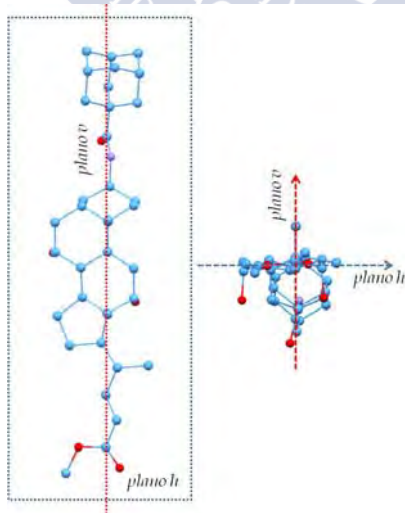


Fig. 2.105 Perspectivas de la molécula AdCOOMe según los planos h y v.

Tabla 2.56 distancias y ángulos de enlace medidos para los diferentes compuestos de inclusión con AdCA y AdCOOMe.

Disolvente	AdCA			AdCOOMe
	Diclorometano	Metanol	2-butanol	Anisol
Ángulo h-v (°)	88.51	88.04	88.86 / 87.77	87.37
Distancia C24 a h/v (Å)	0.726/0.112	-1.249/0.235	0.739/-0.265 -2.204/1.247 (-1.172/-0.49)	0.058/0.013
D. Centroide hidrófobo a h/v (Å)	-1.708/-0.814	-1.325/-0.802	-2.282/0.169 -1.226/-0.783	-1.484/-0.171
distancia C17-C24 (Å)	4.420	4.468	4.501 4.459 (5.378)	5.087
Ángulo plano h y plano amida (°)	50.35	44.37	53.38 76.39	76.52
interdigitación / conformación de la cadena lateral considerando Ψ_2	no / trans	no / trans	no / trans gauche(trans)	no / trans

La cadena lateral presenta una conformación tipo *trans* o estirada (Tabla 2.57), estando los valores de d_{17-24} en concordancia con las conformaciones indicadas. Estas características quedan evidenciadas en la Figura 2.107.

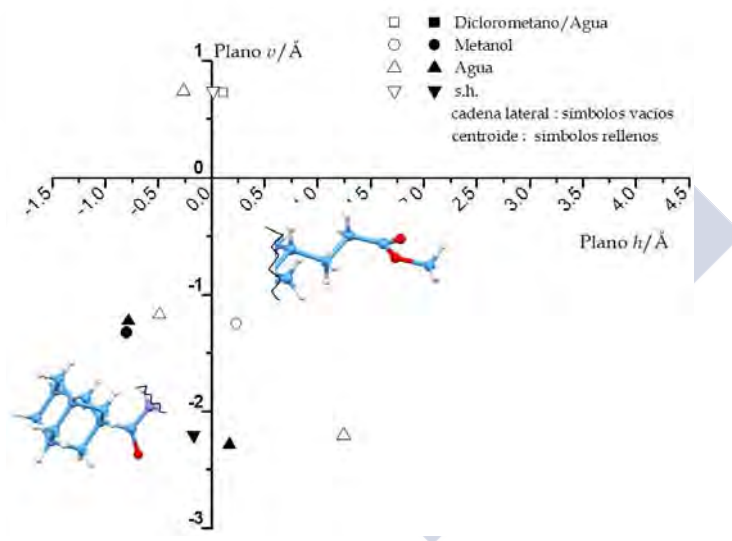


Fig. 2.108. Proyección de los centroides hidrófobos y el C24 sobre el plano perpendicular a los planos h, v definidos para los diferentes complejos de inclusión obtenidos para AdCA y AdCOOMe.

En todos los cristales se observa la formación de una cavidad cóncava en donde se podrían alojar las moléculas de los huéspedes. Esta cavidad está constituida por el anillo A del núcleo esteroideo, el grupo metilo 19, el enlace amida y el grupo hidrófobo, como veíamos en casos anteriores. La distancia entre los centroides del grupo hidrófobo y el anillo A así lo confirman, siendo 6.102, 6.153, 6.206-6.216 y 6.172 Å para los complejos diclorometano, metanol, agua y s.h., respectivamente. Se observa pues que los valores son prácticamente idénticos, lo cual es lógico ya que la libertad de

movimientos del grupo hidrófobo se ve reducida por el acortamiento del puente de unión entre el mismo y el núcleo esteroideo.

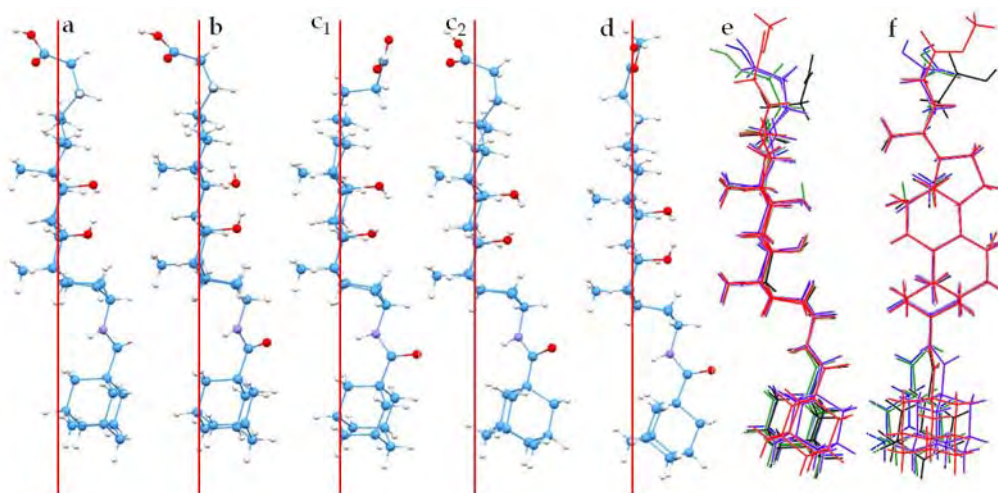


Fig. 2.107. Vista a lo largo del plano *h* de los cristales de AdCA [a] diclorometano, b) metanol, c) 2-butanol] y AdCOOMe [(s.h. d)]. Diagramas de superposición diclorometano (azul), metanol (verde), s.h. (negro y violeta), ester s.h (rojo): e) e y f).

Todos los cristales muestran una estructura cruzada (Figura 2.108), generando canales hidrófobos en los que se pueden albergar moléculas de huésped (como es el caso de las moléculas de diclorometano) y canales o regiones hidrófilas donde moléculas como agua o metanol, participan en la red de enlaces de hidrógeno. En la red cristalina con diclorometano la estructura cruzada forma ángulos de 143° .

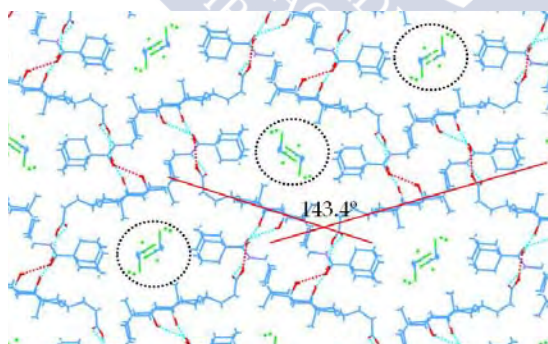


Fig. 2.108. Vista de la estructura cruzada con un ángulo de 143° para el cristal de AdCA con diclorometano a lo largo del eje *a*.

Para el caso el cristal con metanol, El ángulo de la estructura cruzada se incrementa hasta 150° (Figura 2.109), y disminuye a 140° para la estructura cristalina que solo presenta moléculas de agua en su red (Figura 2.110).

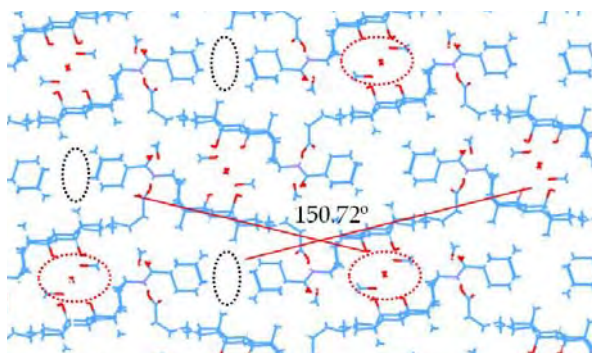


Fig. 2.109. Vista de la estructura cruzada con un ángulo de 151° para el cristal de AdCA con huéspedes de metanol a lo largo del eje c).

La estructura cristalina en el cristal que presenta sólo agua en su red estructural es muy similar a las dos vistas anteriormente, con la diferencia en que se produce una inversión de un par de moléculas en la estructura, dando lugar a cavidades con doble polaridad, una zona hidrófoba y una hidrófila como puede observarse en la Figura 2.111.

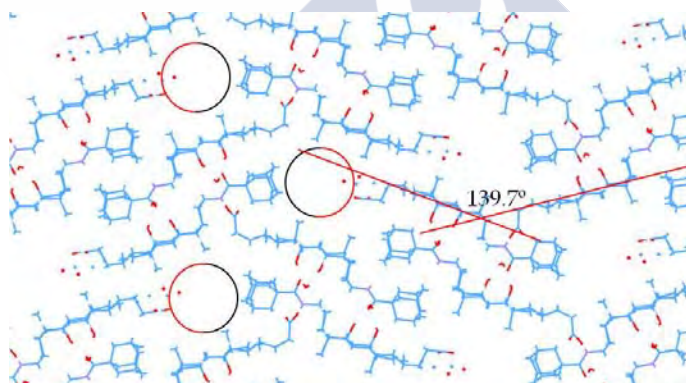


Fig. 2.110. Vista de la estructura cruzada con un ángulo de 140° para el cristal de AdCA, s.h. a lo largo del eje a).

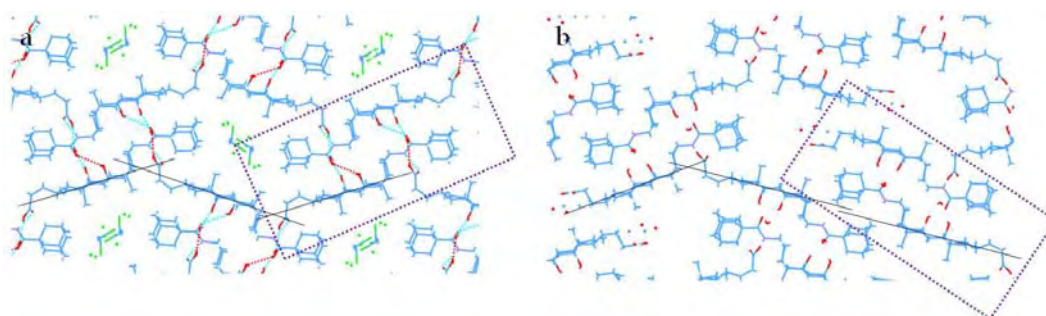


Fig. 2.111. Vista de la rotación de un par de moléculas de AdCA que originan el cambio en la red estructural cruzada cuando existen moléculas de huésped o no.

La Figura 2.112 resalta que la inversión de la orientación de un par de moléculas alarga la estructura cruzada, permitiendo la creación de las cavidades con la doble polaridad.

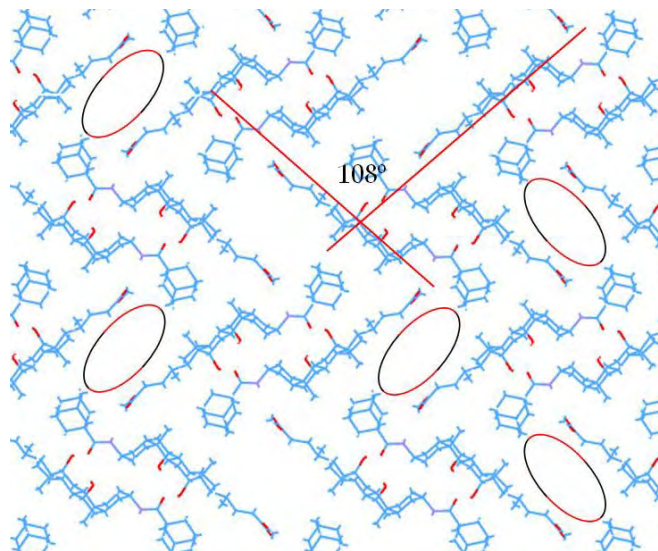


Fig. 2.112. Vista de la estructura cruzada con un ángulo de 108° para el cristal de AdCOOMe, s.h., a lo largo del eje a).

En el cristal de AdCOOMe, se observa que la estructura cruzada presenta un ángulo de 108° , inferior a los vistos anteriormente, existiendo canales fundamentalmente hidrófobos, aunque presentan una cierta polaridad proporcionada por las colas polares de los compuestos, hecho que se ilustra en la Figura 2.112.

Mediante el program PLATON v 1.15 se realizaron los cálculos correspondientes a la celda unidad para estudiar los posibles huecos existentes que pueden alojar diferente tipo de moléculas. Como anteriormente se realiza una búsqueda en la red cristalina de huecos en los cuales se puedan incorporar esferas cuyo radio es de 0.7\AA , observando también los índices de empaquetamiento de los cristales. Los resultados obtenidos para los diferentes complejos se describen en la Tabla 2.57.

El volumen de la cavidad va en orden creciente en relación con el tamaño del huésped a excepción del cristal de AdCOOMe s.h que no presenta huéspedes y la red cruzada es diferentes a las tres anteriores. El factor de empaquetamiento se encuentra en el intervalo de los coeficientes de empaquetamiento para cristales de inclusión y huéspedes encapsulados, 55-75 %, dados por Miyata y col.⁸⁷

Las redes de enlaces de hidrógeno en estos cristales son muy diferentes entre sí, por lo que se ha decidido analizar cada una de ellas por separado. Las longitudes y ángulos de enlaces para los diferentes enlaces de hidrógeno se resumen en la Tabla 2.58. Los valores numéricos se corresponden con valores habituales para este tipo de interacción.

Tabla 2.57 [a] Volumen molecular calculado con los radios de Van der Waals para los huéspedes presentes en las cavidades mediante el programa Accelrys DS Visualizer v 2.0.1. [b] volumen de la cavidad en la celda unidad calculada con un radio de prueba de 1.2 Å, [c] coeficiente de empaquetamiento calculado como $PC = (\text{vol. molecula } r.v.w)/(\text{vol. cavidad calculada}) 100^{87}$, [d] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculado sin los huéspedes presentes y [e] coeficiente de empaquetamiento del cristal calculados con el PLATON.

	Volumen molecular ^[a] [Å ³]	Vol. cavidad ^[b] (Å ³)	Vol. celda ^[c] (Å ³)	índice empaquetamiento huecos ^[d] [%]	índice empaquetamiento cristal ^[e] [%]
AdCA/Diclorometano/agua	68(desorden)/15	538	3566	51/11 (62)	60
AdCA/Metanol/agua	82/ 26(desorden)	440	3505	75/18 (92)	62
AdCA/Agua	18	335	7389	43	Desorden
AdCOOMe s.h. (éster de metilo)	0	506	3613	0	60

Tabla 2.58 Enlaces de hidrógeno para las diferentes estructuras cristalinas de AdCA y el ester de metilo obtenidas.

Crystal	Donante – H···Aceptor	D···A/Å	<DHA(°)
AdCA/diclorometano	O24a-H···O(agua) ^I	2.551(4)	157(5)
	O7-H···O26 ^I	2.848(3)	156(4)
	N25-H···O24b ^{II}	3.028(4)	1701(4)
	O(agua) ^I -H(A)···O12 ^I	2.800 (5)	157(5)
	O(agua) ^{III} -H(B)···O26 ^I	2.768(4)	153(6)
AdCA/Metanol	O(Metanol) ^I -H···O26 ^I	2.615(5)	165(5)
	O24a-H ^I ···O(Metanol) ^{II}	2.593(4)	151(3)
	O7-H···O(Metanol) ^{III}	2.753(3)	154(6)
	N25-H···O24b	3.071(3)	163(3)
	O(agua) ^I -H(A)···O7	3.283(3)	172(5)
	O(agua) ^I -H(B)···O12	2.752(3)	168(6)
	O(Metanol) ^{IV} -H(B)···O12	2.685(3)	176(3)
	AdCA/Agua	O(agua) ^I -H(A)···O12 ^I	2.814 (9)
O(agua) ^I -H(B)···O7 ^I		2.852(9)	145(4)
O(agua) ^{II} -H(A)···O7 ^{II}		2.974(10)	161(7)
O(agua) ^{II} -H(B)···O12 ^{II}		2.964(11)	170(6)
O7-H ^I ···O26 ^{II}		2.652(9)	160
O12-H ^I ···O(agua) ⁱ		2.610(8)	154
O24a-H ^I ···O12 ^{II}		2.717	132
O7-H ^{II} ···O26 ^I		2.783(9)	149
O12-H ^{II} ···O26 ^I		2.766(9)	174
AdCOOMe, s.h.		O7-H ^I ···O26 ^{II}	2.840(4)
	O12-H ^I ···O26 ^{III}	2.847(4)	168(4)
	N25-H ^I ···O24b ^{IV}	3.290(4)	176(3)

En el cristal obtenido AdCA/diclorometano, cada molécula de ácido biliar interacciona mediante enlaces de hidrógeno con tres moléculas de agua vecinas, así como con otras cuatro unidades de sal biliar (Figura 2.113).

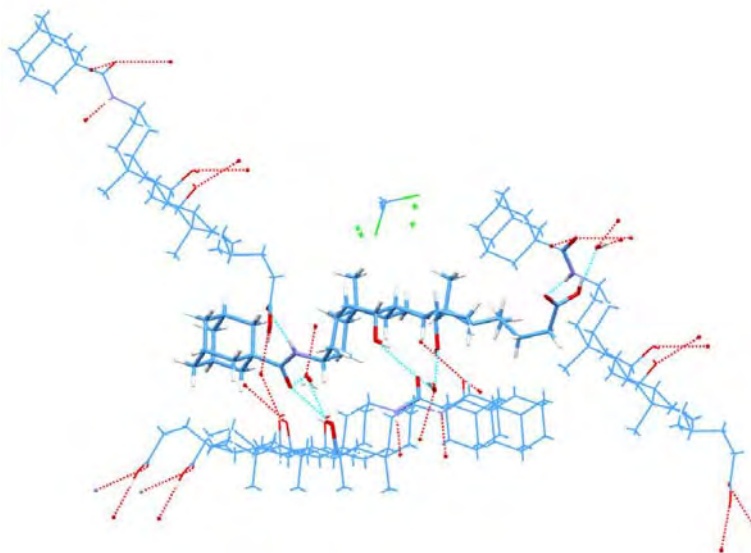


Fig. 2.113 Red de enlaces de hidrógeno en el cristal AdCA:diclorometano.

En el cristal AdCA/Metanol cada molécula de ácido biliar interacciona mediante enlaces de hidrógeno con cuatro moléculas de metanol vecinas, así como con una de agua. Hecho bastante atípico es que las moléculas del ácido biliar no interactúan directamente, sino que lo hacen a través de las moléculas huésped que actúan como puente (Figura 2.114).

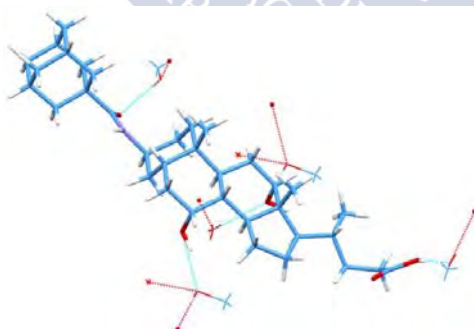


Fig. 2.114 Red de enlaces de hidrógeno en el cristal AdCA:metanol.

La celda unidad del cristal recrystalizado en 2-butanol contiene dos unidades de ácido biliar. Cada una de ellas se enlaza mediante de enlaces de hidrógeno con dos moléculas de agua que se sitúan entre ambas y otra molécula de agua en la cola de una de ellas, formando, a mayores, también enlaces de hidrógeno directos con otra unidad de ácido biliar (Figura 2.115).

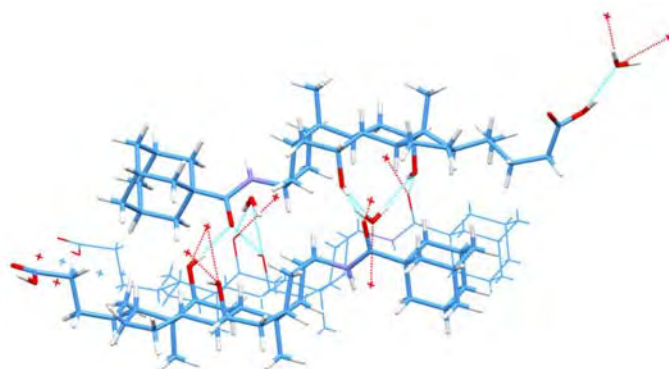


Fig. 2.115 Red de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar: a) AdCA:agua.

En el cristal del AdCOOMe en anisol, al no disponer en la misma ningún huésped, se observa que la red de enlaces de hidrógeno es mucho más sencilla que las anteriores. Se produce una interacción directa mediante enlaces de hidrógeno de una unidad de derivado biliar con otras dos unidades vecinas, mediante sus caras polares (Figura 2.116).

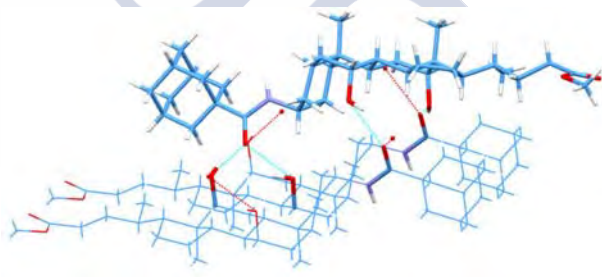


Fig. 2.116 Red de enlaces de hidrógeno entre las unidades de ácido biliar en el cristal AdCOOMe:s.h.

2.4 COMENTARIOS ADICIONALES

Se han obtenido 23 estructuras cristalinas con diferentes derivados de ácido cólico, AdCA (3), AdCH₂CA (7), NbCH₂CA (5) AdCH₂CH₂CA(4), AdCOOMe(1), AdSuccCOOMe(1), BocCysTrtCOOMe (1) y PyrCOOMe(1). Los derivados tienen en común el aumento producido en su superficie hidrófoba lo que les proporciona características particulares. El primer hecho destacable es que al contrario de lo que sucedía para el ácido cólico, en el cual sólo un 11 % de los sistemas encontrados eran ortorrómbicos y la mayoría eran monoclinicos, esta tendencia se invierte y, de todos los sistemas obtenidos, sólo uno de ellos es monoclinico mientras que todos los restantes son ortorrómbicos. Este hecho los acerca más hacia el comportamiento de los ácidos biliares naturales más hidrófobos, como puede ser el ácido desoxicólico. Si bien hay que decir que los complejos de ácido cólico con alcoholes alifáticos de cadena corta eran también ortorrómbicos⁵¹, pero con empaquetamientos cruzados.

Analizando la conformación del anillo D se observa que existe una gran diferencia entre los compuestos en su forma ácida o como éster de metilo, ya que los primeros siempre tienden a conformaciones en *media silla* o *media silla distorsionada*, mientras que para los segundos predomina una conformación en *sobre*.

El empaquetamiento de la red cristalina se suele dar en bicapas con el interior hidrófilo y el exterior hidrófobo, cuando los huéspedes son agua, acetona, DMSO, 2-propanol o 2-butanol, aunque para el caso NbCH₂CA:2-propanol y 2-butanol se produce una inversión de la orientación de las unidades biliares (de *antiparalela* a *paralela*), obteniéndose los dos únicos casos de sistemas monoclinicos. Se evidencia claramente la existencia de sistemas dinámicos que puede transformarse en función del huésped alojado con pequeñas variaciones estructurales y de los sistemas de redes de hidrógeno. También hemos obtenido una serie de estructuras cruzadas que coincidían con una variación del huésped alojado, caso de la acetofenona, o cuando el grupo hidrófobo incorporado está lo suficientemente separado del núcleo esteroideo, Debemos destacar que en el caso del AdCA todas las estructuras obtenidas fueron del tipo cruzado, tanto con la presencia de huéspedes como en ausencia de los mismos.

Las estructuras polimórficas encontradas para estos derivados de ácido cólico se han visto modificadas también por los enlaces de hidrógeno, encontrándonos con secuencias de tipo cíclico, helicoidal o la combinación de ambos, y por la conformación de la cadena lateral en las disposiciones *gauche* y *trans*. La capacidad de formar diferentes redes de enlaces de hidrógeno les proporciona a estos compuestos una gran capacidad de inclusión.

Se pueden obtener dos conclusiones de los resultados obtenidos.

Como era de esperar, *el empaquetamiento de los ácidos biliares modificados*, en los cuales la superficie hidrófoba del ácido biliar de partida ha sido aumentada mediante la incorporación de grupos hidrófobos en la posición C3, *es altamente dependiente de la naturaleza del grupo incorporado*. Esto es evidente cuando los cristales son comparados con los obtenidos con AdCA (en los que el residuo adamantilo es unido al núcleo esteroideo por la posición C3 sin ningún espaciador)⁴³.

Por otro lado, *la naturaleza del disolvente es un factor importante a la hora de producir cambios significativos en el ordenamiento estructural*, dando origen a la formación de diferentes redes de enlaces de hidrógeno. Aunque los disolvente (acetona, DMSO, metanol, 2-propanol, 2-butanol...) poseen una geometría muy parecida, tienen un comportamiento y capacidad de formar enlaces de hidrógeno bastantes diferentes. Esto es debido por ejemplo a la capacidad de los alcoholes a poder actuar como donante y aceptor mientras que los otros casos, al ser disolventes dipolares apróticos, sólo pueden actuar como aceptores en los enlaces de hidrógeno. Esta característica produce que los

huéspedes como la acetona y el DMSO, los cuales están unidos por solo un enlace de hidrógeno, posean una mayor movilidad de acomodación en la cavidad formada durante el proceso de cristalización del sustrato derivado de ácido biliar, a pesar de que la localización final esté relacionada con las interacciones hidrófobas.

Sin embargo, cuando un huésped como el 2-propanol se une mediante dos enlaces de hidrógeno, la movilidad del giro alrededor del enlace C-O se ve drásticamente reducida. La diferencia en el comportamiento puede ser fácilmente visualizada si comparamos la movilidad que tendrían dos niños, uno de ellos sujeto por una mano a un adulto mientras que el otro estuviese sujeto por dos adultos en ambas manos (véase Figura 2.117). Estos hechos sugieren que en el primer caso las interacciones ácido biliar-ácido biliar son las que conducen a la formación de la estructura del cristal, la posibilidad de incorporar un huésped con un punto de unión facilitaría su acomodación a la cavidad mientras que cuando se produce la incorporación del segundo supuesto es necesaria una reestructuración de la estructura cristalina.

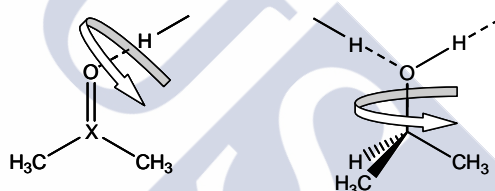


Fig. 2.117. Representación esquemática de la diferente movilidad para un huésped unido mediante un punto (DMSO -X≡S-, acetona - X≡C-; izquierda) y dos puntos de unión (2-propanol, 2-butanol; derecha). La imagen es una simplificación de otros muchos modos de vibración posibles.

Estos hechos sugieren que, en el primer caso, las interacciones ácido biliar-ácido biliar son las que dirigen la formación de la estructura cristalina, en la que un huésped con un único punto de anclaje puede acomodarse fácilmente. Esta afirmación está reforzada por el hecho de que el huésped forma su enlace de hidrógeno con el grupo amida (que actúa sólo como donante). Sin embargo, en el segundo caso, las interacciones ácido biliar-huésped se hacen más importantes y son las que dirigen la formación de la estructura cristalina, dado que ahora son dos los enlaces de hidrógeno los implicados y la acomodación de huéspedes con dos puntos de anclaje requiere necesariamente una localización más específica de las moléculas anfitrionas de ácido biliar. Esta idea está reforzada por el hecho de que los grupos metilos estén o no interdigitados.

Posiblemente debido al menor volumen y carácter hidrófobo del residuo norbornilo comparación con el adamantilo, en los cristales NbCH₂-CA/2-propanol y NbCH₂-CA/2-butanol, el alcohol (actuando como receptor) puede formar un enlace de

hidrógeno con el enlace amida, mientras que en el cristal AdCH₂-CA/2-butanol no existe este enlace de hidrógeno.

En una reciente revisión bibliográfica, Bortolini *y col.*¹¹⁶ analizan las principales variables que pueden tener una principal importancia en la optimización de los procesos enantioselectivos cuando los derivados de ácido biliar son usados para tal fin. Entre estas variables a tener en cuenta se pueden destacar: el número de grupos hidroxilo, la influencia de la orientación de estos grupos (α o β), la influencia de la cadena lateral, la sustitución de estos grupos hidroxilo por otros grupos o funciones orgánicas y la extensión de la cara hidrofóbica o hidrofílica. Hay que reseñar que no todas estas variables han sido analizadas sistemáticamente, por lo que sería necesario un estudio en mayor profundidad para la mayoría de ellas. En este contexto, cobra especial relevancia la capacidad de algunos compuestos aquí sintetizados para la enantiodiferenciación de la molécula huésped. Así el AdCH₂CA resuelve en el enantiómero S del 2-butanol cuando se obtiene el cristal en este disolvente y el NbCH₂CA resuelve el R del 2-pentanol. Por su parte la molécula de AdCA no resuelve el 2-butanol ni el 2-pentanol. Estos hechos se resumen en la Tabla 2.59. Estas diferencias, que podemos atribuir en parte a la separación del grupo hidrofóbico del grupo amida que lo une al núcleo esteroide, así como la voluminosidad del grupo hidrofóbico incorporado, refrendan que es posible diseñar derivados de ácidos biliares que resuelvan específicamente un enantiómero de un disolvente racémico.

Tabla 2.59. Capacidad de enantioresolución de los derivados AdCA, AdCH₂CA y NbCH₂CA.

Derivado	2-butanol	2-pentanol
AdCA	no	no
AdCH ₂ CA	sí	no
NbCH ₂ CA	no	sí

La orientación del átomo de carbono C24 del grupo carboxílico de la cadena lateral está mayoritariamente orientada hacia la cara α de la molécula (valores negativos de la distancia $d_{C24/n}$), lo que ocurre en 17 de los 24 cristales estudiados. Respecto al plano vertical, la ubicación del grupo se distribuye al 50% hacia la izquierda o derecha del mismo. Finalmente, los valores de la distancia entre los átomos de carbono C24 y C17 (en el que está anclada la cadena lateral), d_{17-24} , se agrupan bien en torno al valor medio de 4.47 ± 0.09 Å (17 cristales), que significa que la cadena está parcialmente plegada, o bien en torno a 5.03 ± 0.04 Å (7 cristales) que conlleva que la cadena está completamente estirada.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Norton, D. A. & Haner, B. Crystal data. I. Some bile acid derivatives. *Acta Cryst.* 19, 477-478 (1965).
- 2 Lessinger, L. Cholic acid monohydrate, C₂₄H₄₀O₅.H₂O. *Cryst. Struct. Commun.* 11, 1787-1792 (1982).
- 3 Shibakami, M., Tamura, M. & Sekiya, A. X-Ray Crystallographic Studies and Molecular Calculations on 1: 1 Inclusion Complexes of Cholic Acid with Acetophenone and Its Derivatives. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 22, 155-168 (1995).
- 4 Lessinger, L. & Low, B. W. Crystal structure and hydrogen-bonding system of cholic acid hemihydrate, C₂₄H₄₀O₅.1/2H₂O. *J. Crystallographic Spectroscopic Res.* 23, 85 (1993).
- 5 Alvarez, M. *et al.* Crystal structure of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and their two 3b,7a- and 3b,7b-dihydroxy epimers. *Steroids* 72, 535-544 (2007).
- 6 Jover, A. *et al.* Successful prediction of the hydrogen bond network of the 3-oxo-12a-hydroxy-5b-cholan-24-oic acid crystal from resolution of the crystal structure of deoxycholic acid and its three 3,12-dihydroxy epimers. *Steroids* 69, 379-388 (2004).
- 7 Kato, K. *et al.* Excellent enantio-selective enclathration of (2R,3S)-3-methyl-2-pentanol in channel-like cavity of 3-epideoxycholic acid, interpreted by the four-location model for chiral recognition. *Chem. Commun.*, 2872-2873 (2003).
- 8 Jover, A. *et al.* Crystal structure of 3b,12a-dihydroxy-5b-cholan-24-oic acid (iso-deoxycholic acid). *J. Mol. Struct.* 523, 299-307 (2000).
- 9 Miyake, Y., Hirose, J., Hasegawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. Novel channel-type inclusion compounds of 3-epiursodeoxycholic acid. *Chem. Commun.*, 111-112 (1998).
- 10 Kato, K., Sugahara, M., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. Drastic increase in the flexibility of open host frameworks of a steroidal host compound upon shortening its spacer. *Eur. J. Org. Chem.*, 981-994 (2004).
- 11 Kato, K., Sugahara, M., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. Systematic structural study of asymmetric supramolecular assembly by a series of bile acid derivatives with different side-chain lengths. *Crystal Growth Design* 4, 263-272 (2004).
- 12 Kato, K. *et al.* Interpretation of enantioresolution in nordeoxycholic acid channels based on the four-location model. *Chirality* 15, 53-59 (2003).
- 13 Sugahara, M., Sada, K. & Miyata, M. A robust structural motif in inclusion crystals of nor-bile acids. *Chem. Commun.*, 293-294 (1999).
- 14 Sada, K. *et al.* First columnar monolayer structure of bile acids inclusion crystal. Inclusion compounds of 23-nordeoxycholic acid. *Chem. Lett.*, 31-32 (1998).
- 15 Sada, K., Sugahara, M., Kato, K. & Miyata, M. Controlled Expansion of a Molecular Cavity in a Steroid Host Compound. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4386-4392 (2001).
- 16 Sada, K., Matsuo, A. & Miyata, M. Novel molecular arrangement in asymmetric bilayered crystals of the inclusion compounds of 3a,12a,24-trihydroxy-5b-cholane. *Chem. Lett.*, 877-878 (1995).

- 17 Sada, K., Kondo, T., Yasuda, Y., Miyata, M. & Miki, K. Interpretation of variable inclusion abilities of cholic acid and its derivatives on the basis of the crystal structure of 5 β -petromyzonol. *Chem. Lett.*, 727-730 (1994).
- 18 Takemoto, K. & Miyata, M. Polymerization of vinyl and diene monomers in canal complexes. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem.* C18, 83-107 (1980).
- 19 Miyata, M., Kitahara, Y., Osaki, Y. & Takemoto, K. Inclusion polymerization of various diene monomers in apocholic acid canals. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* 2, 391-398 (1984).
- 20 Miyata, M. *et al.* Inclusion compounds of methyl esters of cholic and deoxycholic acids; structure of a 1:1 complex between methyl cholate and methanol. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1140-1141 (1987).
- 21 Miki, K. *et al.* Structures of 1 : 1 addition compounds of methyl cholate with methanol and with 2 - propanol. *Acta Cryst.* C48, 503-507 (1992).
- 22 Scott, J. L. Solid-vapor reactions of cholic acid and methyl cholate with acetonitrile: structures and reaction kinetics. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 495-502 (1995).
- 23 Virtanen, E., Nissinen, M., Suontamo, R., Tamminen, J. & Kolehmainen, E. Comparison of epimeric methyl lithocholate and methyl iso-lithocholate molecules: single crystal X-ray structure of methyl lithocholate, ab initio HF/6-31G optimized structures and experimental and calculated DFT/B3LYP ¹³C NMR chemical shifts. *J. Mol. Struct.* 649, 207-218 (2003).
- 24 Aoki, Y., Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. Enantioresolution of aliphatic alcohols by lithocholamide. *Enantiomer* 5, 95-104 (2000).
- 25 Briozzo, P., Kondo, T., Sada, K., Miyata, M. & Miki, K. Structures of three inclusion compounds of cholamide with either (S)-enantiomer, (R)-enantiomer or an optically resolved mixture of butan-2-ol. *Acta Cryst.* B52, 728-733 (1996).
- 26 Sada, K., Kondo, T., Miyata, M., Tamada, T. & Miki, K. A novel molecular channel with a hydrogen bond 'hook'; inclusion phenomena of cholamide and the crystal structure of a 1:1 complex of cholamide and 1,4-dioxane. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 753-755 (1993).
- 27 Sada, K., Kondo, T., Miyata, M. & Miki, K. Inclusion Crystals of Cholic Acid and Cholamide with Alcohols : Importance of Hydrogen Bond " Double Hooks ". *Chem. Mater.* 6, 1103-1105 (1994).
- 28 Sada, K., Kondo, T. & Miyata, M. Resolution of aliphatic alcohols by hydrogen bond "double hooks" of cholamide inclusion compounds. *Tetrahedron: Asymmetry* 6, 2655-2656 (1995).
- 29 Sada, K., Kondo, T. & Miyata, M. Channel-type inclusion crystal with hydrogen bond 'hooks' of deoxycholamide. *Supramol. Chem.* 5, 189-191 (1995).
- 30 Sada, K., Matsuura, Y. & Miyata, M. Hydrogen bond 'triple hooks' in an inclusion crystal of cholamide with aniline. Structural difference of inclusion crystals of cholic acid and cholamide with same guest. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 276, 121-127 (1996).
- 31 Miyata, M., Sada, K., Yasuda, Y. & Miki, K. Hydrogen bonding networks in bilayered crystals composed of facially amphiphilic compounds. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 240, 183-186 (1994).

- 32 Sada, K., Hishikawa, Y., Kondo, T. & Miyata, M. Specific inclusion of water by N-methyldeoxycholamide revealed by the crystal structure of the hemihydrate. *Chem. Lett.*, 2113-2116 (1994).
- 33 Sada, K. *et al.* Functionalization of inclusion cavities of bile acid hosts. Channel-type inclusion compounds of cholamide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 71, 1931-1937 (1998).
- 34 Hishikawa, Y., Sada, K., Watanabe, R., Miyata, M. & Hanabusa, K. A novel class of organogelator based on N-isopropylcholamide and the first observation of fibrous colloidal aggregates. *Chem. Lett.*, 795-796 (1998).
- 35 Hishikawa, Y., Watanabe, R., Sada, K. & Miyata, M. Molecular arrangements in chiral sheets of N-alkylcholamides bilayered crystals. *Chirality* 10, 600-618 (1998).
- 36 Hishikawa, Y., Aoki, Y., Sada, K. & Miyata, M. Selective inclusion phenomena in lithocholamide crystal lattices; design of bilayered assemblies through ladder-type hydrogen bonding network. *Chem. Lett.*, 1289-1290 (1998).
- 37 Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. Water-participation in the formation of a triangular pillar-like assembly in deoxycholamide inclusion crystals. *J. Chem. Res. (S)*, 738-739 (1998).
- 38 Hishikawa, Y., Sada, K. & Miyata, M. Extremely specific recognition of ethylene glycol in three-leaved building blocks of N-methyldeoxycholamide. *Supramol. Chem.* 11, 101-108 (1999).
- 39 Yoswathananont, N., Kita, H., Tohnai, N., Sada, K. & Miyata, M. A novel three-component pseudo-polymorphism in the cholamide inclusion crystals promoted by the combination of organic guest and water. *Chem. Lett.*, 1234-1235 (2002).
- 40 Brunskill, A. P. J., Lalancette, R. A. & Thompson, H. W. (+)-3-Oxo-5 α -cholan-24-oic acid: catemeric hydrogen bonding in a steroidal keto acid. *Acta Cryst.* C55, 419-422 (1999).
- 41 Ryu, E.-H., Ellern, A. & Zhao, Y. High guest inclusion in 3 β -amino-7 α ,12 α -dihydroxycholan-24-oic acid enabled by charge-assisted hydrogen bonds. *Tetrahedron* 62, 6808-6813 (2006).
- 42 Soto Tellini, V. H. Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* (2006).
- 43 Soto Tellini, V. H. *et al.* New Lamellar Structure Formed by an Adamantyl Derivative of Cholic Acid. *J. Phys. Chem. B* 110, 13679-13681 (2006).
- 44 Soto Tellini, V. H. *et al.* Supramolecular structures generated by a *p*-*tert*-butylphenyl-amide derivative of cholic acid. From vesicles to molecular tubes. *Adv. Mater.* 19, 1752-1756 (2007).
- 45 Johnson, P. L. & Schaefer, J. P. Crystal and molecular structure of an addition compound of cholic acid and ethanol. *Acta Crystal.* 28, 3083-3088 (1972).
- 46 Altona, C., Geise, H. J. & Romers, C. Conformation of nonaromatic ring compounds. XXV. Geometry and conformation of ring D in some steroids from x-ray structure determinations. *Tetrahedron* 24, 13-32 (1968).
- 47 Miyata, M., Shibakami, M., Goonewardena, W. & Takemoto, K. Inclusion compounds of cholic acid with a variety of organic substances. *Chem. Lett.*, 605-608 (1987).
- 48 Miki, K. *et al.* New channel type inclusion compound of steroidal bile acid. Structure of 1:1 complex between cholic acid and acetophenone. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6594-6596 (1988).

- 49 Miyata, M. *et al.* Guest-responsive structural changes in cholic acid intercalation crystals. *Nature* 343, 446-447 (1990).
- 50 Miki, K. *et al.* Crystal structure of cholic acid with no guest molecules. *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* C46, 2442-2445 (1990).
- 51 Jones, E. L. & Nassimbeni, L. R. Crystal and molecular structures of the inclusion compounds of cholic acid with methanol, ethanol and 1-propanol. *Acta Crystal.* B46, 399-405 (1990).
- 52 Miki, K., Kasai, N., Shibakami, M., Takemoto, K. & Miyata, M. New Chiral Recognition Ability of a Steroidal Bile Acid; Direct Evidence for Efficient Optical Resolution of Racemic Lactones by Cholic Acid Inclusion Crystals. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1757 (1991).
- 53 Miyata, M., Sada, K., Hori, S. & Miki, K. Intercalation phenomena and polymorphism of cholic acid crystals. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 219, 71-74 (1992).
- 54 Caira, M. R., Nassimbeni, L. R. & Scott, J. L. Selective Inclusion by Cholic Acid. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 612 (1993).
- 55 Miyata, M., Sada, K., Hirayama, K., Yasuda, Y. & Miki, K. Guest-dependent conformations of side chains in cholic acid inclusion compounds. *Supramol. Chem.* 2, 283-288 (1993).
- 56 Imashiro, F., Kuwahara, D. & Terao, T. Carbon-13 solid-state NMR study on populations, conformations, and molecular motions of g-valerolactone enantiomers enclathrated in the chiral cholic acid host. *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. 2*, 1759-1763 (1993).
- 57 Nakano, K., Sada, K. & Miyata, M. Inclusion Compounds of Cholic Acid with Various Hydrocarbons and the Crystal Structure of a 1:1 Complex of Cholic Acid and Benzene. *Chem. Lett.*, 137 (1994).
- 58 Shibakami, M. & Sekiya, A. Crystal Structures of Cholic Acid-Aniline and -3-Fluoroaniline Inclusion Compounds; Fluorine Atom Effect on Channel and Hydrogen Bonding Pattern. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 429-430 (1994).
- 59 Shibakami, M. & Sekiya, A. Structures of 1: 1 Inclusion Complexes of Cholic Acid with Fluoroethanols; Conformational Analysis of Fluoroethanols in the Host Cavity. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 18, 397 (1994).
- 60 Caira, M. R., Nassimbeni, L. R. & Scott, J. L. Crystal structure and multiphase decomposition of a novel cholic acid inclusion compound with mixed guests. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1403-1405 (1994).
- 61 Caira, M. R., Nassimbeni, L. R. & Scott, J. L. Inclusion Compounds of Cholic Acid with Aliphatic Esters. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 623 (1994).
- 62 Caira, M. R., Nassimbeni, L. R. & Scott, J. L. Cholic acid inclusion compounds with ketone guests. *J. Chem. Cryst.* 24, 783-791 (1994).
- 63 Nakano, K., Sada, K. & Miyata, M. Guest-participating Reversion of Molecular Arrangements in Asymmetric Multibilayers of Cholic Acid Inclusion Crystals. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 953 (1995).
- 64 Cerrini, S., Pochetti, G., Gallese, F. & Possagno, E. The monoclinic phase of the 2/1 inclusion compound between deoxycholic acid and o-xylene. *Acta Crystal.* C49, 1087-1092 (1993).

- 65 Shibakami, M., Tamura, M. & Sekiya, A. Topological and Nontopological Rearrangement in Crystal Lattice of Cholic Acid Inclusion Complex Induced by Guest Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4499-4505 (1995).
- 66 Shibakami, M., Tamura, M. & Sekiya, A. Crystal structures of inclusion complexes of cholic acid with aniline, mono- and difluorinated anilines: guest information expressed by molecular assembly. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 22, 299-311 (1995).
- 67 Scott, J. L. Solid-state formation of an inclusion compound of cholic acid with p-toluidine. *J. Chem. Crystall.* 26, 185-189 (1996).
- 68 Sada, K., Maeda, T. & Miyata, M. Chiral discrimination of 1-phenylethylamine by diastereomeric salt formation with bile acids. Crystal structures of cholic acid salts with (R)- and (S)-1-phenylethylamine. *Chem. Lett.*, 837-838 (1996).
- 69 Nakano, K., Sada, K. & Miyata, M. Novel additive effect of inclusion crystals on polymorphs-cholic acid crystals having different hydrogen-bonded networks with the same organic guest. *Chem. Commun.*, 989-990 (1996).
- 70 Nakano, K., Sada, K. & Miyata, M. Reversible layer sliding in cholic acid crystals. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 276, 129-132 (1996).
- 71 Scott, J. L. Inclusion compounds of cholic acid with mixed guests. *Supramolecular Chemistry* 7, 201-207 (1996).
- 72 Caira, M. R., Nassimbeni, L. R. & Scott, J. L. Cholic acid inclusion compounds with aromatic guests - solid-vapor reactions. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A* 276, 113-120 (1996).
- 73 Nakano, K., Tani, K., Sada, K. & Miyata, M. Molecular architecture of steroidal acids and their derivatives. Selective acquisition of polymorphic inclusion crystal of cholic acid. *Progress in Colloid & Polymer Science* 106, 249-251 (1997).
- 74 Scott, J. L. Cholic acid inclusion compounds with aromatic ketone guests. Structure and reaction kinetics. *Supramol. Chem.* 8, 231-239 (1997).
- 75 Scott, J. L. Cholic acid inclusion compounds with aromatic guests. Structures and decomposition kinetics. *Supramolecular Chemistry* 8, 241-251 (1997).
- 76 Sada, K., Yoshikawa, K. & Miyata, M. New ammonium carboxylate host compounds screened by combinatorial chemistry. *Chemical Communications (Cambridge)*, 1763-1764 (1998).
- 77 Miyata, M., Sada, K. & Miyake, Y. Combinatorial chemistry of inclusion compounds by using steroids. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology, Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals* 313, 173-178 (1998).
- 78 Gdaniec, M. & Polonski, T. Generation of Chirality in Guest Aromatic Ketones Included in the Crystals of Steroidal Bile Acids. *Journal of the American Chemical Society* 120, 7353-7354 (1998).
- 79 Gdaniec, M., Milewska, M. J. & Polonski, T. Enantioselective inclusion complexation of N-nitrosopiperidines by steroidal bile acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 392-395 (1999).
- 80 Nowak, E., Gdaniec, M. & Polonski, T. The crystal structure of the 2:1 cholic acid-benzophenone clathrate. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 37, 155-169 (2000).
- 81 Dastidar, P. Crystal structure of the inclusion complex of cholic acid with 4-aminopyridine: a novel supramolecular architecture of cholic acid. *CrystEngComm* (2000).

- 82 Bertolasi, V., Bortolini, O., Fogagnolo, M., Fantin, G. & Pedrini, P. Enantioselective inclusion in bile acids: resolution of cyclic ketones. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 1479-1483 (2001).
- 83 Nakano, K., Katsuta, M., Sada, K. & Miyata, M. Conformational polymorphism in inclusion crystals of cholic acid with ethyl acetate. *CrystEngComm* 11, 1-2 (2001).
- 84 Yoswathananont, N. *et al.* A novel host framework of cholic acid inclusion crystals by slide and flip of the layers. *CrystEngComm*, 1-4 (2001).
- 85 Polonski, T., Szyrszyng, M., Gdaniec, M., Nowak, E. & Herman, A. Absolute sense of twist of the benzil molecule in its enantiomorphous crystals and inclusion complexes with optically active hosts. *Tetrahedron: Asymmetry* 12, 797-800 (2001).
- 86 Gdaniec, M., Bytner, T., Szyrszyng, M. & Polonski, T. Inclusion compounds of nitrosobenzenes with cholic acid and deoxycholic acid. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 40, 243-247 (2001).
- 87 Nakano, K., Sada, K., Kurozumi, Y. & Miyata, M. Importance of packing coefficients of host cavities in the isomerization of open host frameworks: guest-size-dependent isomerization in cholic acid inclusion crystals with monosubstituted benzenes. *Chem. Eur. J.* 7, 209-220 (2001).
- 88 Nakano, K., Sada, K. & Miyata, M. Inclusion polymerization in polymorphic crystals of cholic acid. *Polymer J.* 33, 172-176 (2001).
- 89 Miyata, M., Tsuzuki, T., Noma, F., Takemoto, K. & Kamachi, M. Functional monomers and polymers. 161. Inclusion polymerization in deoxycholic acid and apocholic acid canals: decisive role of a relative size between a canal and a monomer. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 9, 45-50 (1988).
- 90 Miyata, M., Morioka, K. & Takemoto, K. Functional monomers and polymers. XXXVIII. Postirradiation polymerization of 2,3-dimethylbutadiene in deoxycholic acid canal complexes. *J. Polymer Sci., Polymer Chem. Ed.* 15, 2987-2996 (1977).
- 91 Chikada, M., Sada, K. & Miyata, M. Intercalation and polymerization in chenodeoxycholic acid channels with retention of a crystalline state. *Polymer J.* 31, 1061-1064 (1999).
- 92 Goonewardena, W., Miyata, M. & Takemoto, K. INCLUSION POLYMERIZATION OF NITRILE MONOMERS BY USING BILE ACIDS AND THEIR METHYL ESTERS. *Chem. Express* 6, 407 (1991).
- 93 Goonewardena, W., Miyata, M. & Takemoto, K. Relative Size Effect on the Polymerization with Methyl Cholate Inclusion Compounds. *Polym. J.* 23, 1405-1408 (1991).
- 94 Sada, K. *et al.* Molecular recognition of medium-size lactones by enclathration of cholic acid. *Supramolecular Chemistry* 13, 35-44 (2001).
- 95 Szyrszyng, M. *et al.* Circular Dichroism Spectra of the Achiral Guest N-Aryl-N-nitrosamines Included in the Crystal Host Matrices of Cholic Acid. *Journal of Organic Chemistry* 66, 7380-7384 (2001).
- 96 Sugahara, M., Kazuki Sada, J. H. & Miyata, M. Inclusion abilities of bile acids with different side chain length. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology, Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals* 356, 155-162 (2001).
- 97 Yoswathananont, N., Sadaand, K. & Miyata, M. Inclusion compounds of cholic acid with large aliphatic alcohols. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology, Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals* 389, 47-51 (2002).

- 98 Oguchi, T. *et al.* Elucidation of solid-state complexation in ground mixtures of cholic acid and guest compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 887-891 (2002).
- 99 Yoswathananont, N., Sada, K., Miyata, M., Akita, S. & Nakano, K. Dependence of selective enclathration on types of cholic acid crystals. *Org. Biomol. Chem.* 1, 210-214 (2003).
- 100 Nakano, K. *et al.* Mechanism of selective and unselective enclathration by a host compound possessing open, flexible host frameworks. *Eur. J. Org. Chem.*, 2428-2436 (2003).
- 101 Kaneko, T., Ichikawa, A., Gong, J. P. & Osada, Y. Formation of giant needle-like polycation-bile acid complexes. *Macromol. Rapid Commun.* 24, 789-792 (2003).
- 102 Szyrszyng, M., Nowak, E., Gdaniec, M., Milewska, M. J. & Polonski, T. Optical activity of benzophenone and thiobenzophenone generated by spontaneous crystallization and inclusion complexation with cholic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 103-107 (2004).
- 103 Nakano, K., Akita, S., Yoswathananont, N., Sada, K. & Miyata, M. Relationship between Separation Behavior and Structural Flexibility in Inclusion Crystal of Cholic Acid. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 48, 181-184 (2004).
- 104 Kato, K., Inoue, K., Tohnai, N. & Miyata, M. Helical Tape Assemblies in Inclusion Crystals of Bile Acids and Their Derivatives. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 48, 61-67 (2004).
- 105 Szyrszyng, M., Nowak, E., Gdaniec, M., Milewska, M. J. & Polonski, T. Optical activity of the guest azobenzene molecule generated by inclusion complexation with steroidal bile acids. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 3257-3261 (2004).
- 106 Nakano, K. *et al.* Organic intercalation material: reversible change in interlayer distances by guest release and insertion in sandwich-type inclusion crystals of cholic acid. *Chemistry--A European Journal* 11, 1725-1733 (2005).
- 107 Yoswathananont, N. *et al.* The effect of a host-guest hydrogen bond on the inclusion of alcoholic guests in the host cavities of cholamide. *European Journal of Organic Chemistry*, 5330-5338 (2005).
- 108 Kato, K., Tohnai, N. & Miyata, M. Hierarchical prediction process of cholic acid crystal structures based on characteristic helical assemblies. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 440 (2005).
- 109 Bertolasi, V., Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M. & Pretto, L. Inclusion of cyclic carbonates by a cholic acid host: structure and enantioselection. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 308-312 (2006).
- 110 Wicher, B. & Gdaniec, M. Cholic acid-quinoxaline (2/1). *Acta Crystallographica Section E* 64, 1-16 (2008).
- 111 Wahle, M. C., Fanwick, P. E. & Byrn, S. R. Cholamide Dihydrate. *Acta Crystallographica Section C* 53, 480-482, doi:10.1107/S0108270196014382 (1997).
- 112 Giglio, E., Mazza, F. & Scaramuzza, L. Crystal structure of the phenylacetylene-choleic acid. *J. Inclusion Phenom.* 3, 437-445 (1985).
- 113 Padmanabhan, K., Ramamurthy, V. & Venkatesan, K. Structure reactivity correlation in inclusion complexes: deoxycholic acid-thiocamphenilone. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* 5, 315-323 (1987).
- 114 Coiro, V. M., Mazza, F., Pochetti, G., Giglio, E. & Pavel, N. V. The structure of the 2/1 'channel' inclusion compound between deoxycholic acid and pinacolone, 2C₂₄H₄₀O₄.C₆H₁₂O. *Acta Crystal. C* 41, 229-232 (1985).

- 115 Limmatvapirat, S., Yamaguchi, K., Yonemochi, E., Oguchi, T. & Yamamoto, K. A 1:1 deoxycholic acid-salicylic acid complex. *Acta Crystal.* C53, 803-805 (1997).
- 116 Bortolini, O., Fantin, G. & Fogagnolo, M. Bile acid derivatives as enantiodifferentiating host molecules in inclusion processes. *Chirality* 17, 121-130 (2005).
- 117 Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M. & Maietti, S. Resolution of organic racemates via host-guest enantioselective inclusion complexation in bile acid derivatives. *ARKIVOC*, 40-48 (2006).
- 118 Miyata, M., Shibakami, M. & Takemoto, K. Optical resolution of lactones by an inclusion method using cholic acid as the host. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 655-656 (1988).
- 119 Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M., Medici, A. & Pedrini, P. Optical resolution of sulfoxides by inclusion in host dehydrocholic acid. *Chem. Commun.*, 365-366 (2000).
- 120 Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M., Medici, A. & Pedrini, P. Resolution of unfunctionalized epoxides by cholic acid inclusion compounds. *Chem. Lett.*, 1246-1247 (2000).
- 121 Giglio, E. & Quagliata, C. Side-chain and ring D conformation in cholanic acids. *Acta Crystal.* B31, 743-746 (1975).
- 122 Candeloro De Sanctis, S. *et al.* The hexagonal phase of the 3:2:1 canal complex between deoxycholic acid, ethanol and water: an inclusion compound with hydrophilic channels. *Acta Crystal.* B34, 1928-1933 (1978).
- 123 Soto Tellini, V. H., Jover, A., Galantini, L., Meijide, F. & Vázquez Tato, J. Crystal structure of the supramolecular linear polymer formed by the self-assembly of mono-6-deoxy-6-adamantylamide-b-cyclodextrin. *Acta Crystal.* B60, 204-210 (2004).
- 124 Anelli, P. L. *et al.* L-Glutamic acid and L-lysine as useful building blocks for the preparation of bifunctional DTPA-like ligands. *Bioconjugate Chem.* 10, 137-140 (1999).
- 125 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. N-Cholyl amino acid alkyl esters - a novel class of organogelators. *Eur. J. Org. Chem.*, 2329-2335 (2001).
- 126 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. Alkyl Derivatives of Cholic Acid as Organogelators: One-Component and Two-Component Gels. *Langmuir* 18, 7102-7106 (2002).
- 127 Soto Tellini, V. H. *et al.* Synthesis, characterization and self aggregation of a new neo-pentylamide cholic derivative (Na-n-penC). *Proceedings of ECSOC-10, International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 10th, Nov. 1-30, 2006* Editor(s): Seijas, Julio A.; Vazquez Tato, M. Pilar., f004/001-f004/008 (2006).

3

Estados de Agregación en solución de derivados de ácido cólico

Este capítulo completa el capítulo anterior, centrándose en la agregación de las sales biliares y sus derivados, en medio acuoso y en diferentes disolventes orgánicos. El estudio se centra principalmente en la formación de geles y otros tipos de estructuras como micelas, hélices, etc., mediante la utilización de diferentes técnicas que permitan dilucidar el comportamiento de alguno de los compuestos sintetizados en los diferentes medios. Del estudio de las propiedades superficiales y la solubilidad de los compuestos obtendremos información sobre las dimensiones moleculares, interacciones intermoleculares e interacciones con el sustrato, ahondando en el conocimiento del comportamiento fisicoquímico de los compuestos sintetizados.

Ad astra per aspera.

(El joven, Séneca)



3.1 INTRODUCCIÓN

El proceso por el cual moléculas individuales en un medio, se agregan espontáneamente para dar lugar a estructuras más complejas es un fenómeno de gran importancia en la naturaleza así como en muchos campos de la ciencia. En los procesos de agregación juegan un papel fundamental la polaridad de las moléculas partícipes, siendo bien conocido que los compuestos polares (hidrófilos) presentan una buena solubilidad en disolventes polares, mientras que los compuestos apolares (hidrófobos) presentan una buena solubilidad en disolventes apolares (*similia similibus solvuntur*).

Es en este punto, cuando las moléculas sintetizadas y estudiadas cobran, si cabe, una mayor relevancia, al presentar propiedades anfífilas. Este hecho provoca que este tipo de compuestos en un determinado disolvente traten de minimizar las interacciones polares-apolares desfavorables, lo que concluye, en muchos casos, en un proceso de agregación y organización de las mismas, para dar lugar a estructuras de dimensiones coloidales.

Este fenómeno de auto-agregación generalmente tendrá lugar a partir de una determinada concentración, conocida como concentración de agregación crítica, *cac* y también por encima de una determinada temperatura denominada temperatura de Kraft, para asegurar la solubilidad del compuesto estudiado. En muchos casos, la agregación de solutos a menudo sucede en el límite de la solubilidad. La forma y los tamaños de los agregados varían muy considerablemente dependiendo de las características del compuesto y de las características del disolvente¹.

La razón por la cual las moléculas anfífilas tienen tendencia a agregarse formando estructuras coloidales, se basa en el hecho de que de sus zonas lipófilas son poco solubles y tienden a separarse de los disolventes polares, ocurriendo lo contrario para las zonas lipófilas las cuales tienen tendencia a solvatare. Al emplear agua como disolvente, las interacciones hidrófobas son la principal causa de la agregación de las moléculas apolares o fragmentos moleculares².

A lo largo del presente capítulo se emplearán diferentes técnicas instrumentales para tratar de estudiar el comportamiento de las moléculas sintetizadas en diferentes medios. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: Dispersión de la Luz en modo dinámico y estático, Espectrometría de Fluorescencia, Análisis de Tensión Superficial, Espectroscopia UV-Vis, Calorimetría Diferencial de Barrido, Dicroísmo Circular, Difracción de Rayos X a bajo Ángulo, Microscopía de Transmisión Electrónica, Microscopía de Barrido Electrónico y Microscopía óptica confocal.

3.1.1 SOLUBILIDAD EN AGUA

El agregado más común encontrado en disolución acuosa para muchos compuestos anfífilos son las micelas, las cuales se forman espontáneamente dando lugar a sistemas dinámicos con tiempo de vida media del orden de los milisegundos. Los monómeros moleculares se intercambian continuamente con el medio que les rodea con tiempos de residencia medios en la micela del orden de microsegundos. En un medio acuoso, las micelas están formadas por moléculas orientadas con sus partes polares hacia el exterior de la micela en contacto con el medio y las partes más apolares hacia el interior de la misma, adquiriendo el interior de la micela un marcado carácter hidrófobo por lo que el efecto hidrófobo juega un papel primordial en la formación de este tipo de agregados.

Este tipo de compuestos cuando están presentes como monómeros en disolución, las zonas hidrófobas se encuentra hidratadas, lo que provoca un aumento de las interacciones enlaces de hidrógeno y una pérdida de movimiento de las moléculas de agua cercanas en comparación con las demás moléculas de agua libres y alejadas de los compuestos anfífilos. Al producirse los procesos de agregación, en este caso de formación de micelas, aparecen interacciones de van der Waals entre las regiones hidrófobas de las moléculas, lo que produce que se disminuya la hidratación mencionada. El resultado de esta ruptura de enlaces de hidrógeno da lugar a un efecto entálpico desfavorable, que es compensado por una gran ganancia en la entropía debido al aumento de moléculas de agua libres en el medio, y que también compensa el efecto de entropía negativo al perder libertad las moléculas anfífilas, y el aumento de entalpía debido a las repulsiones polares entre regiones de las moléculas de estudio. Estas repulsiones polares pueden ser atenuadas mediante el empleo de contraiones que disminuyen parcialmente la carga superficial.

Los agregados más comunes suelen ser de tipo esférico, con un número de agregación de entre 50-100 moléculas, aunque los agregados cilíndricos o tipo gusano, como los obtenidos con mezclas catiónicas, mezcla de un surfactante aniónico y otro catiónico, también son habituales. Estas últimas suelen venir acompañadas de un aumento en la viscosidad de la disolución. Otro tipo de agregado común en agua son las bicapas y en relación a estos las vesículas. Las vesículas pueden ser de una o múltiples capas y sus diámetros ir desde los 20 nm hasta varios micrómetros. Por último también se forman agregados como hidrogeles, o fases de cristal líquido liotrópicas.¹

En lo que respecta a los ácidos biliares y sus sales, mientras que las sales de sodio y potasio de los ácidos biliares di- y tri-hidroxílicos presentan una muy buena solubilidad en agua, sus análogos ácidos protonados son muy insolubles³.

3.1.2 SOLUBILIDAD EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Análogamente a lo que sucede en medio acuoso, en medios orgánicos se pueden formar también diferentes tipos de agregados. Así podemos encontrarnos con micelas invertidas, como las formadas por el AOT el bis(2-etilhexil)sulfosucionato de sodio que forma este tipo de agregados. En ellos, las regiones polares de la molécula se encuentran localizadas en el centro del agregado y las partes apolares están dirigidas hacia el exterior.

Una familia importante de agregados, formados en disolventes orgánicos, son los organogeles. No existe aun un consenso generalizado de definición de los mismos, aunque hay coincidencia en que se trata de un disolvente orgánico con un aumento de la viscosidad considerable mediante la formación de redes tridimensionales de fibras enredadas, formadas por la agregación de moléculas órgano-gelificantes. A menudo, sólo es necesaria una pequeña cantidad de agente gelificante, en una gran cantidad de disolvente, para formar la red y el gel. Así, concentraciones en el entorno del 1% en peso suelen ser suficientes.¹

3.1.3 CÁLCULO DEL EXCESO DE CONCENTRACIÓN SUPERFICIAL

La ecuación derivada de la isoterma de Gibbs que permite estimar la concentración superficial de exceso en la CMC, Γ , para un surfactante a partir de la dependencia de la tensión superficial en disolución acuosa con la concentración del es posiblemente la más ampliamente utilizada en la bibliografía. Su obtención, así como las hipótesis implicadas, es incluso común a libros de texto de Fisicoquímica general y, por ello, nos limitaremos a recoger aquí su expresión final, que para surfactantes no iónicos es la siguiente:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln a} \right)_T \quad \text{Ec.3.1}$$

en la que, si se trabaja con disoluciones diluidas, la actividad a puede aproximarse por la concentración c . En la ecuación anterior γ es la tensión superficial y los demás símbolos tienen su significado habitual. A partir del conocimiento de Γ es posible estimar el área por molécula en la interfase, a_0 , mediante la siguiente relación:

$$a_0 (\text{Å}^2) = 10^{20} / (\Gamma \cdot N_A) \quad \text{Ec.3.2}$$

Para surfactantes electrolíticos fuertes formados por ν_+ iones positivos y ν_- iones negativos, de cargas iónicas z_+ y z_- . a expresión anterior, la concentración superficial en exceso, Γ , viene dada por⁴:

$$\Gamma = -\frac{1}{RTm(c,c_s)} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln c} \right)_{T,c_s} \quad \text{Ec.3.3}$$

en la que $m(c, c_s)$ una función de los iones definidos anteriormente, la concentración de surfactante, C , la concentración de sal inerte añadida, C_s , y el coeficiente estequiométrico del catión de la sal inerte añadida, v_+^s . La expresión explícita del mismo es la siguiente:

$$m(C, C_s) = v_- + \frac{v_+^2}{v_+ + v_+^s \frac{C_s}{C}} \quad \text{Ec.3.4}$$

Si se realizan medidas en agua libre de electrolito, el factor m , se simplifica de la siguiente forma $m = v_- + v_+$ y, en el otro extremos, si el electrolito está presente en una concentración mucho mayor que la del surfactante ($C_s \gg C$) entonces resulta que $m = v_-$, simplificación que emplearemos cuando introduzcamos electrolitos inertes en las muestras.

Las publicaciones en los que se suministran datos obtenidos mediante las ecuaciones anteriores son muy numerosas y algunas de ellas se irán introduciendo a lo largo del presente capítulo.

Debido a la controversia suscitada en estos últimos años por diversos trabajos realizados por Menger y col.⁵ en los cuales cuestionan los métodos de análisis de los datos de tensión superficial empleados para la determinar el exceso de concentración superficial de surfactante en la interfase aire-agua mediante el empleo de la ecuación de Gibbs, y debido al tratamiento de datos que emplearemos en el presente capítulo, consideramos oportuno hacer un pequeño inciso en la descripción de la ecuación de Gibbs sus implicaciones y restricciones en cuanto a su aplicabilidad con surfactantes iónicos como los desarrollados en el presente trabajo.

Recientemente Li y col.⁶ han mostrado que existe una buena correlación entre los datos obtenidos mediante la técnica de Difracción de Neutrones y la técnica de tensión superficial (TS) para un amplio intervalo de adsorbentes no iónicos entre los que encontraban surfactantes, sistemas polidispersos y polímeros. Fundamentan la concordancia entre resultados obtenidos por ambas técnicas en el hecho de que los surfactantes no iónicos tienden a saturar la superficie antes de alcanzar la concentración de agregación crítica (CAC), lo que hace que sea relativamente fácil determinar el valor de la concentración superficial de exceso (Γ) de la representación de la TS frente al $\log(\text{concentración})$. Asimismo, indican que existe en general una buena concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas en todo el intervalo de concentraciones por debajo de la CMC, excepto en la región, a las concentraciones más diluidas, en la que en buena lógica aparece una curvatura.

Como continuación del trabajo anterior, estos autores⁷ realizan un exhaustivo análisis de los datos de tensión superficial, difracción de neutrones y otras técnicas utilizadas para el estudio del dodecilsulfato sódico (SDS). Entre sus conclusiones cabe

destacar las siguientes: (i) Las medidas de tensión superficial están a menudo comprometidas por trazas de iones divalentes; (ii) generalmente, la adsorción no alcanza la saturación en la CMC lo que hace difícil obtener la pendiente límite de Gibbs; (iii) el intervalo de concentraciones a las que aparece la CMC, hace imposible utilizar la ecuación de Gibbs en un intervalo significativo de concentraciones por debajo de la CMC; (iv) existe una buena concordancia entre los resultados de difracción de neutrones y los derivados de la tensión superficial para la concentración superficial de exceso en el intervalo de concentraciones comprendidos entre 2 y 6 mM.; (v) no es útil la aplicación de la ecuación de Gibbs en el intervalo de 6 a 8.2 mM; (vi) los errores en las determinaciones derivadas de la aplicación del modelo de Gibbs a los datos de tensión superficial son siempre mayores que los obtenidos por difracción de neutrones, excepto en lo que se refiere a los efectos inusuales de las impurezas, pero enfatizan que esta conclusión no resta la validez de la ecuación de Gibbs y que es una cuestión derivada de la dificultad inherente a realizar medidas con la precisión necesaria.

En las conclusiones del artículo, los autores indican expresamente que la ecuación de Gibbs no se puede utilizar para determinar Γ_{CMC} porque no se dispone de información acerca de la variación de la actividad por debajo de la CMC. Entonces, en respuesta a los trabajos de Menger *et al*, recalcan que generalmente la concentración de exceso superficial de un surfactante aniónico en la CMC no puede ser determinada de forma fiable por aplicación de la ecuación de Gibbs a los datos de tensión superficial. Tampoco puede ser utilizada cuando exista asociación de iones y dimerización por debajo de la CMC.

En un estudio posterior⁸ extienden su trabajo a surfactantes catiónicos. Aquí nos concentraremos en las conclusiones del mismo. Así, indican que la aplicación de la ecuación de Gibbs para el análisis de la tensión superficial en surfactantes catiónicos está limitada por los efectos del intervalo finito de formación de micelas, tal como se encontró para el surfactante aniónico SDS. Tal intervalo es menor para estos dos surfactantes que lo observado previamente para el SDS aunque esto puede ser el resultado de trazas residuales de impurezas. El intervalo finito de micelización puede, sin embargo, ser un problema más grave para los surfactantes catiónicos debido a que muchos tienen números de agregación bajos por lo que es esperable que tal intervalo sea mayor. Tal y como fue observado para el SDS, la extrapolación en la región de micelización para obtener la concentración de exceso límite no es una opción fiable debido a los aumentos de adsorción en la región de la CMC y por encima de la misma. Los datos de reflexión de neutrones muestran que no existe una meseta en la adsorción en la CMC para los tres surfactantes catiónicos estudiados y, por lo tanto, no se puede modelar fácilmente la tensión superficial en una región en la que la concentración está cambiando significativamente.

La combinación de estos problemas presenta serios obstáculos para la determinación de Γ_{CMC} utilizando la ecuación de Gibbs y confirma la crítica de Menger aplicada a todos los surfactantes iónicos. Esto significa que los procedimientos estándar (esto es, una isoterma modelo con la ecuación integrada de Gibbs o un ajuste polinómico de la tensión superficial) no pueden ser utilizados para muchos surfactantes iónicos porque el gran cambio en la magnitud de la curvatura en la región de micelización no se puede explicar mediante las ecuaciones polinómicas ni con las isotermas modelo. Para surfactantes no iónicos, la cobertura límite se alcanza antes de que comience la micelización por lo que el método de Gibbs da el valor correcto. La única solución a este problema es encontrar un buen modelo para el comportamiento de la actividad en la región sub-CMC. La ley de acción de masas sí da un modelo de este tipo, pero sus supuestos y validez para tal fin no se han explorado de manera significativa.

La aplicación del modelo de Gibbs a situaciones en las que existan otros procesos de preaggregation es formalmente el mismo que el problema de la región finita de micelización, hecho ampliamente reconocido. En estas dos situaciones, donde son necesarios para el análisis de Gibbs los coeficientes de actividad (desconocidos), la tensión superficial no puede dar el valor límite correcto y la alternativa preferida debiera ser la reflexión de neutrones la cual no hace uso ni de concentraciones ni de actividades para la determinación de la concentración superficial de exceso.

Una limitación evitable en el uso del método Gibbs en las medidas de tensión superficial para los surfactantes catiónicos y que no parece surgir en los aniónicos, se refiere a la humectación incompleta que con frecuencia ocurre en los métodos experimentales del plato de Wilhelmy y del anillo de du Nouy. Esto es probablemente el resultado de la carga negativa sobre el material generalmente utilizado (Pt-Ir o Pt). La combinación de este hecho con los citados anteriormente, que se traducen en infravaloraciones sistemáticas (a menudo grandes) del valor límite para los surfactantes catiónicos, hace que los datos obtenidos mediante estas técnicas no se puedan considerar fidedignos.

Dado que la ecuación ha sido también utilizada para el análisis de los datos de tensión superficial correspondientes a surfactantes derivados de los ácidos biliares, procede analizar en qué medida las consideraciones anteriores afectan o pueden afectar a los sistemas objeto de estudio de la presente Tesis doctoral.

A partir de numerosos datos cristalográficos disponibles en el grupo de investigación, así como de otros obtenidos de la bibliografía, en su reciente tesis doctoral, de Frutos, S. ha estimado el área de cada una de las dos secciones (o áreas proyectadas, $area_A$) fundamentales de los ácidos biliares que corresponden con una orientación de su plano horizontal dispuesto de forma paralela a la interfase o bien a

una orientación apical (área_C). El valor medio obtenido para un ácido biliar muestra un valor para área_A de $103 \pm 4.0 \text{ \AA}^2$, mientras área_C tiene un valor medio de $51 \pm 3 \text{ \AA}^2$. A priori, estos resultados pueden ser aplicados a otros compuestos de la misma naturaleza para poder estimar el área de la sección molecular cuando no se disponga de datos de difracción de rayos X.

Small⁹ ha revisado la superficie ocupada por molécula de los ácidos biliares determinadas a partir de estudios de monocapas. Para el ácido colánico obtienen una isoterma empinada entre $44\text{-}40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ lo que les induce a aceptar que la molécula se ubicaría con una orientación apical en la interfase. Este valor no es muy lejano del indicado más arriba para la sección transversal del ácido cólico. Por otra parte, la isoterma para el ácido cólico a 3 M de NaCl (muy parecida a las de los ácidos dihidroxílicos) presenta un punto de colapso alrededor de 14 dinas correspondiéndole un valor para el área por molécula de 105 \AA^2 , valor coincidente con el indicado más arriba para una orientación plana del ácido biliar en la interfase aire-agua. Años más tarde. Miyoshi *et al*¹⁰ utilizando la misma técnica, es decir, la medida de la presión superficial de monocapas formadas por ácidos biliares determinaron valores de 150 (ácido cólico), 140 (quenodesoxicólico) y 123 (ursodesoxicólico) $\text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

Por su parte Thomas y Christian¹¹ determinan para el desoxicólico un valor del área superficial del desoxicólico de $83.6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ mediante elipsometría, valor que les coincide con el determinado a partir del análisis de los datos de tensión superficial mediante la isoterma de Gibbs que resultó ser de $84 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

Carey *et al*¹² para los compuestos ácidos fusídico y 3-acetoxilfusídico, cefalosporina P1 y ácido helvólico, todos ellos con estructura cercana a la del ácido cólico, mediante la técnica de medida de la presión superficial determinaron a 5 M NaCl y pH 2, observaron el colapso de la isoterma a valores comprendidos entre 95 to 124 $\text{ \AA}^2/\text{molécula}$, los cuales comparan favorablemente con los valores de 107-105 $\text{ \AA}^2/\text{molécula}$ determinados por medidas de la tensión superficial. En particular, para el ácido fusídico observan el colapso a la presión de 23 din/cm con un área de 107-108 $\text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

Por suparte, Swanson-Vethamuthu *et al*¹³ mediante el análisis de Gibbs obtienen valores para las áreas superficiales del colato y del desoxicolato que dependen de la basicidad del medio. Así, por ejemplo, para el desoxicolato obtienen valor de 149 y 204 $\text{ \AA}^2/\text{molécula}$ en 0.05 M de NaCl y 0.045 M de NaCl+ 5×10^{-3} M de NaOH, respectivamente.

Como hemos tenido ocasión de comentar en el capítulo anterior, en nuestro grupo de investigación se han obtenido diversos derivados de los ácidos biliares en los que se les ha incorporado un grupo hidrófobo voluminoso, habiendo podido resolver la

estructura cristalina de buena parte de ellos, así como medido sus características de surfactantes. Analicemos los resultados obtenidos en el contexto de la discusión que nos ocupa.

Se han obtenido los derivados *p-t*-butilfenilamida de los ácidos of quenodesoxicólico (tbutPhCDCA) y ursodesoxicólico (tbutPhUDCA)¹⁴. De las medidas de tensión superficial y el análisis de la ecuación Gibbs se obtuvieron valores de 77 ± 1 y $54 \pm 1 \text{ \AA}^2$ para el área *a*, respectivamente. Al mismo tiempo, del cristal del tbutPhCDCA se obtuvo un valor de 65 \AA^2 para el área proyectada de la molécula orientada en una posición apical. La cercanía entre estos valores sugiere que en la interfase agua-aire la molécula se oriente verticalmente respecto a la interfase, apoyado por el hecho de que una orientación paralela conduciría a un área molecular proyectada de 209 \AA^2 (valor deducido de la estructura cristalina). Esta conclusión es bastante coherente con el hecho de que el grupo *p-t*-butilfenilo, hidrófobo, se encontraría orientado hacia la fase aérea. También apoyan esta conclusión los valores de Miyoshi *et al*¹⁰ citados anteriormente.

A dos temperaturas bastante diferentes (25 y $50 \text{ }^\circ\text{C}$)¹⁵, para el derivado catiónico (del ácido cólico) yoduro de $3\beta,5\beta,7\alpha,12\alpha$]-3-(2-naftoilamino)-7,12-dihidroxicolan-24-trietilamonio, el análisis de las medidas de tensión superficial arrojaron valores de 109 ± 2 y 107 ± 3 , respectivamente. Por su área molecular sería esperables valores no inferiores a los del intervalo $135\text{--}162 \text{ }^\circ\text{A}^2$. Sin embargo, se aceptó que la molécula de surfactante se encontraría con una orientación plana pero existiendo cierto apilamiento (de dos a cuatro grupos) de los grupos aromáticos, probablemente como en un cristal líquido. Esta interpretación salva la diferencia entre los valores medidos y los esperables a los que ya hemos hecho referencia.

Una orientación plana de la molécula derivada del ácido cólico con un grupo adamantilo ligado mediante un enlace amida al átomo de carbono en la posición C3 del ácido cólico, AdCA, presenta un área molecular proyectada sobre un plano paralelo al plano de la molécula igual a 147 \AA^2 (calculado a partir de la estructura cristalina del compuesto). Este valor es compatible con el del resultado de sumar las áreas del ácido cólico (103 \AA^2 , *vide supra*) y del grupo adamantilo ($41\text{--}45 \text{ \AA}^2$)¹⁶⁻¹⁷. Sin embargo, es claramente inferior al obtenido para el área en la interfase determinado a partir de la isoterma de Gibbs, que resultó ser 251 \AA^2 , aunque éste sería compatible con el publicado por Swanson-Vethamuthu *et al*¹³ (*vide supra*) obtenido a partir de la misma técnica.

También consideramos ilustrativo hacer las siguientes comparaciones. Según Okuyama *et al*¹⁸ el área de la sección de una cadena hidrocarbonada ($A_c \approx 20 \text{ \AA}^2$) se compara favorablemente con el área ocupada por una molécula de un alcohol alquílico de cadena larga en una monocapa. en la interfase. Así, Prime *et al*¹⁹ han determinado

un valor de $23 \pm 0.1 \text{ \AA}^2$ para el 1-octadecanol. Esta concordancia es esperable siempre que la monocapa muestre un alto grado de ordenamiento.

Xu *et al* ⁷, a partir de sus medidas de reflexión de rayos X, obtienen un valor de Γ_{CMC} igual a $4.8 \text{ \mu mol m}^{-2}$ que se traduce en un área por molécula de $a=35 \text{ \AA}^2$. Estos autores recogen el dato de Tajima²⁰ determinado a partir de medidas de tensión superficial $\Gamma_{\text{CMC}} = 4.3 \text{ \mu mol m}^{-2}$ o lo que implica $a=39 \text{ \AA}^2$, valor un 11% superior al de Xu *et al*. Estos valores no son incompatibles con el indicado para el 1-octadecanol y la idea de repulsiones electrónicas entre las cabezas iónicas de los surfactantes.

El análisis conjunto de todos los datos hasta aquí presentados, nos sugiere los siguientes comentarios:

- (i) La variabilidad de los datos publicados debida a la utilización de surfactantes que no hayan sido purificados adecuadamente es posiblemente mayor que las debidas a las posibles limitaciones inherentes a la isoterma de Gibbs o a sus simplificaciones (como, por ejemplo, la utilización de la concentración en lugar de la actividad en los surfactantes iónicos). En lo que se refiere a las sales biliares esta variabilidad se extiende a otros parámetros no derivados de la isoterma de Gibbs entre los que cabe citar la CMC, el número de agregación o la fracción de contraiones, aspecto que ya ha sido comentado por diversos autores desde hace tiempo.²¹⁻²³
- (ii) Los valores del área superficial, estimados a partir de la aplicación de la isoterma de Gibbs a la dependencia de la tensión superficial con la concentración, obtenidos para diversas sales biliares y sus derivados son congruentes con los parámetros geométricos deducidos del conocimiento de la estructura cristalina del compuesto, tanto en lo que se refiere a una orientación del ácido biliar con su plano horizontal paralelo al de la interfase como a una orientación apical del mismo. Además, las orientaciones sugeridas a partir de tales valores, son congruentes con la estructura anfífila quasi-bifacial de la sal biliar natural, así como con la orientación hacia la fase aérea del grupo voluminoso hidrófobo incorporado en alguno de los derivados¹⁴.
- (iii) Los estudios de Thomas *et al* ⁶⁻⁸ comentados más arriba han puesto de manifiesto una concordancia correcta entre los valores obtenidos por reflexión de neutrones y la isoterma de Gibbs para los surfactantes no iónicos, una diferencia (estimable en un error del orden del 15%) para los surfactantes aniónicos, y diferencias mayores para los catiónicos y todavía más importantes para los *gemini*. Es decir, el grado de validez de la isoterma de Gibbs depende de la naturaleza del surfactante. Es

notorio que los orígenes de la actividad superficial de los surfactantes alquílicos clásicos y de las sales biliares son muy diferentes, estando este hecho, obviamente, relacionado con las enormes diferencias estructurales entre ellos. Lo anterior se traduce en que las estructuras de los agregados formados por ambos tipos de familias son también muy diferentes. Para las sales biliares, no hay estudios publicados como los referidos de Thomas *et al* donde existen técnicas aplicadas diferentes (incluyendo entre ellas las medidas de tensión superficial) y resultados obtenidos por los mismos autores (lo que permite aceptar que la calidad de los productos utilizados es la misma en todas las técnicas) y que los resultados obtenidos para el área superficial son congruentes entre sí¹¹. Sin que podamos demostrarlo, esta concordancia parece sugerir que, al menos en presencia de electrolitos inertes añadidos, el comportamiento de los derivados de los ácidos biliares se asemeja más al de los surfactantes no iónicos que al de los iónicos, al menos dentro de errores experimentales aceptables, lo que puede estar relacionado con el hecho de que su capacidad surfactante nace de una característica estructural diferenciada.

Por lo tanto, en ausencia de una mejor alternativa, a lo largo del presente capítulo, aceptaremos la hipótesis anterior, si bien la manejaremos con la máxima cautela posible.



3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha estudiado el comportamiento de cuatro nuevos compuestos derivados del ácido cólico, en los que se ha incorporado un grupo hidrófobo acoplado por la posición C3 del núcleo esteroideo. Los grupos hidrófobos empleados son el adamantilo y el norbornilo, y se han alejado del cuerpo central del esteroide mediante diferentes separadores o grupos intercalados entre ambos.

Las moléculas aquí estudiadas han sido los ácidos AdCH₂CA, NbCH₂CA, AdSucCA y AdGluCA (Figura 3.1). Anteriormente se había sintetizado en el grupo el AdCA, el cual podría ser incorporado a los estudios en fases posteriores y, en la presente tesis, también se ha realizado la síntesis y cristalización del AdCH₂CH₂CA, compuesto que también podría ser por su interés estructural incorporado a estudios posteriores en cuanto al análisis conjunto de los cristales obtenidos, así como su comportamiento en disolución.

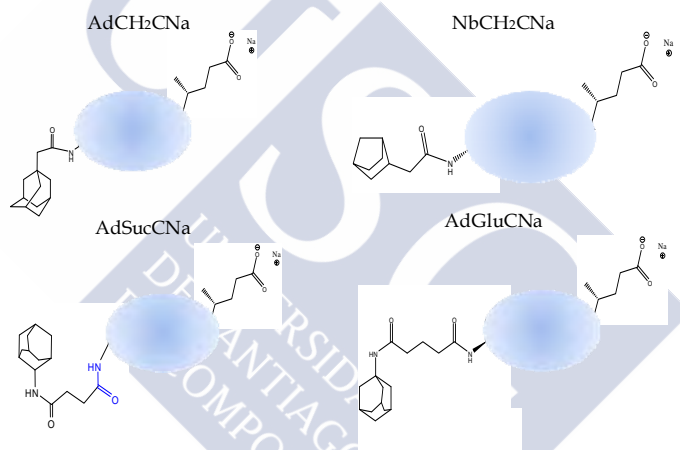


Fig 3.1 – Moléculas estudiadas en el presente capítulo derivadas del ácido cólico como núcleo esteroideo. Este estudio podría ser ampliado al resto de sales biliares naturales siguiendo la misma metodología aquí empleada.

Se trata de estudiar el comportamiento de las moléculas, tanto en disolución acuosa, como en diferentes disolventes orgánicos. Se realizarán y aplicarán diferentes pruebas y técnicas que se irán describiendo oportunamente.

El estudio que hemos realizado está centrado en los siguientes puntos:

1.- Partiremos de un estudio de solubilidad clásico en disolventes orgánicos disponibles en el laboratorio y observaremos la capacidad de los compuestos para formar organogeles, cristales, cristales líquidos u otro tipo de agregados/estados o comportamientos que vayan surgiendo.

2.- Realizaremos un estudio del comportamiento de los compuestos en disolución acuosa con regulador C/BC, NaCl, etc. en las que determinaremos las concentraciones de agregación críticas u otros parámetros característicos (radios de

giro, diámetros efectivos, coeficientes de difusión, formas...) mediante diferentes técnicas.

3.- Trataremos de establecer relaciones o efectos de comportamiento de las diferentes moléculas en función de las modificaciones que hayamos realizado en las mismas.

El AdCH₂CA, es una molécula que estructuralmente modifica al ácido cólico, añadiéndole por la posición tres un grupo adamantilo mediante un enlace amida y un grupo -CH₂- que aleja el núcleo esteroideo del grupo sustituyente hidrófobo. Este metileno establece la diferencia entre esta molécula y la AdCA²⁴. Paralelamente, estudiaremos su homólogo NbCH₂CA en el que se cambia el grupo adamantilo por el norbornilo.

En el compuesto AdSucCA, se separa más el grupo adamantilo del núcleo esteroideo y se añaden un nuevo enlace amida y un metileno. Adelantemos que, en este caso, las propiedades cambian bastante con respecto a las moléculas anteriores, al haber obtenido un compuesto con una gran capacidad para la formación de hidrogeles.

Por último, el compuesto AdGluCA se diferencia del anterior en un grupo -CH₂- adicional, el cual, al separar los dos enlaces amida y dar un mayor grado de libertad de movimiento al grupo hidrófobo terminal, revierte el comportamiento del compuesto.

En lo que sigue, iremos viendo cada uno de ellos y los resultados obtenidos mediante cada una de las técnicas que hemos ido aplicando.

3.2.1. AdCH₂CA - Ácido [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(Adamantano-1-acetil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico

3.2.1.1 SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE

Algunos de los compuestos que hemos ido sintetizando a lo largo de la elaboración del presente trabajo de investigación, se han ido probando en diferentes disolventes con el fin de poder observar su comportamiento. Para ello hemos realizado un experimento de gelificación típico, consistente en rellenar tubos de ensayo con tapa, con una selección de disolventes a disposición del laboratorio en una proporción de 1.5% en peso del compuesto de estudio y en presencia de una unidad de tamiz molecular para evitar en la medida de lo posible la presencia de agua en el medio. La disolución ha sido calentada hasta la disolución completa del sólido, siempre y cuando esto fuese posible. Posteriormente, durante el enfriamiento de la disolución, anotamos su evolución, observando la formación o no de geles, precipitados u otros fenómenos que se pudiesen dar. En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de las pruebas realizadas con el AdCH₂CA.

Tabla 3.1 – Las observaciones del estado se han realizado en el momento del calentamiento, justo después de enfriar pasado unos 30 min., a las 24h y a los 7 días del calentamiento. n=no soluble, s=soluble, p=precipitado, g=gel (altamente viscoso o parcialmente fluido).

Disolvente	p.e. disolvente(°C)	Estado antes calentar	Estado al enfriar	Estado a las 24h	Estado a los 7 días
Benceno	80	n	p	p	p
Tolueno	110.6	n	p	p	p
p-Xileno	138	n	p	p	p
m-xileno	138.5	n	p	p	p
Ciclohexano	81	n	p	p	p
Hexano	68	n	p	p	p
n-Pentano	36	n	p	p	p
2,2,4-Trimetilpentano	99	n	p	p	p
Benzaldehído	179	s	s	s	s
Acetofenona	202	s	s	g	g
Clorobenceno	132	s	g	g	g
Anisol	155	s	g	g	g
1-Pentanol	137	s	s	s	s
1,4-Dioxano	101	s	s	s	s
2-Butanol	98	s	s	s	s
2-Propanol	82	s	s	s	s
Cloroformo	62	s	s	s	s
Diclorometano	40	s	p	p	p
Tetrahidrofurano	66	s	s	s	s
Dimetilsulfóxido	189	s	s	s	s

Como hemos visto en el capítulo 2, en algunos de los medios orgánicos se han obtenido sistemas cristalinos del compuesto. Así, se han obtenido monocristales en acetofenona, acetona, dimetilsulfóxido, 2-butanol, 2-propanol, 1-pentanol y 3-metilbutanol. También se debe destacar que estos disolventes podrían servir como vías de purificación en el caso de que los compuestos tuviesen interés desde el punto de vista industrial, al obtenerse el compuesto en la mayoría de los casos, con un alto grado de pureza.

El compuesto es soluble en otros disolventes como THF, cloroformo, alcoholes, 1,4-dioxano y benzaldehído, en los cuales no se han obtenido estructuras cristalinas, por lo menos con los métodos y concentraciones aplicadas. En algunos disolventes (clorobenceno, acetofenona o anisol) se observó una cierta tendencia a formar organogeles, con mayor o menor consistencia, la cual, en la mayoría de los casos, depende de la concentración del sistema.

3.2.1.2 ESTUDIO DE LA DENSIDAD

Se ha realizado un estudio de la densidad de disoluciones acuosas de AdCH₂CNa en el intervalo de concentraciones 10-60 mM, para observar la estabilidad y variación de la misma con la concentración. En este intervalo, el compuesto presenta una buena solubilidad a la temperatura de 25 °C. La densidad aumenta al hacerlo la

concentración, obteniéndose la dependencia lineal $\rho(g/ml) = 0.0011 \cdot C(mg/ml) + 1.008$ ($r^2=0.99$).

3.2.1.3 ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Se han realizado medidas de tensión superficial mediante un Tensiómetro digital modelo K 10 ST de la casa Cruz, empleando el método del plato de Wihelmy. El compuesto AdCH₂CA se utiliza en su forma de sal sódica en agua mili-Q y con buffer 15 mM de carbonato y bicarbonato sódico, con un pH de 10. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2.

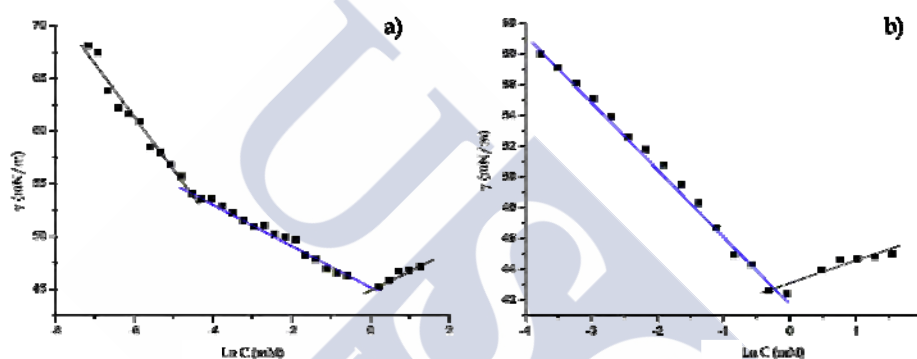


Fig.3.2 Representación gráfica de la tensión superficial, γ , frente al logaritmo neperiano de la concentración para a) AdCH₂CA en agua y b) en disolución tampón de carbonato/bicarbonato sódico de concentración total 15 mM a 25°C.

Las dos representaciones de la figura ponen de manifiesto el comportamiento habitual de este tipo de tensioactivos, con dos regiones lineales, una de descenso acusado de la tensión superficial que corresponde a la zona de concentración en donde sólo deberían de existir monómeros (reflejando la adsorción de surfactante en la interfase disolución-aire), y otra donde el descenso es poco acusado o nulo y que indica que la interfase se encuentra saturada y tiene lugar la formación de agregados del surfactante (que no son superficialmente activos). El punto de corte de ambas rectas corresponde a la concentración de agregación crítica, *cac*.

La aplicación de la isoterma de Gibbs permite estimar la concentración superficial de exceso Γ (mol/m²) y el área por molécula en la interfase, a_0 . Por las razones indicadas más arriba de la dependencia del parámetro m de la ecuación de Gibbs para surfactantes iónicos con los coeficientes estequiométricos del surfactante, y la conveniencia expresada de trabajar en presencia de electrolito inerte, sólo analizaremos los datos en presencia del regulador. De este modo, se disminuye el riesgo de cometer errores groseros en el cálculo de a_0 .

Los valores de *cac* obtenidos, Tabla 3.2, son ligeramente inferiores a la del colato sódico para la que se han publicado valores de *cac* superiores a 0.010 M²⁵⁻²⁷. Esta diferencia es debida a la presencia del grupo hidópho adamantilo que aumenta las características de surfactancia de la sal biliar de partida. El valor es incluso inferior al de las sales dihidroxílicas (desoxicólato, ursodesoxicólato y quenodesoxicólato) cuyos valores de *cac* se encuentran en el intervalo 2-6×10⁻³ M.

Tabla 3.2 – Parámetros deducidos de los experimentos de tensión superficial para la agregación y adsorción en la interfase aire-agua para AdCH₂CA en Tampón C/BC de Na 15 mM.

Medio	<i>cac</i> (mM)	10 ⁶ Γ (mol · m ⁻²)	<i>a</i> ₀ (Å ²)
Tampón C/BC 15 mM	0.7	1.78	93

Del análisis del contorno de la cara hidrópho de los cristales obtenidos en acetona/agua, el área ocupada por la molécula es de 140-150 Å² por lo que el valor de 93 Å² es ligeramente inferior al esperado (*vide supra*).³ Por las razones apuntadas anteriormente no haremos mayores especulaciones sobre el sistema.

3.2.1.4 ESTUDIO DE FLUORESCENCIA

Mediante la técnica de fluorescencia hemos determinado el valor de la *cac* para este sistema así como información acerca de la naturaleza de los agregados. Haremos uso de la inclusión de una sonda fluorescente que, en nuestro caso, ha sido el pireno.

Se analiza la relación entre las intensidades de los picos vibracionales 1 y 3 de la sonda empleada. La relación *I*₁/*I*₃ es muy sensible a la polaridad del medio lo que permitirá deducir el carácter más o menos polar del microentorno donde el pireno se encuentra incorporado. Así, en la Tabla 3.3 se muestran los valores de la relación de intensidades en diferentes disolventes de distinta polaridad.

Tabla 3.3 – Relación de intensidades de fluorescencia *I*₁/*I*₃ del pireno en distintos disolventes.

disolvente	H ₂ O	CH ₃ CN	CH ₃ OH	n-butanol	clorobenceno	hexano	ciclohexano
<i>I</i> ₁ / <i>I</i> ₃	2	1.85	1.33	1.02	0.92	0.61	0.60

La Figura 3.3 muestra la representación gráfica obtenida experimentalmente para la variación de *I*₁/*I*₃ frente al logaritmo neperiano de la concentración de surfactante y el valor de *cac* determinado.

La relación *I*₁/*I*₃ toma valores próximos a 1.8 cuando la concentración es baja, (véanse la Tabla 3.3 y la Figura 3.3), condiciones en las que sólo existen monómeros de surfactante en la disolución, o los agregados no son lo suficientemente grandes para incorporar moléculas de pireno en su interior, por lo que el mismo se encuentra en el medio acuoso polar. Por otra parte, a concentraciones más elevadas, cuando la

interfase está claramente saturada y existen agregados en el seno de la disolución, la relación I_1/I_3 toma valores que están próximos a 0.9, valores relativamente más altos que los obtenidos para el colato sódico 0.75.²⁸ Atendiendo a los valores del pireno en los diferentes disolventes, debemos de observar que a altas concentraciones éste se encuentra en un medio más hidrófobo, menos polar como el que podrían formar los agregados de derivado de sal biliar en su interior, valor entre el clorobenceno y el n-butanol, pero que es un medio menos hidrófobo que el que forman los agregados del colato de sodio.

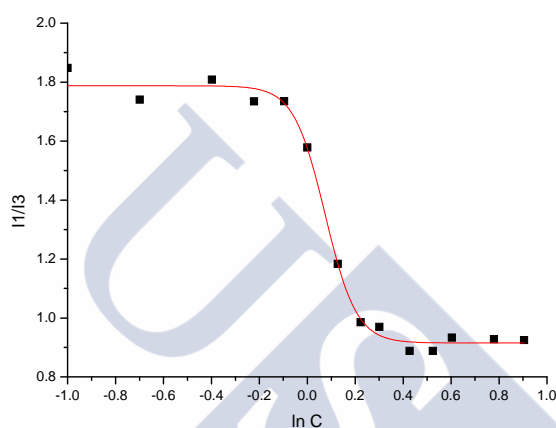


Fig.3.3 - Medidas de la relación I_1/I_3 de la fluorescencia del pireno disuelto en disoluciones de AdCH₂CA en agua.

El punto de inflexión de la curva anterior corresponde a un valor de 1.2 mM, el cual corresponde a la *cac* y es totalmente compatible con el determinado en agua mediante las medidas de tensión superficial.

3.2.1.5 ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ

Mediante las técnicas estáticas y dinámicas de dispersión de luz láser, se puede obtener una serie de información que nos será útil a la hora de estudiar el comportamiento de las moléculas sintetizadas en disolución.

Mediante la técnica de dinámica de dispersión de la luz podemos medir la fluctuación de la intensidad para la obtención de los radios hidrodinámicos, diámetros efectivos a diferentes concentraciones. Mediante la técnica estática de dispersión de la luz medimos intensidades de luz dispersada a diferentes ángulos, de la que podemos obtener sobre la geometría de las moléculas o sus agregados en disolución.

Para las medidas de dispersión de la luz se ha utilizado un instrumento de la casa Brookhaven constituido de un correlador digital BI-2030AT con 136 canales y un

goniómetro BI-200SM. La fuente utilizada es un láser Uniphase en estado sólido (modelo 4601) que opera a una longitud de onda de 532 nm.

Las muestras en estudio se filtran en primer lugar para eliminar impurezas no deseadas, principalmente polvo, que pueden provocar una distorsión en la función de correlación. Para tal propósito se han utilizado unidades de filtración (BIUU1).

El rayo láser se enfoca desde una lente a una celda inmersa en un baño térmico que contiene decalina termostatazada a la temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °C. La luz difundida pasa a través de dos rendijas, y es enfocada desde una segunda lente sobre el fotomultiplicador, que se encuentra situado sobre un brazo que permite la variación del ángulo de medida entorno a la celda de la muestra. El ángulo de difusión se selecciona rotando el brazo al ángulo deseado. Tal rotación se controla desde el goniómetro.

La luz difusa es transformada en impulsos eléctricos en el fotomultiplicador conservando las fluctuaciones de la intensidad y por tanto las propiedades dinámicas del sistema que estamos estudiando. La señal se recoge en un intervalo de tiempo (tiempo de muestreo) pequeño con respecto al tiempo de fluctuación. La intensidad de la luz difundida es registrada en cada uno de estos intervalos de tiempo, fluctuando en torno a un valor medio de intensidad. Después de la amplificación de la señal, esta es transmitida a un correlador que hace un análisis temporal de las fluctuaciones de la intensidad, multiplicando el número de fotones que llegan en dos intervalos de tiempo sucesivos. Tal procedimiento se repite cerca de 100000 veces y se memoriza en el canal j -ésimo del correlador (correspondiente a un valor elegido del intervalo de tiempo τ)²⁹.

3.2.1.5.a - Medidas de dispersión de luz dinámica, (*Dynamic Light Scattering, DLS*).

Como ya comentamos con anterioridad, la radiación que incide sobre la muestra es dispersada por la interacción de los electrones presentes en la misma (en esta técnica sólo se considerará el componente eléctrico). Los electrones vibran debido a la acción del campo eléctrico oscilante que los convierte en dipolos oscilantes que re-emiten radiación.

La frecuencia de la radiación es modificada a valores más altos o más bajos según el movimiento de los electrones, esta variación de frecuencia va a depender de la velocidad y dirección relativa al detector (efecto Doppler).

El movimiento aleatorio modifica las distancias que existen entre el detector y las partículas difusoras, que van a ser interpretadas como una función del tiempo. En consecuencia, la luz difundida puede interferir constructiva o destructivamente dependiendo de la distancia que viaja hasta el detector. El resultado, es un valor medio de la intensidad difundida que llega al detector, sobre el que se superponen una serie de fluctuaciones.

Los tiempos de relajación o de decaimiento de las fluctuaciones están relacionados con las constantes de difusión, y en consecuencia, con los tamaños de las partículas. La variación de la intensidad con el tiempo, contiene información del movimiento aleatorio o browniano de las partículas y este puede ser usado para la medición de los coeficientes de difusión de las partículas. Así pues, midiendo los tiempos de difusión de las mismas, podemos determinar sus tamaños.

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:

$$D_0 = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad \text{Ec.3.5}$$

Siendo k_B la constante de Boltzmann, $k_B = 1.3807 \cdot 10^{-16} \text{ erg/K}$, T la temperatura absoluta en Kelvin, η la viscosidad del medio y D_h el diámetro hidrodinámico de la partícula, que es una medida de la suma del diámetro de la partícula (o agregado) y la capa eléctrica dipolar en la superficie de la partícula (Figura 3.4). Esta ecuación asume que las partículas se mueven independientemente unas de otras.

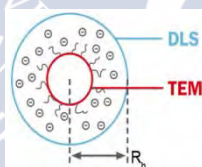


Fig. 3.4 Representación el concepto de radio hidrodinámico.*

En nuestro caso, el diámetro hidrodinámico debe ser muy similar al diámetro real del agregado debido a que la capa eléctrica dipolar está formada por especies de tamaño mucho más pequeñas que las moléculas constituyentes del agregado.

En muchos casos, la polidispersidad de la muestra y que las partículas o agregados no son totalmente esféricos generan desviaciones de los casos ideales, por lo que para sistemas polidispersos, debemos de tener en cuenta diferentes situaciones con todos los tamaños posibles, ya que cada partícula o agregado contribuye con su propio coeficiente de difusión. Por ello, se emplean diferentes métodos numéricos como el CONTIN que nos permiten analizar muestras polidispersas.

* <http://www.fritsch-sizing.es/index.php?id=990795&L=5>

El diámetro efectivo es generalmente más grande que otros que pueden ser calculados como diámetros en masa, volumen, intensidad ponderada, etc., pero, en algunos casos, en los que las partículas son más grandes que $\lambda/20$, siendo λ la longitud de onda incidente en la muestra en nm, y la dispersión tiene una gran dependencia con el ángulo. Este diámetro efectivo es más pequeño que el diámetro ponderado en volumen. Ello explica, que en muchos casos, que partículas de polvo y otras partículas indeseadas, de mayor tamaño pueden distorsionar los resultados aunque estén en muy pequeñas proporciones en la disolución.

AdCH₂CNa:

En nuestro caso, se han preparado diferentes disoluciones de AdCH₂CNa con diferentes concentraciones que van de 20 mM a 5 μ M, en presencia de tampón carbonato/bicarbonato (C/BC) sódico 15 mM (pH=10), y se han realizado medidas de dispersión de luz dinámica y se han obtenido los resultados mostrados en la Figura 3.5.

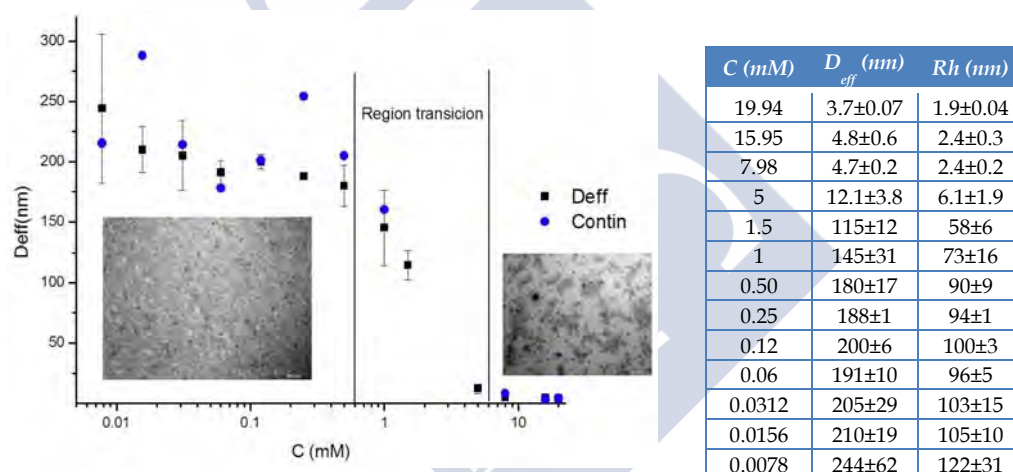


Fig. 3.5 Representación del diámetro efectivo mediante cumulantes y diámetro mediante CONTIN en función de la concentración de AdCH₂CNa en tampón carbonato/bicarbonato de sodio 15 mM, pH 10.

Se han realizado medidas de las muestras antes y después de ser filtradas, observando que el empleo del filtro de 15 y 30 nm no afectaba a la hora de los datos obtenidos mediante cumulantes, mientras que con los métodos CONTIN y NNLS (mínimos cuadrados) obteníamos muestras polidispersas con diámetros entre 2.3-4 nm y 130-180 nm de las mismas muestras, a 25°C. Debido a la aparición de distribuciones bimodales, se ha realizado también medidas a 45 °C no observándose cambios significativos en los tamaños determinados y comportamiento de las muestras.

Se observa claramente que existe una región de transición entre 0.6 y 5 mM, como punto intermedio mediante esta técnica podríamos situar la *cac* en 2.8 mM que se correspondería al paso a la formación de agregados de mayor a menor tamaño en disolución y que habíamos situado anteriormente en 0.7 mM, para este medio.

Se han realizado medidas en disoluciones de AdCH₂CNa a concentraciones más altas de las estudiadas anteriormente 10-60 mM, en agua, sin tampón C/BC y con diferentes concentraciones de NaCl, (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 M de NaCl), con la intención de variar la fuerza iónica del medio y observar el comportamiento de nuestro compuesto.

Se encuentra que mientras un análisis normal de los datos mediante cumulantes, obtenemos una única distribución con diámetros efectivos que van entre 60-35 nm de promedio y que varían ligeramente al aumentar la concentración del compuesto. El método CONTIN nos muestra una distribución polidispersa con tamaños de partícula entre 3-7 nm y 149-190 nm. Debemos de tener en cuenta que la muestras con concentración de NaCl por encima de 0.3 M no eran solubles a la temperatura de experimentación y presentaban precipitados.

También se observa una ligera tendencia a estabilizar agregados o partículas de mayor tamaño al aumentar la fuerza iónica del medio (véase Tabla 3.4).

Se han preparado disoluciones de AdCH₂CNa con diferentes concentraciones que van de 20 mM a 15 μM, en agua mili-Q, sin presencia de tampón o sales a mayores y se han realizado medidas de dispersión de luz dinámica, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3.6.

Se observa que ante la ausencia de tampón, se producen los mismos fenómenos que veíamos anteriormente, pero todo se desplaza hacia regiones superiores, con el consecuente aumento del tamaño de los agregados y un sistema más desestabilizado, con mayores fluctuaciones, lo que entraña una mayor dificultad a la hora de realizar las medidas experimentales, resultando datos más dispersos.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE SALES BILIARES
CAPÍTULO 3 ESTADOS DE AGREGACIÓN EN SOLUCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO

Tabla 3.4 resumen de datos obtenidos DLS, para el AdCH₂CNa en disolución acuosa y con diferentes concentraciones de NaCl en el medio, Poly indica polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Sin NaCl

C (mM) a ángulo 90°	Cumulantes			CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	D(cm ² s ⁻¹)	d (nm)	d (nm)	d (nm)
10	63.3	0.283	7.76E-08	3.6	167	2.1
20	56.7	0.359	8.65E-08	3.6	171	2.1
30	51.9	0.362	9.46E-08	3.6	139	2.1
40	75.1	0.039	6.54E-08	3.5	100	2.1
60	50.5	0.33	9.73E-08	3.4	170	2.1

100 mM

	Cumulantes			CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	D(cm ² s ⁻¹)	d (nm)	d (nm)	d (nm)
10	94.3	0.085	5.20E-08	5.2	121	3.6
20	33.8	0.26	1.45E-07	5.3	165	3.4
30	35	0.233	1.40E-07	5.1	141	3.5
40	39.2	0.236	1.25E-07	5.2	182	3.5
60	54.3	0.263	9.04E-08	5.2	159	3.6

200 mM

	Cumulantes			CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	D(cm ² s ⁻¹)	d (nm)	d (nm)	d (nm)
10	51	0.264	9.61E-08	5.8	176	4.1
20	35.8	0.247	1.37E-07	5.8		4.2
30	35.6	0.254	1.38E-07	5.8	175	4.2
40	24.7	0.199	1.99E-07	5.9	167	4.2
60	34.1	0.246	1.44E-07	5.7	168	4.2

300 mM

	Cumulantes			CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	D(cm ² s ⁻¹)	d (nm)	d (nm)	d (nm)
10	50.3	0.307	9.76E-08	6.9	161	5
20	36.1	0.247	1.36E-07	6.8	207	5.1
30	32.3	0.235	1.52E-07	7.2	191	5.1
40	25	0.2	1.96E-07	7.3	197	5.2
60	32.6	0.211	1.50E-07	6.8		5.3

400 mM
(precipitado)

	Cumulantes			CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	D(cm ² s ⁻¹)	d (nm)	d (nm)	d (nm)
10	113.2	0.076	4.33E-08	9	157	5
20	42.3	0.317	1.16E-07	9.1	168	5.8
30	46.7	0.099	1.05E-07	9.2	178	5
40	17.8	0.176	2.76E-07	9.4	260	5.2
60	39.7	0.14	1.24E-07	8.7		5.7

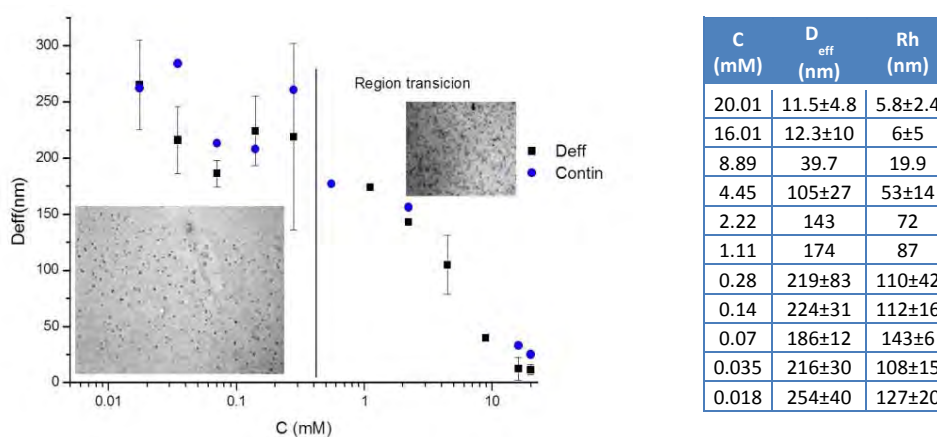


Fig. 3.6 Representación del Diámetro efectivo mediante Cumulantes y Diámetro mediante CONTIN en función de la concentración de AdCH₂CNa en Agua.

3.2.1.5.b -Medidas de dispersión de luz estáticas a 90°, (Static Ligth Scattering, SLS)

Mediante las medidas de dispersión de luz estática, estudiaremos el promedio de la intensidad de luz que es dispersada. Esta intensidad de luz que es difundida elásticamente por nuestra muestra, va a depender del número de moléculas por unidad de volumen (concentración) y de la polarizabilidad de la misma (o capacidad de las moléculas para seguir la perturbación del campo electromagnético), fenómeno relacionado con su índice de refracción.

En la práctica se suele preferir expresar la intensidad difundida (I) de forma que sea independiente de las condiciones experimentales, tales como la distancia de observación (r) y la intensidad del haz incidente (I_0). Para ello se utiliza en los experimentos de difusión de luz la llamada *relación Rayleigh*:

$$R_{\theta} = \frac{I r^2}{I_0} \quad \text{Ec.3.6}$$

Así podemos resumir las ecuaciones generales empleadas para tamaños de partícula mucho menores que $\lambda/20$, lo que implica que estas ecuaciones sean adecuadas para partículas o agregados cuyo tamaño sea inferior a 27 nm, por lo que pueden ser aplicadas en la primera región de nuestros datos.

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2 \cdot A_2 c + 3 \cdot A_3 c^2 + \dots \quad \text{Ec.3.7}$$

En esta ecuación K es una constante que engloba las características ópticas del sistema y en la que se incluye la variación del índice de refracción con la concentración, ΔR_{θ} la relación de Rayleigh, M peso molecular del soluto, A_2 y A_3 son el segundo y tercer coeficientes del virial, c es concentración de soluto. En una disolución diluida pueden despreciarse los términos de desarrollo de virial superiores al segundo.

$$\frac{K(c-c_{cac})}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2 \cdot A_2(c - c_{cac}) \quad \text{Ec.3.8}$$

Siendo c_{cac} , la concentración de la disolución en la región de transición. θ , el ángulo de medición.

$$K = \frac{4 \cdot \pi^2 \cdot n_{cac}^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda_0^4 \cdot N_A} \quad \text{Ec.3.9}$$

En las que n es el índice de refracción, N_A número de Avogadro, λ_0 longitud de onda del luz incidente en la muestra.

$$\Delta R_{\theta} = \frac{\bar{I}_{disolución} - \bar{I}_{disolvente}}{\bar{I}_{referencia}} \cdot R_T \frac{n_0^2}{n_{referencia}^2} \cdot \text{seno } \theta \quad \text{Ec.3.10}$$

Como referencia hemos empleado tolueno, ($R_{\text{tolueno}, 90^\circ} = 2,52 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$ a 532 nm; $R_{\text{benzeno}, 90^\circ} = 8,51 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ a 633 nm).

Cuando el tamaño de las partículas o agregados de estudio es comparable a la longitud de onda de la radiación incidente, tendremos una expresión más compleja, que se describe a continuación.

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2 n_i^2}{3\lambda_0^2 M} \langle R_g^2 \rangle \text{sen}^2 \frac{\theta}{2} + 2A_2 c + \dots \quad \text{Ec.3.11}$$

en la que n_i , índice de refracción del disolvente, $\langle R_g^2 \rangle$ radio de giro cuadrático medio. Este radio nos describe la forma en la cual el área transversal o una distribución de masa de sitúa alrededor de su eje centroidal. Concretamente es el valor cuadrático medio de distancia de los puntos de la sección, o la distribución de masa, respecto a un eje que pasa por el centro de la molécula o el agregado.

Para obtener los datos de M , A_2 y $\langle R_g^2 \rangle$, deberíamos de hacer una doble extrapolación. Por un lado $\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}}$ a concentración nula, obteniendo una recta de cuya ordenada en origen podríamos obtener M y de cuya pendiente se obtendría $\langle R_g^2 \rangle$. La extrapolación a ángulo de observación cero, permitiría la obtención de M y A_2 .

Debemos de puntualizar que todo esto es aproximado para disoluciones de concentración finita, debido a los efectos de interferencia entre las partículas, ya que ahora las distancias entre las mismas cobran mayor relevancia en la intensidad de luz dispersada. La corrección obliga a tener en cuenta un factor de estructura $S(q,c)$, resultando una ecuación más completa que resume las peculiaridades de la disolución cuando en esta hay partículas o agregados de gran tamaño y con una concentración relativamente alta:

$$\Delta R_{\theta} = KcMP(q)S(q,c) \quad \text{Ec.3.12}$$

$P(q)$ es la función de forma de la macromolécula, que relacionará la intensidad de luz difundida realmente por la disolución a un ángulo determinado y la intensidad que se observaría en ausencia de las interferencias intermoleculares a ángulo 0.

Antes de las medidas de dispersión de la luz se realiza una medida de la variación del índice de refracción con la concentración de la muestra de estudio para determinar el incremento específico del índice de refracción, dn/dc , en el caso del AdCH₂CA en su forma de sal sódica, a diferentes concentraciones en agua, con una concentración de 15mM Carbonato/Bicarbonato Sódico. Se han obtenido los datos representados en la Figura 3.7.

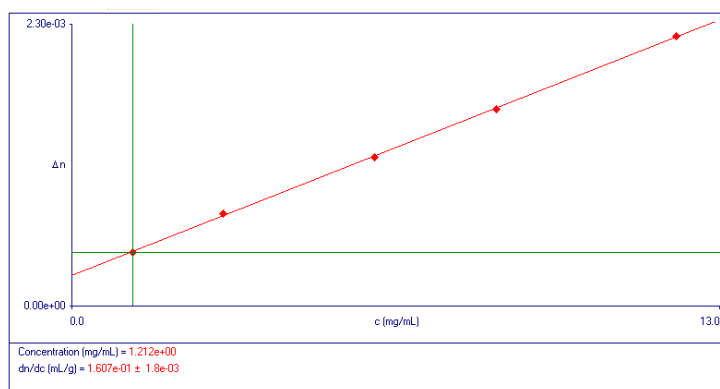


Fig.3.7 - Representación de la variación del índice de refracción de la disolución en función de la concentración para el AdCH₂CNa en tampón 15 mM Carbonato/Bicarbonato Sódico.

El valor obtenido para el incremento específico del índice de refracción para este compuesto, dn/dc (mL/g) = 0.1607 ± 0.0018 , en agua el valor obtenido para dn/dc (mL/g) = 0.178 ± 0.002 mL/g en agua.

Al representar la relación de Rayleigh en función de la concentración de la muestra (Figura 3.8) se observa que por encima de 0.7 mM existe una región de transición, a partir de la cual predominan los agregados en el medio.

Para una variación del índice de refracción con respecto a la concentración de: $dn/dc = 0.161 \pm 0.002$ mL/g, realizando un ajuste lineal para la región de agregación, aplicando la ecuación 3.8, obtenemos un valor de $M=2 \times 10^4$, $A_2= 3.10 \times 10^{-3}$, teniendo en cuenta el peso molecular obtendremos un número de agregación N_{agg} de 33 moléculas. Si realizamos el mismo ajuste sin tener en cuenta la cac , el resultado varía ligeramente obteniendo un valor de $M=1.67 \times 10^4$, $A_2=2.80 \times 10^{-3}$, con un número de agregación de 28 moléculas.

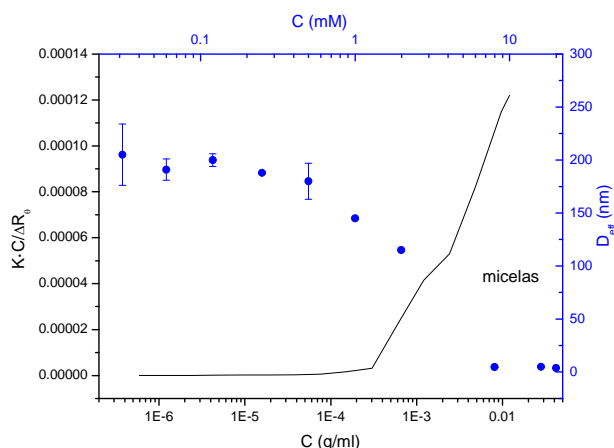


Fig. 3.8 Representación del Diámetro efectivo y relación de Rayleigh 90° en función de la Concentración AdCH₂CNa en tampón Carbonato/Bicarbonato Sódico 15 mM.

Se ha realizado la misma estimación, con una concentración 20 mM de AdCH₂CNa y disolución sin Tampón, C/BC 15 mM y diferentes concentraciones de NaCl, como ya comentamos anteriormente, obteniéndose los resultados que se resumen en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. M_w y N_{agg} obtenidos en la primera columna mediante la intensidad promedio a los ángulos 30° , 40° , 50° , 60° , 90° , 120° , 130° , 140° y 150° , comparando los obtenidos únicamente considerando la intensidad a 90° .

	M_w (g/ml)	N_{agg}	M_w (g/ml)	N_{agg}
sin NaCl	13224	22	16354	27
100 mM	20677	34	23779	39
200 mM	45889	76	47355	78

A partir de 0.2 M de NaCl en el medio, hemos observado la desestabilización del sistema por lo que no ha sido posible realizar medidas experimentales coherentes a partir de esta concentración de sal.

Se ha intentado realizar una extrapolación a ángulo cero, para concentraciones por encima de la *cac* obtenida, con medidas a 5, 10 y 20 mM para ángulos comprendidos entre 30° y 150° , pero de los datos obtenidos no se ha podido determinar un radio de giro coherente. También se han realizado medidas de dispersión de la luz estáticas para muestras del compuesto en agua mili-Q, sin ningún tipo de tampón, ni NaCl, Figura 3.9. De los datos obtenidos en agua vemos que con respecto a la muestra en tampón se produce un desplazamiento de todas las regiones hacia concentraciones más altas, observando los mismos fenómenos tanto a altas como a bajas concentraciones, aunque el sistema parece ser menos estable con mayores fluctuaciones.

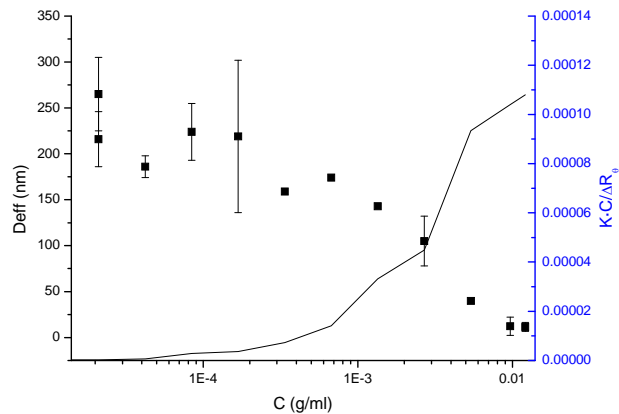


Fig. 3.9 Representación del Diámetro efectivo y relación de Rayleigh 90° en función de la Concentración AdCH₂CNa en Agua.

3.2.1.6 DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS - SMALL-ANGLE X RAY SCATTERING)

Como hemos visto hasta el momento la difusión de luz se encuentra entre las técnicas experimentales más versátiles en el estudio de las propiedades de macromoléculas o agregados moleculares. La dispersión de rayos X a bajo ángulo, se produce como efecto de la dispersión elástica de los electrones (longitud de onda entre 0.1 y 0.2 nm) por la muestra que presenta partículas del tamaño de nm, la medida se realiza a ángulos pequeños entre 0.1 y 10°. En este intervalo de medición podemos obtener información sobre la forma, el tamaño, distancias características de materiales parcialmente ordenados, en macromoléculas, agregados y heterogeneidades en la muestra de estudio.

El vector de onda asociado a la radiación dispersada cambiará en dirección pero no en magnitud. De este modo, se define el vector de dispersión como la variación en el vector de onda, cuyo módulo viene dado por la expresión. $Q = |\Delta k| = \frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \cdot \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right)$, en donde θ es el ángulo de la radiación dispersada, λ = longitud de onda incidente, $|\Delta k|$ módulo de la diferencia entre los vectores de radiación dispersada e incidente.

La radiación dispersada sufrirá momentos de interferencia al igual que sucedía en las técnicas anteriores, que vendrán determinadas por el tamaño, distribución y naturaleza química de las partículas o agregados dispersantes en la muestra. De este modo, la intensidad de la radiación dispersada la podemos expresar, en términos generales, como:

$$I(Q) = N_c \cdot P(Q) \cdot S(Q)$$

Ec.3.13

$P(Q)$ se corresponde con el factor de forma de la partícula que depende del tamaño, forma y de la diferencia de la densidad electrónica entre las partículas, agregados, etc. $S(Q)$, factor estructural, depende de las relaciones estructurales entre las partículas o agregados. N_c , es una constante que depende del sistema y número de partículas en la disolución.

Mediante SAXS se han realizado medidas de una disolución de concentración 20 mM en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM, obteniéndose un $D_{eff} = 4$ nm, un Radio de giro, R_g , de 1.9 ± 0.2 Å, Distancia máxima ij en la partícula, D_m , 50 Å y la intensidad a $q=0$, $I(0)$, 0.783.

Debemos de tener en cuenta que de los datos cristalográficos las distancias entre los extremos más alejados de la molécula de AdCH₂CA estirada se situaban cerca de los 20Å, con un ancho aproximado máximo inferior 5Å, por lo que sería posible la existencia de agregados de dos o tres unidades en la disolución que coexisten con agregados con mayor número de moléculas. Según veíamos anteriormente, los agregados mayores podían estar formados por un número de moléculas en el intervalo 22-33 según las condiciones del medio, incluso llegando a agregarse cerca de 100 moléculas antes de originar la desestabilización del sistema, con la consecuente aparición de precipitados en las muestras.

3.2.1.7 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

Se han preparado diferentes disoluciones de AdCH₂CNa con concentración 20 mM, en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM. La Figura 3.10 muestra algunas imágenes tomadas mediante TEM. Durante la realización del experimento se observó que al enfocar el haz de electrones se produce una destrucción de la muestra, por lo que es difícil realizar la medición.

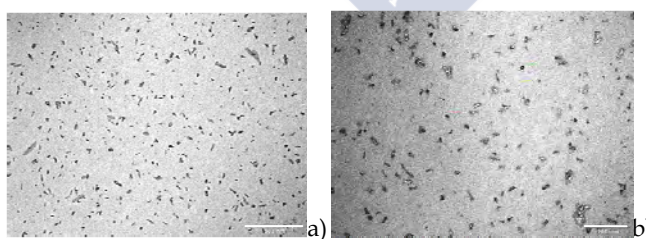


Fig. 3.10 Imágenes TEM tomadas para una concentración 20 mM de AdCH₂CNa en Tampón C/BC Na 15 mM. Escala de a) 500 nm y b) 200 nm respectivamente.

En agua y una concentración 20 mM se observó un fenómeno similar al visto en la muestra de tampón. En la Figura 3.11, se observan en la muestra agregados de diversas formas y tamaños no demasiado homogéneos.

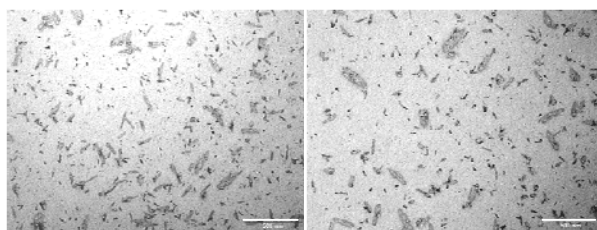


Fig. 3.11 Imágenes TEM tomadas para una concentración 20 mM de AdCH_2CNa en agua mili-Q. Escala de 500 nm.

A 0.1 mM, en presencia de tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM, se han podido observar agregados más o menos esféricos bastante polidispersos, con los siguientes tamaños medidos: diámetro experimental agregados pequeños 31 ± 10 nm y estructuras tipo vesiculares 127 ± 15 nm, del total de partículas analizadas 80 y 35 respectivamente. Véanse las Figuras 3.12 y 3.13.

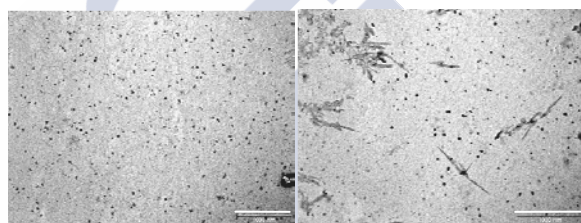


Fig. 3.12 Imágenes TEM tomadas para una concentración 0.1 mM de AdCH_2CNa en tampón C/BC 15 mM. Escala de 1 μm .

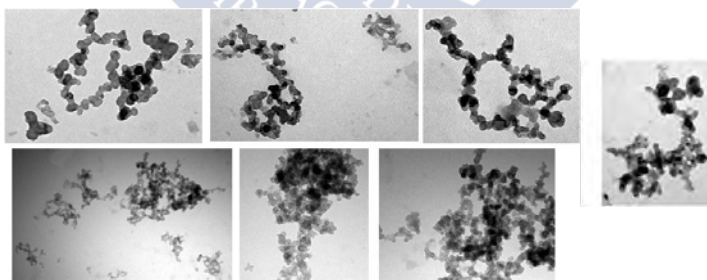


Fig. 3.13 Imágenes TEM analizadas para la concentración 0.1 mM, aumentos entre 50 y 200 nm.

A la misma concentración de 0,1 mM pero en agua, se ha observado un fenómeno muy similar al anterior. Hay que decir que no observamos un aumento en el tamaño medio de partícula, como sí observábamos en el caso de las medidas en disolución. El diámetro experimental determinado fue de 33 ± 11 nm ($N=151$; Figura 3.14).

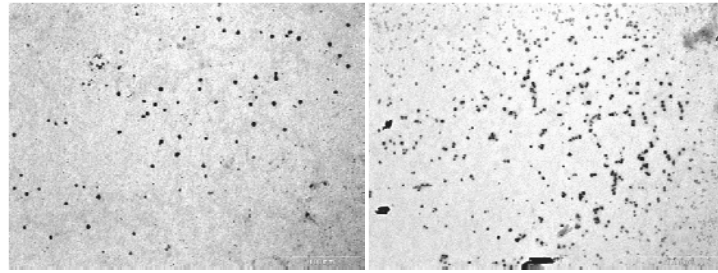


Fig. 3.14 Imágenes TEM tomadas para una concentración 0.1 mM de AdCH_2CNa en agua mili-Q. Escala de 1 μm .

Se han tomado también imágenes de muestras a 1 mM y 10 mM de AdCH_2CNa . Para la concentración de 1 mM se han encontrado estructuras o agregados esféricos con dos poblaciones de tamaños de diámetros 67 ± 17 y 113 ± 22 nm y estructuras vesiculares de tamaños 38 ± 15 nm de un total de 137 partículas analizadas. Para la muestra de concentración 10 mM se observan agregados esféricos de diámetros 37 ± 15 , 103 ± 42 y 192 ± 45 nm, para un total de 115 partículas analizadas. También se observa un gran número de asociaciones cristalinas de diversos tamaños que van desde 30 nm a varias micras. Debemos de decir que estamos en una zona de inestabilidad, por lo que es muy probable que debido a la metodología de preparación de la muestras, así como a las concentraciones que se han utilizado, de lugar a la aparición de diferentes estructuras agregadas de diferentes tamaños como las que mostramos en las Figuras 3.15 y 3.16.

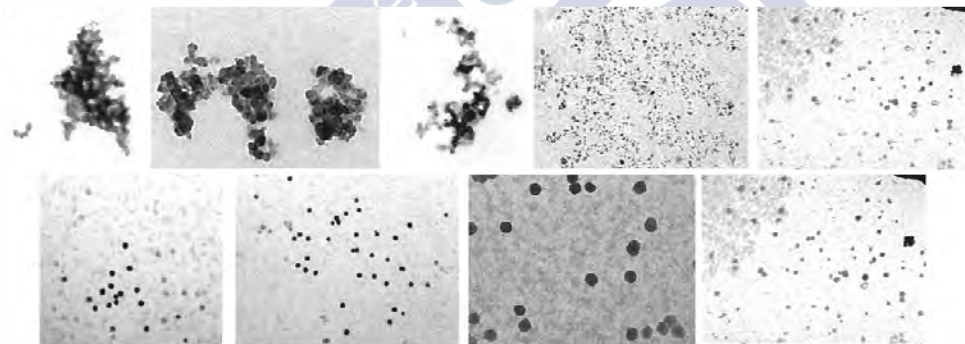


Fig. 3.15 - Imágenes TEM de concentración 1 mM para el AdCH_2CNa en tampón C/BC 15 mM.

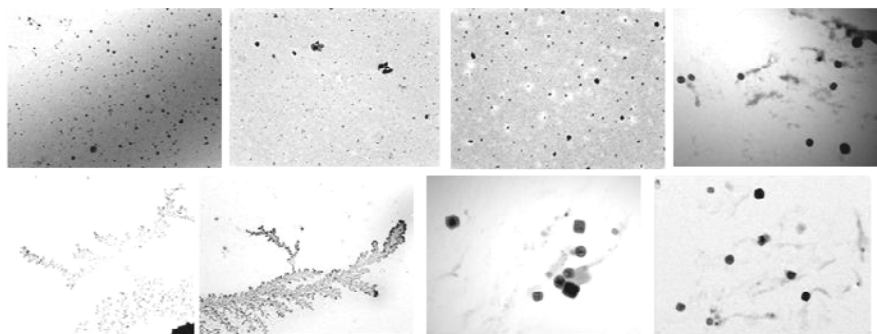


Fig. 3.16 - Imágenes TEM de concentración 10 mM para el AdCH_2CNa en tampón C/BC 15 mM.

Debemos de puntualizar que existe una gran divergencia entre las medidas realizadas mediante microscopía y las otras técnicas vistas hasta el momento, hecho que puede ser atribuible a que al preparar la muestra para medir en el microscopio, evaporamos el disolvente, por lo que en este proceso estamos realizando una variación de la concentración y condiciones de las muestras. Consecuentemente, el valor de las concentraciones y las imágenes no guardan una relación directa con las otras técnicas instrumentales empleadas.

3.2.2. NbCH₂CA - Ácido [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(Norbornano-2-acetil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico

3.2.2.1 SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE

Siguiendo el mismo procedimiento que con el compuesto anterior, para el NbCH₂CA se han preparado diferentes muestras para realizar el experimento de gelificación. En la Tabla 3.6, se muestran los resultados de las pruebas realizadas sobre este compuesto sintetizado en la presente tesis en los diferentes disolventes estudiados.

Tabla 3.6 - Las observaciones del estado se han realizado en el momento del calentamiento, justo después de enfriar pasado unos 30 min., a las 24h y a los 7 días del calentamiento. n=no soluble, s=soluble, p=precipitado, p_c=precipitado cristalino, g=gel, g(c)=gel turbio, g(e)=esferulitas de gel.

Disolvente	p.e. disolvente(°C)	Estado antes calentar	Estado al enfriar	Estado a las 24h	Estado a los 7 días
Benceno	80	n	p	p	p
Tolueno	110.6	n	p	p	p
p-Xileno	138	n	p	p	p
m-xileno	138.5	n	p	p	p
Ciclohexano	81	n	p	p	p
Hexano	68	n	p	p	p
n-Pentano	36	n	p	p	p
2,2,4-Trimetilpentano	99	n	p	p	p
Benzaldehido	179	s	s	s	s
Acetofenona	202	s	s	g (↓μ)	g (↓μ)
Clorobenceno	132	s	g	g (↑μ)	g (↑μ)
Anisol	155	s	g	p _c	p _c
1-Pentanol	137	s	s	s	s
1,4-Dioxano	101	s	g	g(e)	g(e)
2-Butanol	98	s	s	s	s
2-Propanol	82	s	s	s	s
Cloroformo	62	s	s	s	s
Diclorometano	40	s	p	p	p
Tetrahidrofurano	66	s	s	s	s
Dimetilsulfóxido	189	s	s	s	s

Como hemos visto en el capítulo 2 de la presente tesis, en algunos de los medios orgánicos de estudio se han obtenido sistemas cristalinos del compuesto. En este caso, se han obtenido monocristales en acetona, dimetilsulfóxido, 2-butanol y 2-propanol, debemos de destacar que estos disolventes nos podrían servir como vías de purificación en el caso de que los compuestos tuviesen interés desde el punto de vista

industrial, al obtenerse el compuesto en la mayoría de los casos, con un alto grado de pureza. También se ha observado la formación de geles en acetofenona y clorobenceno a las concentraciones de estudio y la generación de esferulitas de gel en 1,4-dioxano.

Hemos observado que la molécula sintetizada es soluble en otros disolventes como THF, cloroformo, 1-pentanol y benzaldehído, en los cuales no se han obtenido estructuras cristalinas, por lo menos con los métodos y concentraciones aplicadas.

En la Figura 3.17 se muestran dos imágenes de microscopio óptico del organogel obtenido en clorobenceno.

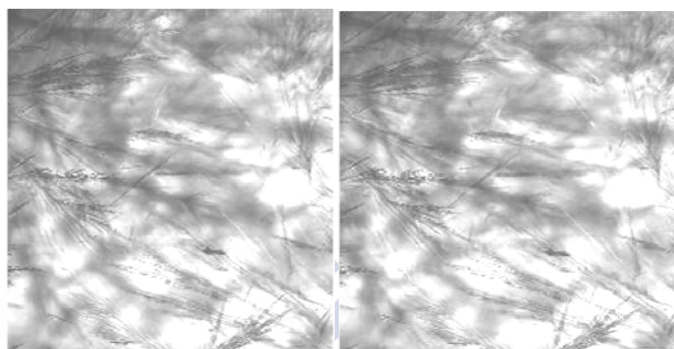


Fig. 3.17 - Imágenes de microscopía óptica de organogel de NbCH_2CNa en clorobenceno.

También se muestran imágenes del microscopio óptico de las esferulitas obtenidas en 1,4-dioxano (Figura 3.18).

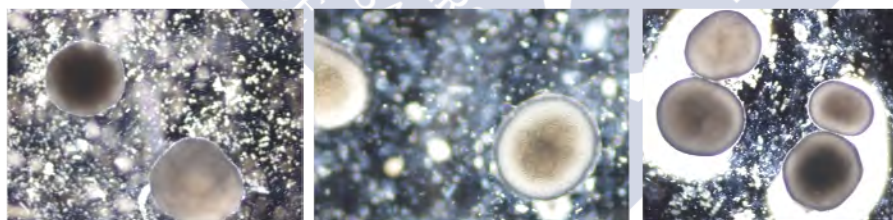


Fig. 3.18 - Imágenes de microscopía óptica de esferulitas de organogel de NbCH_2CNa en 1,4-dioxano.

Imágenes obtenidas mediante microscopía cofocal, figura 3.19:

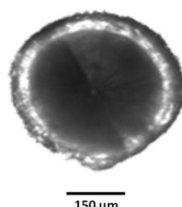


Fig. 3.19 - Imágenes de microscopía óptica cofocal, esferulitas de NbCH_2CNa en 1,4-dioxano.

3.2.2.2 ESTUDIO DE DENSIDAD

Se ha realizado un estudio de la densidad del NbCH_2CNa en agua para concentraciones entre 5 y 60 mM, para observar la estabilidad y variación de la misma con la concentración, hemos observado que el compuesto presenta una buena solubilidad en el rango de concentraciones estudiado a temperatura ambiente, 25 °C, con un comportamiento ascendente en el cual la densidad aumenta al aumentar la concentración del compuesto, obteniéndose una tendencia lineal de la siguiente forma $\rho(\text{g/ml}) = 0.001 \cdot C(\text{mg/ml}) + 1.002$, con $r^2=0.99$, muy similar a la obtenida para el compuesto anteriormente estudiado.

3.2.2.3 ESTUDIO DE TENSIÓN SUPERFICIAL.

Al igual que con el compuesto anterior se han realizado medidas de tensión superficial, para el análisis del NbCH_2CA en su forma de sal sódica en agua mili-Q y en buffer 15 mM de carbonato y bicarbonato sódico, con un pH = 10. Los resultados se muestran en la Figura 3.20.

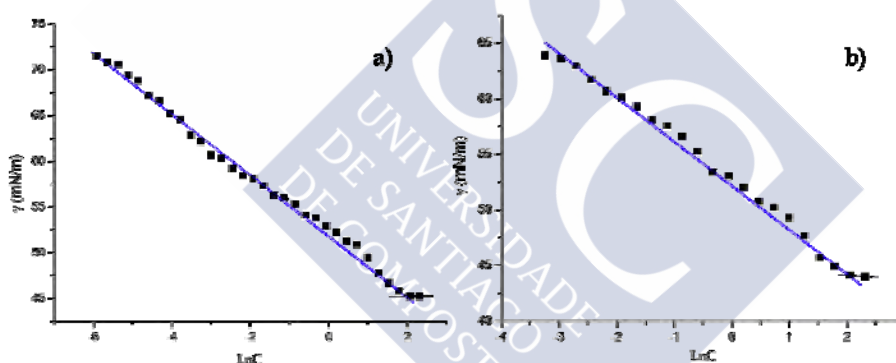


Fig.3.20 Representación gráfica de la tensión superficial, γ , frente al logaritmo neperiano de la concentración para NbCH_2CA en agua a) y en disolución tampón de carbonato/bicarbonato sódico de concentración total 15 mM b) a 25°C.

Representando los datos de tensión superficial frente al $\ln(C)$ y calculando la pendiente, obtenemos los datos de la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 - Parámetros deducidos de los experimentos de tensión superficial para la agregación y adsorción en la interfase aire-agua para NbCH_2CA en Tampón C/BC de Na 15 mM.

Medio	cac (mM)	$10^6 \Gamma$ ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)	a_0 (Å^2)
Tampón C/BC 15 mM	7.4	1.56	107

Los valores de cac obtenidos, son ligeramente superiores a los del AdCH_2CA . Si lo comparamos con el sal biliar de partida, observamos que es ligeramente inferior, por lo

que la presencia del grupo hidrófobo norbornilo aumenta ligeramente las propiedades surfactantes de estos derivados de sales biliares, situándose al nivel de otras sales biliares naturales (*vide supra*).

Del análisis del contorno de la cara hidrófoba de los cristales obtenidos observamos que para el cristal obtenido en acetona/agua, el área ocupado por la molécula es de 141 \AA^2 , mientras que en el disolvente de menor polaridad, 2-propanol, esta tendría un área de unos 134 \AA^2 (determinaciones realizadas mediante los programas Mercury e Image J). La proximidad de los valores anteriores sugiere que la molécula tendría una disposición plana en la interfase aire-agua. Los comentarios realizados en la introducción del presente capítulo son aplicables a los valores aquí recogidos por lo que no haremos comentarios adicionales.

3.2.2.4 ESTUDIO DE FLUORESCENCIA

La Figura 3.21 muestra la dependencia de la relación I_1/I_3 de la pireno utilizado como sonda fluorescente.

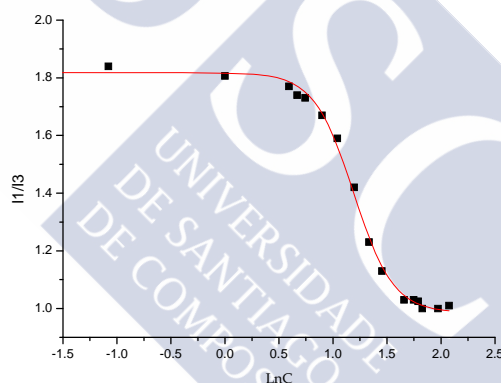


Fig.3.21 - Medidas de fluorescencia con una concentración de pireno $7 \times 10^{-6} \text{ M}$ para el NbCH_2CNa .

El valor de la $cac \approx 3.4 \text{ mM}$, se aleja ligeramente del obtenido mediante tensión superficial. Observamos que la relación I_1/I_3 toma valores próximos a 1.8 cuando la concentración es baja (véanse la Tabla 3.3 y la Figura 3.21) por lo que solo existen monómeros de surfactante en la disolución o los agregados no son lo suficientemente grandes para incorporar moléculas de pireno en su interior, por lo tanto, el pireno se encuentra en el medio acuoso polar.

A concentraciones más elevadas, por encima de la cac determinada, cuando la interfase está claramente saturada y existen agregados en el seno de la disolución, la relación I_1/I_3 toma valores que están próximos a la unidad, valores relativamente más altos que los obtenidos para el colato sódico 0.75 ,²⁸ pero ligeramente superiores a los obtenidos para el AdCH_2CA , lo que era de esperar, ya que el grupo hidrófobo es menor.

Atendiendo a los valores del pireno en los diferentes disolventes, debemos de observar que a altas concentraciones este se encuentra en un medio más hidrófobo, menos polar como el que podrían formar los agregados de derivado de sal biliar en su interior, valor entre el n-butanol y el metanol, pero que es un medio menos hidrófobo que el que forman los agregados del colato de sodio.

3.2.2.5 ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ.

Al igual que con el compuesto estudiado anteriormente hemos empleado las técnicas estáticas y dinámicas de dispersión de luz láser, para obtener una serie de información que nos será útil a la hora de estudiar el comportamiento del NbCH₂CA en disolución.

3.2.2.5.a - Medidas de dispersión de luz dinámica, (Dynamic Light Scattering, DLS).

Se han preparado diferentes disoluciones de NbCH₂CNa con diferentes concentraciones que van de 20 mM a 10 μM, en presencia de tampón carbonato/bicarbonato (C/BC) sódico 15 mM y se han realizado medidas de dispersión de luz dinámica. Los resultados se muestran en la Figura 3.22.

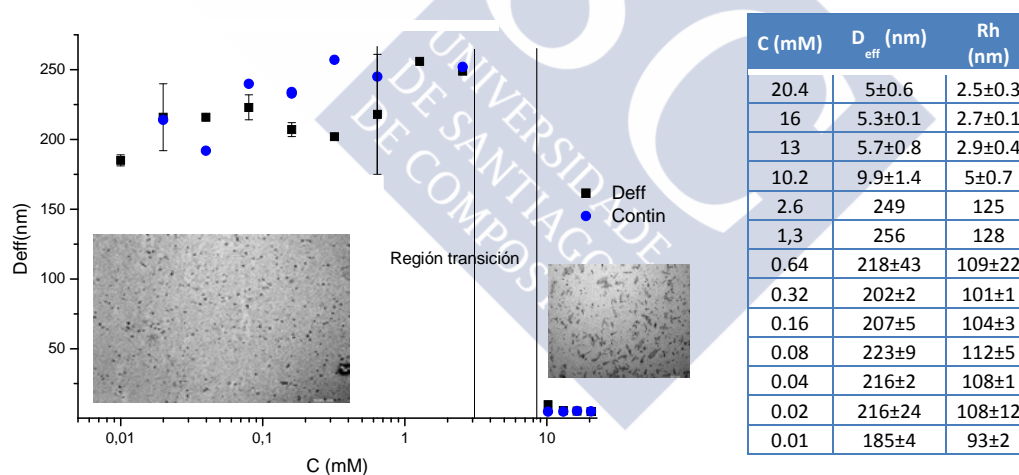


Fig. 3.22 Representación del diámetro efectivo (Cumulantes) y diámetro (CONTIN) en función de la concentración de NbCH₂CNa en tampón carbonato/bicarbonato de sodio 15 mM.

Se ha probado a realizar mediciones filtrando las muestras antes de ser medidas y sin filtrar, observando que el empleo del filtro de 15 y 30 nm no afectaba a la hora de los datos obtenidos mediante cumulantes, mientras que con los métodos CONTIN y NNLS (mínimos cuadrados) obteníamos muestras polidispersas con diámetros entre 2.8-6.5 nm y 119-220 nm de las mismas muestras, a 25°C. Estas pruebas fueron realizadas para concentraciones entre 10, y 60 mM de NbCH₂CNa con 15 mM de

tampón C/BC de sodio, pH=10, debido a la aparición de distribuciones bimodales, midiendo a varios ángulos (50°, 90° y 150°).

Se observa claramente que existe una región de transición entre 2.6 y 10.2 mM, que se correspondería como hemos observado con anterioridad con la *cac*, o el paso a la formación de agregados de mayor tamaño en disolución que habíamos situado anteriormente en 7 mM como *cac mediante tensión superficial* y 3.4 mM *mediante fluorescencia*. Por esta técnica la *cac* para este compuesto se situaría a concentraciones ligeramente superiores por ejemplo como punto medio se podría situar en 6.4 mM.

Se han realizado medidas de disoluciones de NbCH₂CNa a concentraciones más altas de las estudiadas anteriormente, 10-60 mM, en agua y con diferentes concentraciones de NaCl (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 M de NaCl), con la intención de variar la fuerza iónica del medio y observar el comportamiento de nuestro compuesto. También se ha variado el ángulo a 50°, 90° y 150°, para evitar posibles interferencias en las medidas, efectos de forma de los agregados, etc.

Se observa que el análisis normal de los datos mediante el método de cumulantes, muestra una única distribución con diámetros efectivos que van entre 65-40 nm de promedio y que varían ligeramente al aumentar la concentración de nuestro compuesto, observando que se estabiliza a las concentraciones más altas. En cambio, el método de CONTIN muestra una distribución polidispersa con tamaños de partícula entre 3-7 nm y 119-220 nm. También debemos de tener en cuenta que la muestras con concentración de NaCl por encima de 0.3 M no eran solubles completamente a la temperatura de experimentación y presentaban precipitados en el medio.

Al aumentar la fuerza iónica del medio, se observa una ligera tendencia a estabilizar agregados o partículas de mayor tamaño, fenómenos ya descritos para el AdCH₂CNa. En la Tabla 3.8, vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de NbCH₂CNa en disolución acuosa, medidas a diferentes ángulos.

En la Tabla 3.9 vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de NbCH₂CNa en disolución acuosa con una concentración 0.1 M de NaCl, medidas también a diferentes ángulos.

Como tendencia general podemos observar que la presencia de fuerza iónica en el medio produce un aumento del tamaño de partícula estabilizada, que se mantiene prácticamente constante a las concentraciones de estudio.

En la Tabla 3.10 vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de NbCH₂CNa en disolución acuosa con una concentración 0.2 M de NaCl, medidas también a diferentes ángulos, observando un ligero aumento

en el tamaño del agregado estabilizado, como sucedía en el caso anterior.

Tabla 3.8 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa, Poly, polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	100.3	0.225	3.4 (24%)	166	2.1
90°	63.5	0.250	2.6 (32%)	119	1.2
150°	40.7	0.294	3 (41%)	107	1.2
C=20mM, 50°	92.7	0.459	3.1 (18%)	190	2.3
90°	71.6	0.315	3.3 (23%)	135	2.1
150°	60.9	0.182	3.4 (41%)	123	2.2
C=30mM, 50°	53.3	0.388	2.5 (50%)	162	1.8
90°	44.4	0.257	2.8 (40%)	186	1.5
150°	38.3	0.197	2.8 (51%)	105	1.6
C=40mM, 50°	74.9	0.219	3.2 (36%)	182	2.1
90°	44.9	0.299	2.9 (58%)	180	1.2
150°	33.2	0.245	3.5 (71%)	105	2.2
C=60mM, 50°	57.6	0.358	2.4 (28%)	235	1.9
90°	43	0.236	2.4 (43%)	152	1.9
150°	27.3	0.216	3.5 (81%)	101	2.1

Tabla 3.9 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 0.1 M de NaCl. Poly, polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	65.4	0.385	5 (31%)	216	2.5
90°	39.5	0.350	3.4 (32%)	139	2.3
150°	26	0.265	5.5 (49%)	125	4.4
C=20mM, 50°	70.3	0.270	4.5 (35%)	171	3.8
90°	37.5	0.297	4.6 (48%)	159	2.4
150°	28.5	0.237	4.8 (63%)	147	3.7
C=30mM, 50°	72.4	0.102	4.5 (47%)	201	3.3
90°	26.9	0.248	4.5 (73%)	136	3.8
150°	19	0.183	4.4 (74%)	128	3.2
C=40mM, 50°	120.4	0.048	3.4 (55%)	139	2.4
90°	25.7	0.217	4.3 (65%)	156	3.2
150°	26.4	0.123	3.9		3.7
C=60mM, 50°	180.3	0.085	4.1 (58%)	175	3.3
90°	31.1	0.209	4.1 (52%)	180	3.2
150°	21.1	0.169	3.3 (70%)	139	2.5

Al seguir aumentando la fuerza iónica del medio, mediante el incremento de la concentración de NaCl (0.3 M), observamos que los agregados estabilizados, no siguen aumentando en tamaño, y a concentraciones superiores de NaCl se produce una desestabilización del sistema con la presencia de agregados. En la Tabla 3.11 vemos un resumen de los datos obtenidos.

Tabla 3.10 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 200mM de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	78.4	0.386	5.6 (29%)	242	2.9
90°	44.3	0.329	5.5 (43%)	170	3
150°	30.1	0.231	5 (58%)	134	2.8
C=20mM, 50°	131.7	0.046	5.4 (37%)	200	2.7
90°	45	0.234	5 (69%)	104	3.9
150°	24.9	0.225	5.4 (63%)	140	4.4
C=30mM, 50°	166.2	0.081	6.1 (52%)	204	4.8
90°	31.8	0.244	5 (62%)	181	4
150°	19.2	0.174	5.2 (72%)	144	3.8
C=40mM, 50°	74.5	0.178	5.7 (40%)	191	5.1
90°	48.3	0.070	4.9 (66%)	151	4.1
150°	16.1	0.154	3.9		3.7
C=60mM, 50°	88.8	0.164	4.9 (41%)	253	3.3
90°	36.3	0.246	5 (46%)	202	2.6
150°	23.3	0.206	4.9 (75%)	120	3.9

Tabla 3.11 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 300mM de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	101.5	0.092	5.7 (33%)	181	2.9
90°	44.8	0.311	5.9 (44%)	180	3.0
150°	28.9	0.245	5.8 (46%)	130	3.6
C=20mM, 50°	67.2	0.334	5.7 (19%)	291	4.1
90°	50	0.207	5.5 (50%)	160	2
150°	24.3	0.236	5.2 (59%)	148	3.6
C=30mM, 50°	110.1	0.062	5.8 (45%)	196	3.7
90°	32.8	0.253	5.7 (48%)	158	3.4
150°	27	0.154	4.9 (73%)	124	2.6
C=40mM, 50°	50.6	0.189	5.4 (54%)	233	4.3
90°	22.3	0.191	5 (66%)	158	3.5
150°	11.9	0.146	4.7 (68%)	137	3.5
C=60mM, 50°	83.4	0.213	5.5 (41%)	254	3.4
90°	43	0.211	5.4 (68%)	201	3.3
150°	26	0.183	4.9 (81%)	180	2.5

En la Tabla 3.12 vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de NbCH₂CNa en disolución acuosa con una concentración 0.4 M de NaCl, medidas también a diferentes ángulos, observando la estabilización en el tamaño del agregado, en donde las variaciones en promedio del tamaño son muy pequeñas.

Tabla 3.12 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 400mM de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	146.4	0.107	5.9 (24%)	212	3.4
90°	59	0.302	5.9 (39%)	163	3.6
150°	39.4	0.206	5.4 (65%)	122	2.7
C=20mM, 50°	125.3	0.115	5.8 (30%)	178	3.5
90°	44.5	0.264	5.8 (49%)	201	2.1
150°	71.5	0.025	5.9 (63%)	125	3.4
C=30mM, 50°	128.4	0.179	6 (48%)	326	3.6
90°	43.7	0.287	5.9 (49%)	220	3.4
150°	27.7	0.217	4.6		4
C=40mM, 50°	59.7	0.240	6 (49%)	281	3.7
90°	30.2	0.200	6.4 (72%)	204	2.0
150°	10.9	0.173	6 (78%)	137	3.5
C=60mM, 50°	84	0.218	6.7 (34%)	306	2.1
90°	45.2	0.227	6.1 (50%)	182	3.4
150°	39.1	0.126	5.3 (85%)	182	2.7

Se han realizado ensayos filtrando muestras 60mM de NbCH₂CNa en tampón 15mM C/BC y 100 mM de NaCl. Se han filtrado con filtros de 450, 200 y 30 nm para observar el efecto entre los diámetros pequeños y grande. Se ha visto que el tamaño de agregado con valores de diámetros entre 4.5-5 nm y 163-200 nm, para la misma concentración de derivado biliar no presentan diferencias significativas tomando como referencia las medidas a 90° y los valores obtenidos mediante CONTIN filtrando con 450 y 200 nm. Por lo tanto, el filtrado con este tipo de filtración no afecta en gran medida a la distribución de tamaños en la muestra, debemos de considerar una excepción del filtro de 30 nm, para el cual vemos que al realizar el filtrado se están eliminando los agregados de mayor tamaño, véase datos en negrita de la Tabla 3.13.

Tabla 3.13 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 100mM de NaCl y tampón C/BC de Na 15 mM, Poly , polidispersidad, I, intensidad medida en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración, filtro empleado y ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)	
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)
C=60mM, 450 nm, 50°	90.9	0.204	5.7 (30%)	82
90°	51.2	0.168	4.7 (59%)	187
150°	30.7	0.179	4.9 (76)	163
C=60mM, 30 nm, 50°	4.2	0.214	3.9	--
90°	3.4	0.303	4.6	--
150°	--	--	--	--
C=60mM, 200 nm, 50°	130.7	0.071	4.9 (31%)	199
90°	54.3	0.291	4.5 (47%)	158
150°	39.9	0.216	4.9 (59%)	164

Se realizó la medición a las 24h, para ver la estabilidad de las muestras y se realizaron las mismas medidas de DLS, no observándose una variación significativa del tamaño de partícula, por lo que se puede concluir que el sistema bajo estas condiciones es bastante estable (Tabla 3.14).

Tabla 3.14 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 0.1 M de NaCl y tampón C/BC de Na 15 mM, pasadas 24h. Poly, polidispersidad, I, intensidad medida en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración, filtro empleado y ángulo de medida	Cumulantes		CONTIN (I&D)	
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)
C=60mM, 450 nm, 50°	40.7	0,255	5.1 (57%)	162
90°	66.7	0,287	4.9 (42%)	217
150°	222.4	0,135	6.2 (17%)	247
C=60mM, 30 nm, 50°	4.4	0,199		
90°	4.1	0,273	5.2	
150°				
C=60mM, 200 nm, 50°	72.1	0,234	4.8 (44%)	224
90°	44.1	0,228	4.3 (63%)	154
150°	17.2	0,209	5.1 (77)	162

Se han preparado disoluciones de NbCH₂CNa con diferentes concentraciones que van de 20 mM a 80µM, en agua mili-Q, sin presencia de tampón o sales a mayores y se han realizado medidas de dispersión de luz dinámica, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3.23.

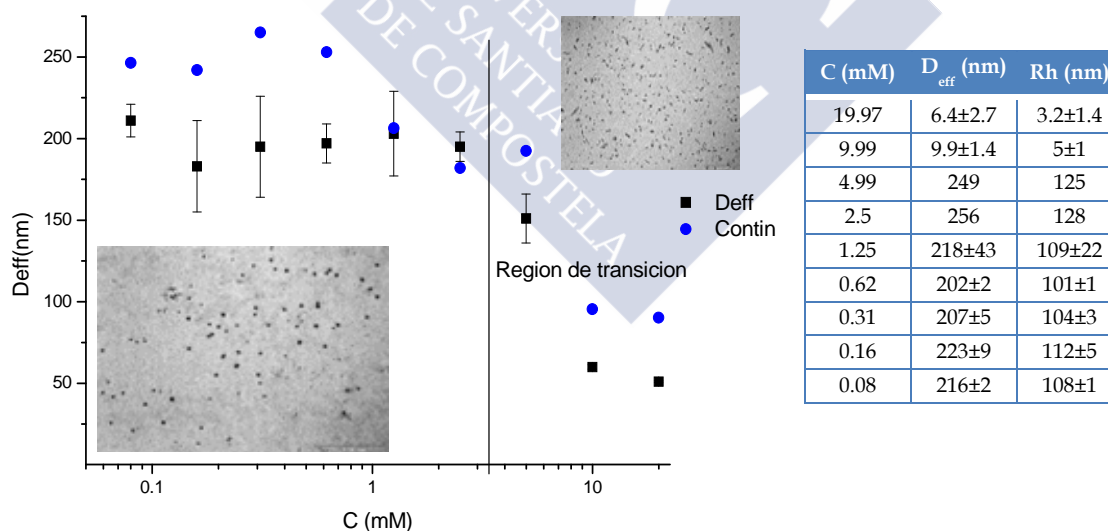


Fig. 3.23 Representación del Diámetro efectivo mediante Cumulantes y Diámetro mediante CONTIN en función de la concentración de NbCH₂CNa en Agua.

Se observa que ante la ausencia de tampón, se producen los mismos fenómenos que veíamos anteriormente, pero todo se desplaza hacia regiones superiores. La *región de transición* empieza a unas concentraciones por encima de 5 mM, valor coherente si

tenemos en cuenta los valores de cac obtenidas por las otras técnicas. También observamos que a concentraciones próximas a 20 mM el sistema aún permanece inestable. Con un aumento de tamaño de agregados y un sistema más desestabilizado, existen mayores fluctuaciones lo que entraña también una mayor dificultad a la hora de realizar las mediciones.

3.2.2.5.b - Medidas de dispersión de luz estáticas a 90° , (Static Light Scattering, SLS).

Antes de las medidas de dispersión de la luz se realiza una medida de la variación del índice de refracción con la concentración de la muestra de estudio para determinar el valor de (dn/dc) . En el caso del $NbCH_2CNa$ en su forma de sal sódica, a diferentes concentraciones en agua, con una concentración de 15mM Carbonato/Bicarbonato Sódico, se han obtenido los datos representados en la Figura 3.24.

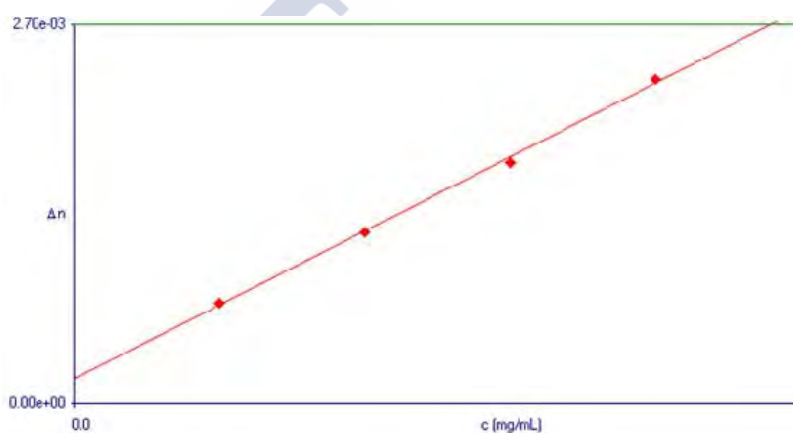


Fig.3.24 - Representación de la variación del índice de refracción de la disolución en función de la concentración para el $NbCH_2CNa$ en tampón 15 mM Carbonato/Bicarbonato Sódico.

El valor de la pendiente es de dn/dc (ml/g) = 0.1862 ± 0.0056 .

Al representar la relación de Rayleigh en función de la concentración de la muestra (Figura 3.25) se observa que por encima de 5 mM encontramos una región en la cual predominan los agregados en el medio. También se observa una región de transición a concentraciones más bajas para luego estabilizarse con agregados de mayor tamaño que pueden dar lugar a fenómenos de cristalización o precipitación del sistema.

Para la concentración de 60 mM se han realizado varios ensayos de SLS a diferentes ángulos para tratar de determinar M_w y los números de agregación mediante la realización de una representación de Debye. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3.15 y en la Figura 3.26.

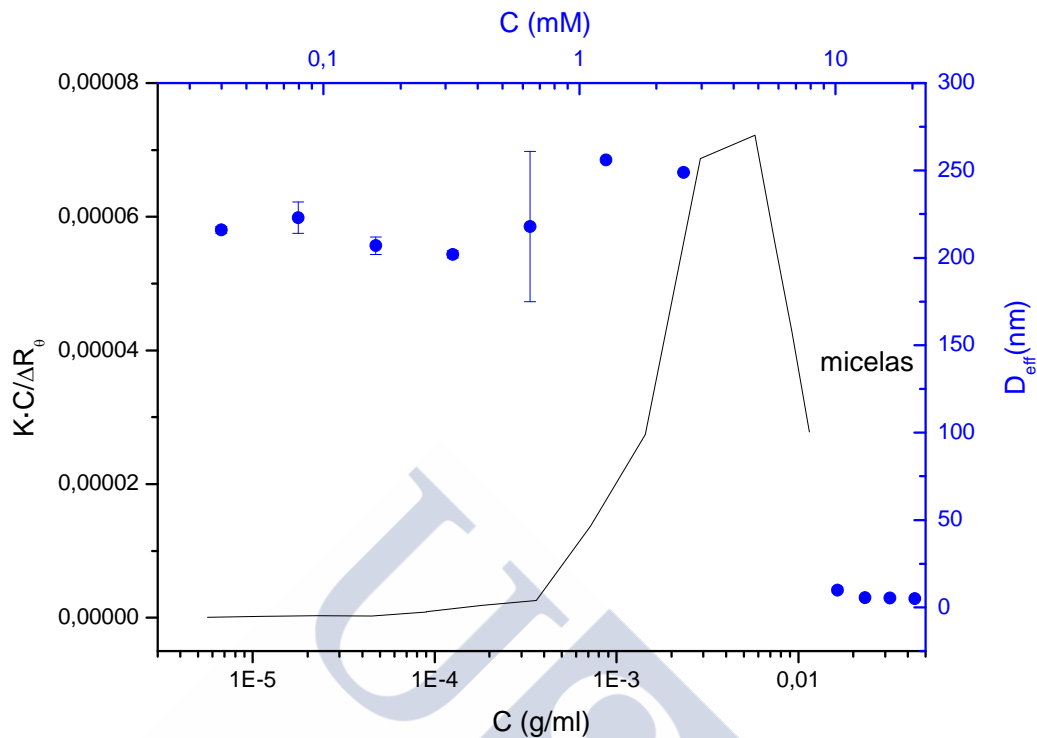


Fig. 3.25 Representación del Diámetro efectivo y relación de Rayleigh 90° en función de la Concentración NbCH₂CNa en tampón Carbonato/Bicarbonato Sódico 15 mM.

Tabla 3.15 Datos obtenidos SLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM, siendo χ^2 chi-cuadrada reducida.

Ángulo (°)	M _w (g/mol)	χ^2	A ₂ (cm ³ mol/g ²)	N _{ag}	% pequeña(N _{ag})	M _w (g/mol) (N _{ag})-corregido
50	32900±270	1130	(1.463±0.007)·10 ⁻³	58	31%(18)	(3.6±0.5)×10 ³ (6±1)
70	30360±300	872	(1.664±0.009)·10 ⁻³	54		
90	24130±230	722	(1.814±0.011)·10 ⁻³	43	39%(17)	(2.9±0.4)×10 ³ (5±1)
110	17510±130	533	(1.709±0.011)·10 ⁻³	31		
130	14379±92	582	(1.658±0.011)·10 ⁻³	25		
150	12554±65	547	(1.642±0.010)·10 ⁻³	22	57%(13)	(3.4±0.2)×10 ³ (6±0,4)

Si nos centramos en la población de partículas pequeñas obtenemos un M_w promedio de 3.1×10³ con un N_{ag} promedio de 6 moléculas.

Se ha realizado el mismo procedimiento para las muestras con diferentes concentraciones de NaCl, o de fuerza iónica. Al añadir 0.10 M de NaCl, se obtienen los datos mostrados en la Tabla 3.16 y en la Figura 3.27.

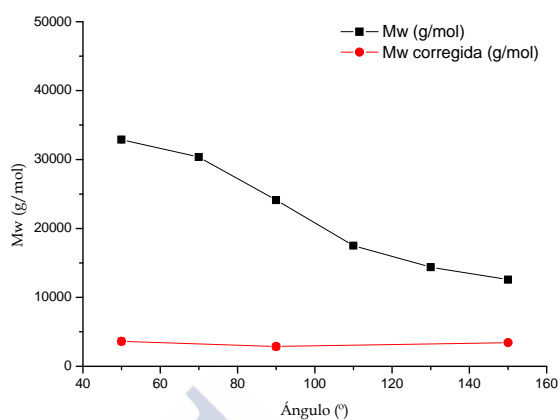


Fig. 3.26 Representación del Mw frente el ángulo de medición, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM .

Tabla 3.16 Datos obtenidos SLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.1 M de NaCl.

Ángulo (°)	M _w (g/mol)	χ ²	A ₂ (cm ³ ·mol/g ²)	N _{ag}	% pequeña(N _{ag})	M _w (g/mol) (N _{ag})-corregido
50	40020±170	344	(7.591±0.017)·10 ⁻⁴	71	45% (32)	(9.9±0.4)×10³ (18±1)
70	32760±150	304	(7.890±0.036)·10 ⁻⁴	58		
90	27970±130	223	(7.273±0.043)·10 ⁻⁴	49	54% (26)	(1.0±0.2)×10⁴ (18±3)
110	25340±120	174	(8.618±0.046)·10 ⁻⁴	45		
130	23223±97	184	(8.806±0.045)·10 ⁻⁴	41		
150	21013±70	197	(8.547±0.039)·10 ⁻⁴	37	71% (26)	(1.1±0.1)×10⁴ (20±2)

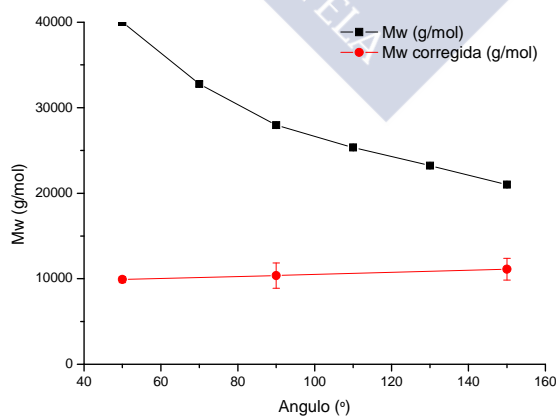


Fig. 3.27 Representación del Mw frente el ángulo de medición, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.1 M de NaCl.

Al igual que sucedía anteriormente ahora el M_w promedio obtenido es de 1.1×10^4 con un N_{ag} promedio de 19 moléculas.

Se ha realizado el mismo procedimiento aumentando la concentración de NaCl a 0.2 M, obteniendo los datos mostrados en la Tabla 3.17 y en la Figura 3.28.

Al igual que sucedía anteriormente ahora el M_w promedio obtenido es de 1.8×10^4 con un N_{ag} promedio de 31 moléculas.

Se ha realizado el mismo procedimiento aumentando la concentración de NaCl a 0.3 M. Se obtienen los datos mostrados en la Tabla 3.18 y en la Figura 3.29.

Tabla 3.17 Datos obtenidos SLS, para el $NbCH_2CNa$ con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.2 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 ($cm^3 \text{ mol/g}^2$)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	$M_w(g/mol) (N_{ag})$ -corregido
50	40510±100	858	$(2.569 \pm 0.013) \cdot 10^{-4}$	72	40% (29)	$(1.38 \pm 0.05) \times 10^4$ (24±1)
70	38600±120	628	$(3.657 \pm 0.018) \cdot 10^{-4}$	68		
90	32120±100	433	$(3.961 \pm 0.023) \cdot 10^{-4}$	57	57% (32)	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^4$ (35±5)
110	28340±92	333	$(4.144 \pm 0.026) \cdot 10^{-4}$	50		
130	26453±79	337	$(4.320 \pm 0.026) \cdot 10^{-4}$	47		
150	25164±64	450	$(4.560 \pm 0.023) \cdot 10^{-4}$	44	54% (24)	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^4$ (27±2)

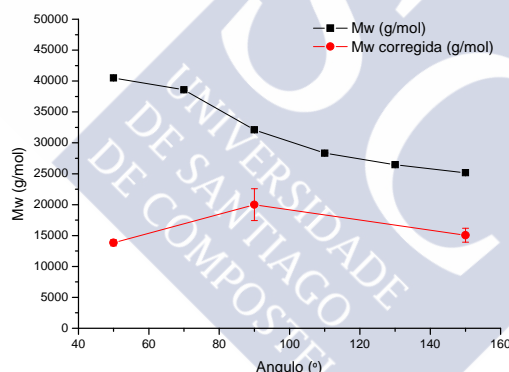


Fig. 3.28 Representación del M_w frente al ángulo de medición, para el $NbCH_2CNa$ con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.2 M de NaCl.

Tabla 3.17 Datos obtenidos SLS, para el $NbCH_2CNa$ con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.3 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 ($cm^3 \text{ mol/g}^2$)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	$M_w(g/mol) (N_{ag})$ -corregido
50	137640±320	1380	$(9.104 \pm 0.039) \cdot 10^{-5}$	243	38 (92)	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^4$ (60±9)
70	105940±310	631	$(1.0219 \pm 0.006) \cdot 10^{-4}$	187		
90	88560±280	440	$(1.098 \pm 0.008) \cdot 10^{-4}$	157	52 (82)	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^4$ (66±4)
110	81400±260	303	$(1.155 \pm 0.009) \cdot 10^{-4}$	144		
130	75920±220	280	$(1.175 \pm 0.009) \cdot 10^{-4}$	134		
150	71500±170	358	$(1.178 \pm 0.007) \cdot 10^{-4}$	126	65 (82)	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^4$ (62±2)

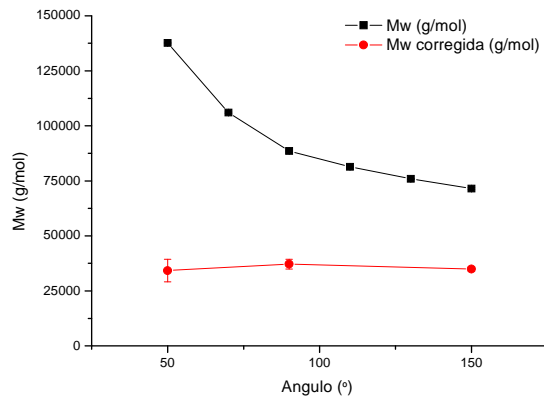


Fig. 3.29 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el NbCH_2CNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.3 M de NaCl.

Al igual que sucedía anteriormente ahora el M_w promedio obtenido es de 3.5×10^4 con un N_{ag} promedio de 63 moléculas.

Se ha realizado el mismo procedimiento aumentando la concentración de NaCl a 400 mM, se obtienen los datos mostrados en la Tabla 3.19 y en la Figura 3.30.

Tabla 3.19 Datos obtenidos SLS, para el NbCH_2CNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.4 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 ($\text{cm}^3 \text{ mol/g}^2$)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	M_w (g/mol) (N_{ag})-corregido
50	89010 ± 190	2150	$(2.582 \pm 0.006) \cdot 10^{-4}$	378	37% (140)	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^4$ (43±6)
70	64700 ± 150	1210	$(2.803 \pm 0.009) \cdot 10^{-4}$	262		
90	50090 ± 130	718	$(3.022 \pm 0.012) \cdot 10^{-4}$	205	52% (107)	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^4$ (39±2)
110	42130 ± 100	612	$(2.912 \pm 0.014) \cdot 10^{-4}$	181		
130	37778 ± 86	607	$(2.881 \pm 0.014) \cdot 10^{-4}$	164		
150	35491 ± 67	779	$(2.952 \pm 0.012) \cdot 10^{-4}$	154	78% (120)	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^4$ (42±3)

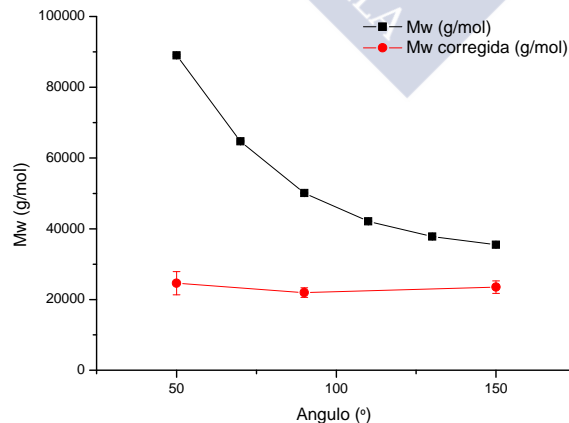


Fig. 3.30 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el NbCH_2CNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 400 mM de NaCl.

Al igual que sucedía anteriormente ahora el Mw promedio obtenido es de 2.3×10^4 con un Nag promedio de 41 moléculas. Debemos de tener en cuenta que a esta concentración de NaCl, empiezan a aparecer fenómenos de desestabilización del sistema como la precipitación.

Si representamos la variación del coeficiente de virial (corregido) en función de la concentración de NaCl medido a 90° , observamos la tendencia que se muestra en la Figura 3.31.

Se determinan los coeficientes de difusión para todas las concentraciones y todas las fuerzas iónicas a 90° y se representa frente a la concentración, obteniéndose la Figura 3.32.

A partir del análisis lineal de los datos mediante la ecuación $\overline{D}_T = \overline{D}_0(1 + k \cdot C + \dots)$, calculamos \overline{D}_0 y k. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 3.20 y en la Figura 3.33.

Se han realizado también medidas de dispersión de la luz estática para muestras del compuesto en agua mili-Q, sin ningún tipo de tampón, ni NaCl, Figura 3.34. De los datos obtenidos en agua vemos que con respecto a la muestra en tampón se produce un desplazamiento de todas las regiones hacia concentraciones más altas, aunque se observan los mismos fenómenos tanto a altas como a bajas concentraciones. El sistema parece ser menos estable con mayores fluctuaciones del sistema.

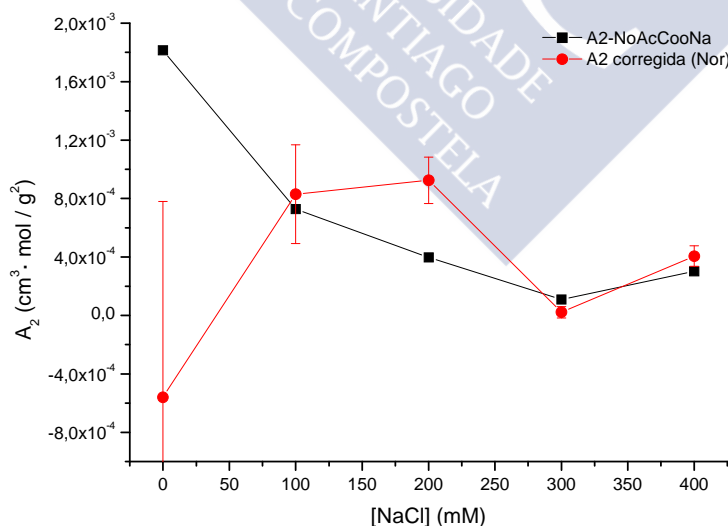


Fig. 3.31 Representación de los coeficientes de virial obtenidos, A_2 , frente a la concentración de NaCl para las muestras de NbCH₂CNa descritas anteriormente.

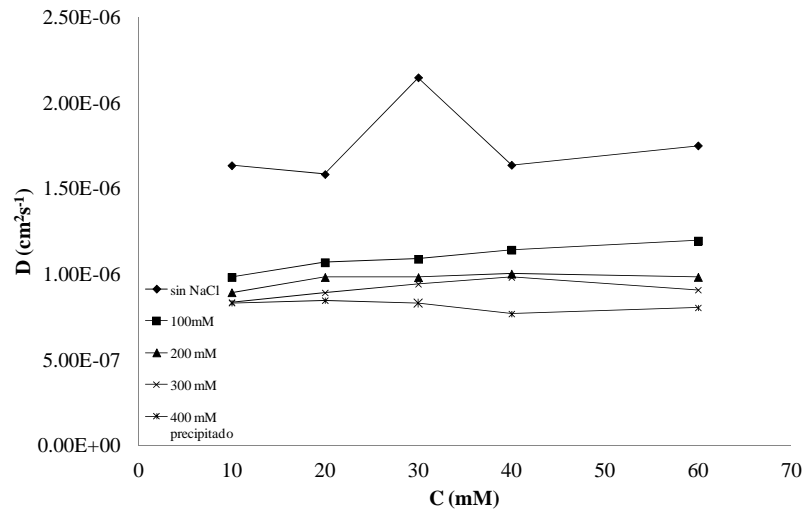


Fig. 3.32 Representación de los coeficientes de difusión calculados frente a la concentración de NbCH_2CNa , en función de la concentración de NaCl .

Tabla 3.20 Coeficientes de Difusión obtenidos del ajuste lineal y constante k , de la pendiente del ajuste, para NbCH_2CNa a las diferentes concentraciones de NaCl .

$[\text{NaCl}]/\text{M}$	\bar{D}_0	k
0	$(1.57 \pm 0.05) \cdot 10^{-6}$	1.66×10^{-3}
0.1	$(0.97 \pm 0.02) \cdot 10^{-6}$	4.19×10^{-3}
0.2	$(0.92 \pm 0.03) \cdot 10^{-6}$	1.57×10^{-3}
0.3	$(0.86 \pm 0.05) \cdot 10^{-6}$	1.82×10^{-3}
0.4	$(0.85 \pm 0.03) \cdot 10^{-6}$	-1.16×10^{-3}

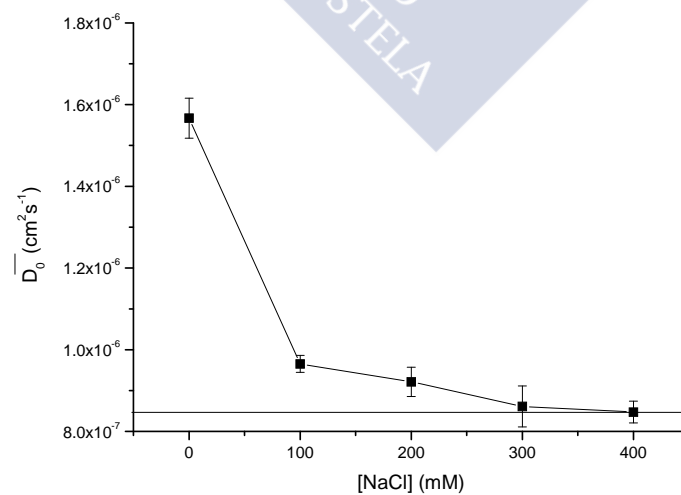


Fig. 3.33 Representación de los coeficientes de difusión calculados frente a la concentración de NaCl para el NbCH_2CNa .

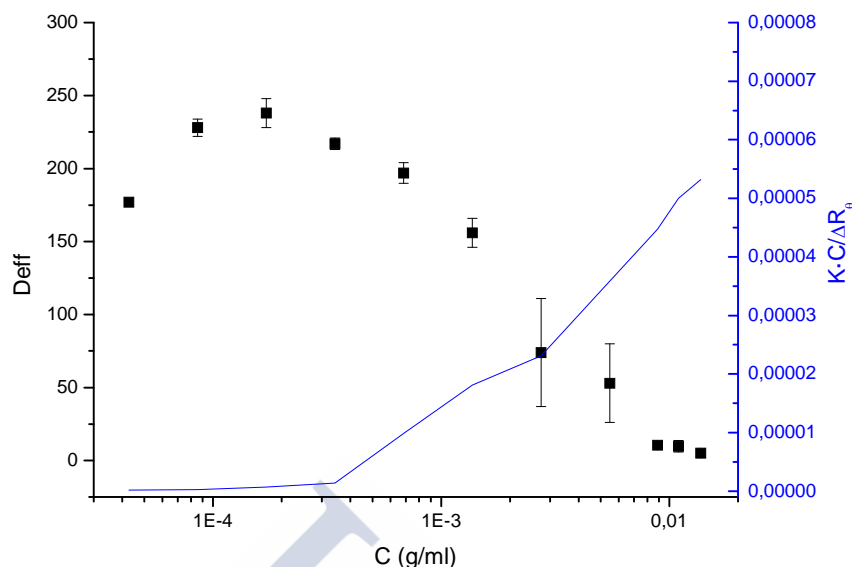


Fig. 3.34 Representación del Diámetro efectivo y relación de Rayleigh 90° en función de la Concentración NbCH₂CNa en Agua.

3.2.2.6 DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS - SMALL-ANGLE X RAY SCATTERING).

Se han realizado medidas de una disolución de concentración 20 mM en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM, mediante la técnica indicada en el título. Los valores de los parámetros obtenidos son los siguientes: radio de giro, $R_g = 1.9 \pm 0.2 \text{ \AA}$, distancia máxima ij en la partícula, D_m , 56 Å y la intensidad a $q=0$, $I(0) = 0.799$.

Cabe destacar que en este caso la intensidad $I(0)$, ($\text{electrones}^2/\text{Å}^3$), tiene una forma un tanto extraña, mostrando dos poblaciones al igual que nos sucedía cuando realizábamos las medidas de dispersión de la luz dinámica y estática. La más pequeña da un número de agregación muy pequeño que se correspondería como máximo con la presencia de unidades diméricas. Los datos experimentales se pueden observar en la Figura 3.35. Debemos de tener en cuenta que de los datos cristalográficos las distancias entre los extremos más alejados de la molécula de NbCH₂CA estirada se situaban cerca de los 20Å, con un ancho aproximado máximo inferior 5Å, por lo que sería posible la existencia de agregados de cinco o seis unidades en la disolución que coexisten con agregados con mayor número de moléculas, según veíamos anteriormente. Los agregados mayores podían estar formados por un número de moléculas que podría ir de las 22 a las 60 según las condiciones del medio, incluso llegando a agregarse varios cientos de moléculas al aumentar la fuerza iónica del medio, antes de originar la desestabilización del sistema, con la consecuente aparición de precipitados en las muestras.

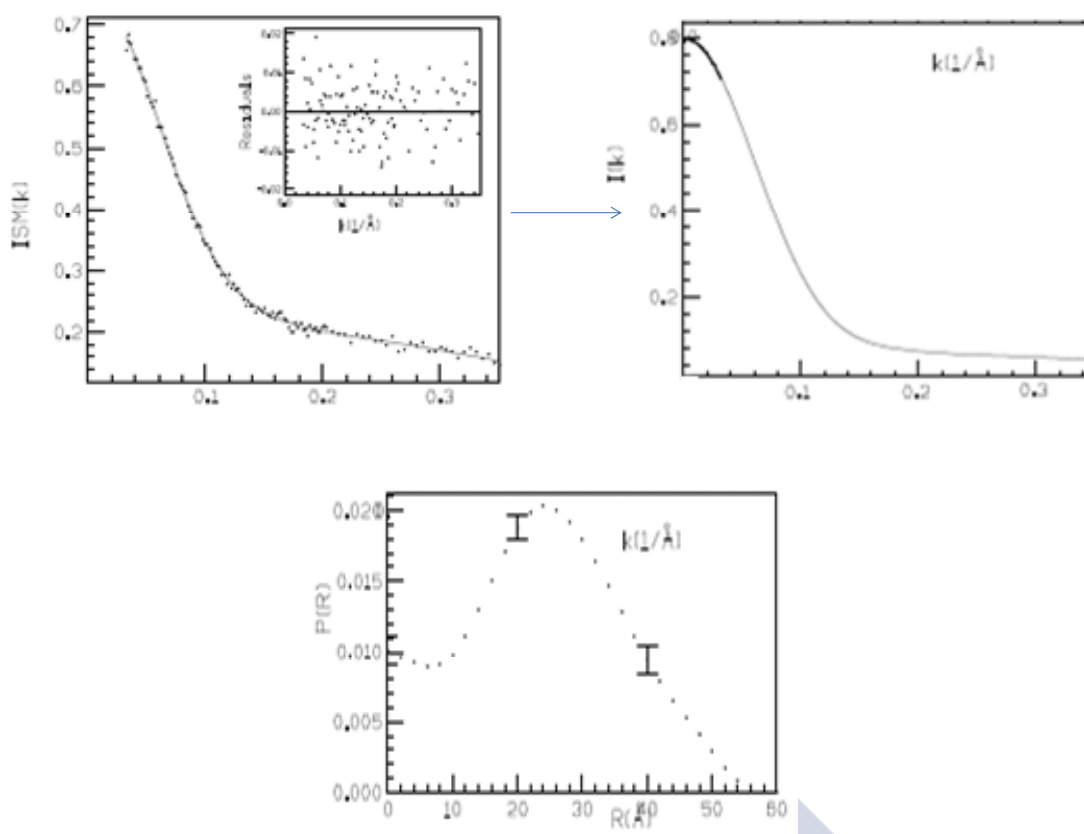


Fig. 3.35 Representación del intensidad de la radiación dispersada el patrón de dispersión y los residuos, y patrón de dispersión calculado $[e^2/\text{Å}^3]$ frente a $Q[\text{Å}^{-1}]$, y representación del Factor de forma frente a la distancia de todos los pares atómico ij en la molécula en Å para una concentración 20 mM de NbCH_2CNa en Tampón C/BC Na 15 mM.

Se han realizado también otras tres medidas, sobre muestras más concentradas (60 mM) de NbCH_2CNa en Tampón C/BC Na 15 mM, pH=10 en 10 mM de NaCl. Las muestras fueron filtradas con diferentes filtros de 450 nm, 200 nm y 30 nm, obteniéndose para las muestras filtradas con 450 nm y 200 nm, dobles distribuciones. Las correspondiente al menor tamaño de partícula presentaban valor del diámetro de iguales 5.4 nm y 4.7 nm, respectivamente. Cuando la muestra era filtrada con el filtro de 30 nm, se obtenía una única distribución con el tamaño de partícula de 5.2 nm.

3.2.2.7 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISION ELECTRÓNICA (TEM).

Se han preparado diferentes disoluciones de NbCH_2CNa con concentración 20 mM, en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM. Obteniéndose los siguiente tamaños experimentales medios $18 \pm 6 \text{nm}$ ($N=127$; Figura 3.36).

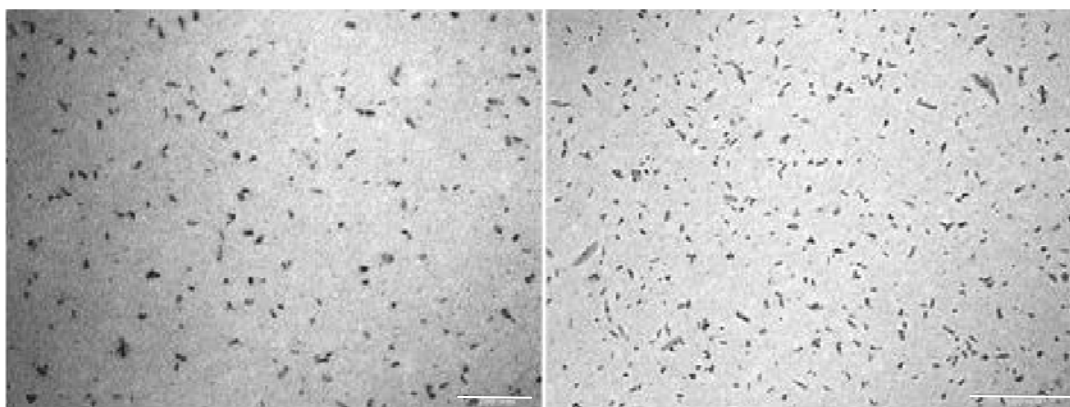


Fig. 3.36 Imágenes TEM tomadas para una concentración 20 mM de NbCH_2CNa en Tampón C/BC Na 15 mM. Escala de 200 y 500 nm.

Para una concentración de partida de 20 mM en agua, se han obtenido las imágenes mostradas en la Figura 3.37. Del análisis de las partículas ($N=105$) se ha obtenido el valor de $16\pm 3\text{nm}$ para el tamaño experimental medio.

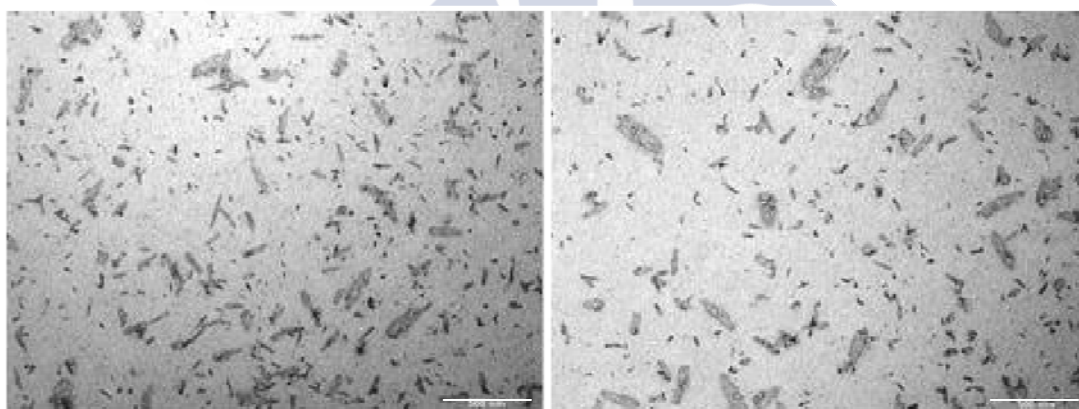


Fig. 3.37 Imágenes TEM tomadas para una concentración 20 mM de NbCH_2CNa en agua mili-Q. Escala de 500 nm.

Análogamente a 0.1 mM, tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM, se han observado agregados cuasi-esféricos bastante polidispersos, con un tamaño medio de $33\pm 11\text{nm}$ ($N=151$; Figura 3.38).

A la misma concentración 0,1 mM pero en agua, se ha observado un fenómeno muy similar al anterior, aunque se aprecia un ligero aumento en el tamaño medio de partícula (diámetro experimental: $41\pm 16\text{nm}$, $N=80$ Figura 3.39).

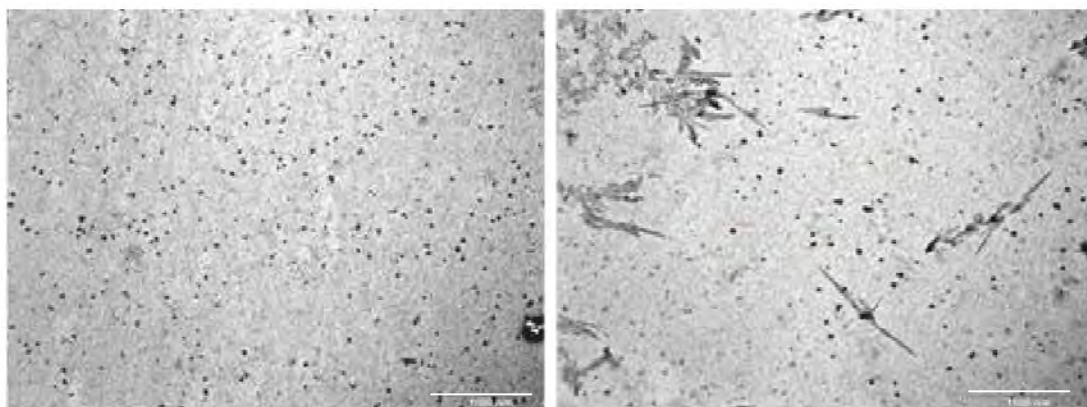


Fig. 3.38 Imágenes TEM tomadas para una concentración 0.1 mM de NbCH₂CNa en tampón C/BC 15 mM. Escala de 1 μm.

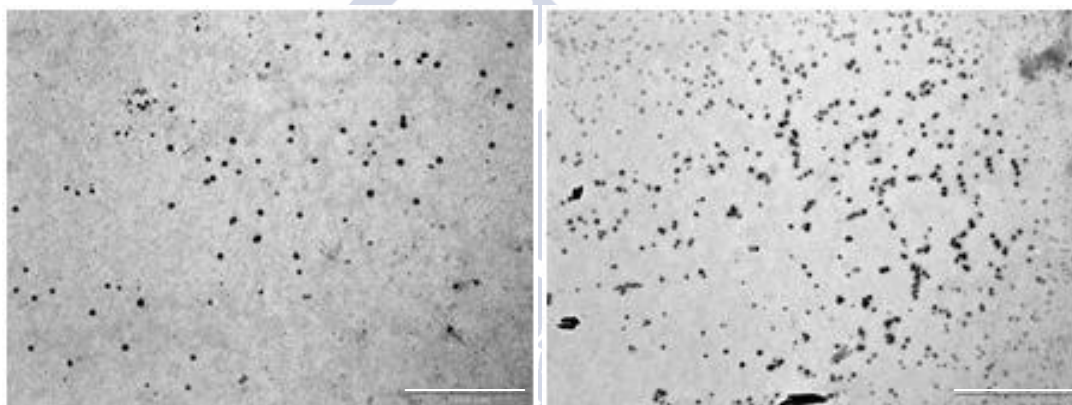


Fig. 3.39 Imágenes TEM tomadas para una concentración 0.1 mM de AdCH₂CNa en agua mili-Q. Escala de 1 μm.

3.2.3. AdSucCA - Ácido [3β, 5β, 7α, 12α]-3[(N-Adamantan-1-il-succinamil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-ico.

3.2.3.1 SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE.

Siguiendo el mismo procedimiento que con los compuestos anteriores, para el AdSucCA se han preparado diferentes muestras para realizar el experimento de gelificación. En la Tabla 3.21, se muestran los resultados de las pruebas realizadas sobre este compuesto en los diferentes disolventes estudiados.

Tabla 3.21 – Las observaciones del estado se han realizado en el momento del calentamiento, justo después de enfriar pasado unos 30 min., a las 24h y a los 7 días del calentamiento. n=no soluble, s=soluble, p=precipitado, (c)=cristalino, g=gel, (t)=gel turbio, (-) poco.

Disolvente	p.e. (°C)	Estado antes calentar	Estado al enfriar	Estado a las 24h	Estado a los 7 días
Benceno	80	S(-)	p(c)	p	p
Tolueno	110.6	S(-)	p(c)	p	p
p-Xileno	138	S(-)	p(c)	p	p
m-xileno	138.5	S(-)	p(c)	p	p
Ciclohexano	81	n	p(c)	p(c)	p(c)
Hexano	68	n	p(c)	p(c)	p(c)
n-Pentano	36	n	p(c)	p(c)	p(c)
2,2,4-Trimetilpentano	99	n	p(c)	p(c)	p(c)
Benzaldehido	179	s	s(c)	s(c)	p(c)
Acetofenona	202	S(-)	s	s	p(c)
Clorobenceno	132	S(-)	s	s	p
Anisol	155	s	s(c)	s	p
1-Pentanol	137	S(-)	s	S(t)	p
1,4-Dioxano	101	s(-)	s	S(t)	p(c)
2-Butanol	98	s(-)	s(t)	S(t)	p(c)
2-Propanol	82	s(-)	s(t)	escamas	p(c)
Cloroformo	62	n	s(t)	s(t)	p
Diclorometano	40	s(-)	s(t)	S(-)/p	p
Tetrahidrofurano	66	s(-)	s(t)	S(-)/p	p(c)
Dimetilsulfóxido	189	s	S(g)	gel	gel

A diferencia de los compuestos anteriores, durante la síntesis del presente compuesto se ha observado que en el momento de la hidrólisis para la obtención del ácido y la sal del compuesto, se produjo la gelificación del sistema en agua, a pH superiores a 7. Al acidificar el medio se produce la precipitación del compuesto ácido, AdSucCA, mientras que su sal sódica en agua tiene un gran poder gelificante. Debido a este comportamiento nos hemos centrado en la capacidad del compuesto sintetizado para la formación de hidrogeles.

Por otra parte observamos que para casi la totalidad de disolventes orgánicos ensayados, el compuesto es prácticamente insoluble, y solamente hemos conseguido obtener organogeles en DMSO.

3.2.3.2 ESTUDIO DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL

Al igual que con los compuestos anteriores se han realizado medidas de tensión superficial. Hemos empleado el AdSucCA en su forma de sal sódica en agua mili-Q ya que el empleo de tampón 15 mM de C/BC nos conduce a la gelificación del sistema.

En la Figura 3.40 se observan dos posibles puntos de inflexión que se han encontrado al analizar la gráfica. Este comportamiento atípico no es el que se observa normalmente para un surfactante convencional. Si a ello le añadimos los comentarios indicados al comienzo del presente capítulo, la prudencia sugiere no extraer conclusiones potencialmente erróneas del análisis de tales datos mediante la isoterma

de Gibbs. Sólo como orientación indicaremos que del primer tramo de la gráfica se extraería un valor de a_0 igual a 214 \AA^2 y del segundo tramo un valor de 430 \AA^2 . Estos valores son distantes del deducido a partir del contorno de la cara hidrófoba del cristal obtenido ya que para el éster de metilo el área por la molécula es de 138 \AA^2 .

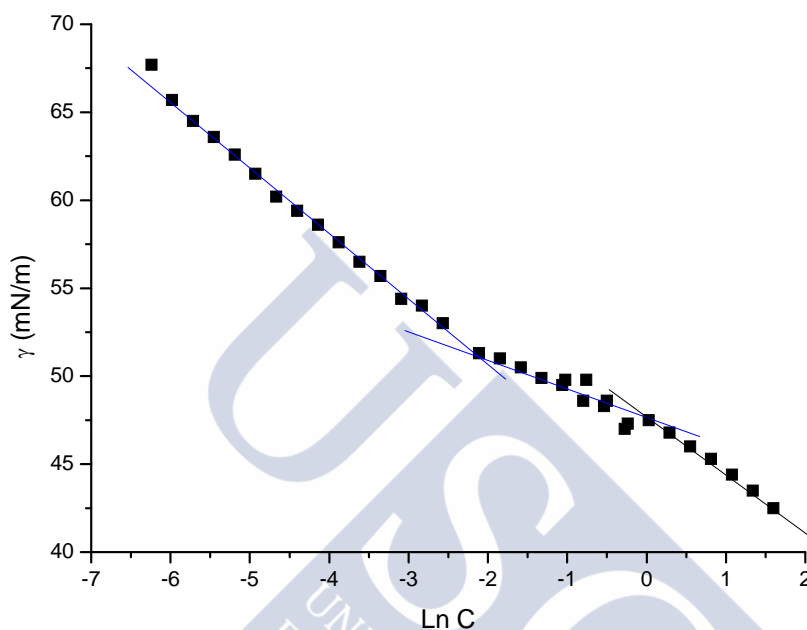


Fig.3.40 - Representación de los datos de tensión superficial representando $\ln(C)$ frente a la Tensión superficial para el AdSucCNa.

Los cambios de pendiente pueden ser debidos a una reestructuración del sistema como consecuencia del efecto de dilución y a la formación de hidrogeles u otros fenómenos de reorganización del sistema (cristalización, precipitación) ya que este producto produce turbidez a bajas concentraciones, por lo que las muestras por encima de 1mM presentaban un aspecto turbio, lo que provoca incertidumbre en la validez de los valores determinados mediante esta técnica.

3.2.3.3 ESTUDIO DE FLUORESCENCIA.

Siguiendo el procedimiento ya descrito, se ha realizado un estudio de la dependencia de la relación I_1/I_3 del pireno con la concentración del surfactante. La Figura 3.41 muestra la representación gráfica obtenida. A partir del punto de inflexión puede estimarse el valor de 1.2 mM para la *cac*, valor próximo del al del punto de inflexión de mayor concentración observado en las medidas de tensión superficial. Sin embargo, por las razones indicadas en el párrafo anterior, este valor de ser tomado con precaución.

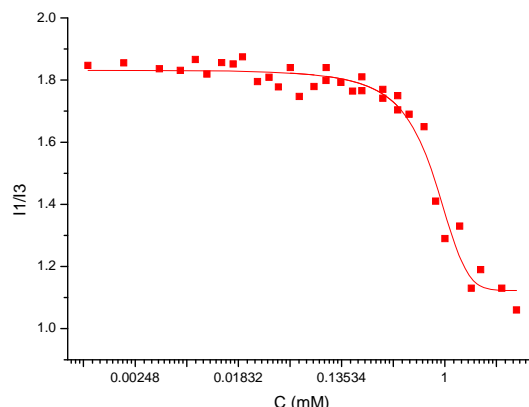


Fig.3.41 - Medidas de fluorescencia con una concentración de pireno 7×10^{-6} M para el AdSucCNa.

3.2.3.4 ESPECTROMETRÍA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).

La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel: un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo (es decir que rota el plano de la luz polarizada), cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio. Esta interacción induce un desfase y un cambio de magnitud en ambos componentes polarizados circularmente, lo que provoca una rotación del plano de polarización en un ángulo alfa. Mediante un espectro de dicroísmo circular representaremos la diferencia de los coeficientes de absorción molar para la luz polarizada en ambas direcciones frente a la longitud de onda. Los ácidos biliares y sus derivados tienen varios centros quirales, por lo que exhiben dicroísmo circular. Es decir, la molécula presentará coeficientes de absorción diferentes para la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda a cualquier longitud de onda, como ya se ha mencionado.

Las bandas observadas en los espectros de absorción y de CD de macromoléculas en disolución corresponden principalmente a las transiciones electrónicas entre los niveles vibracionales más bajos y diversos niveles vibracionales en el primer estado excitado. Una transición electrónica se produce porque el campo eléctrico de la radiación, el magnético o ambos inducen a los electrones a un nuevo estado de energía. El efecto del campo eléctrico es un reordenamiento lineal de los electrones llamado "momento dipolar eléctrico de la transición" y se denota por el vector μ . La dirección de μ es la misma que la del dipolo de polarización, esto es la dirección en la cual los electrones son empujados. El campo magnético induce un reordenamiento circular de la densidad electrónica llamado "momento dipolar magnético de transición, m ". En una molécula sin centros quirales la redistribución neta de electrones se da siempre en

el plano, pudiendo ser lineal ($\mu \neq 0$; $m = 0$) o circular ($\mu = 0$; $m \neq 0$), pero también puede darse que ambos momentos sean diferentes de 0 y en este caso el reordenamiento es en una espiral. En una molécula quiral, el reordenamiento de electrones durante una transición es siempre helicoidal. Si la hélice formada por el movimiento de electrones es hacia la derecha (dextrógira), es más fácilmente inducida por luz polarizada hacia la izquierda, y se observa una señal positiva de CD; mientras que si es hacia la izquierda (levógira), se induce más fácilmente por luz polarizada hacia la derecha, y la señal es negativa. Esto es debido a que el vector del campo eléctrico de la luz interactúa con μ , y simultáneamente el vector del campo magnético de la luz interactúa con m . Para que una transición sea permitida en CD (para que una sustancia absorba en CD) debe inducirse una circulación helicoidal de corriente, es decir, que el producto escalar entre los momentos dipolares sea distinto de cero. Esto es lo que se conoce como las reglas de selección de CD.[#]

Este fenómeno es importante debido a que a menudo compuestos no quirales ocupan cavidades quirales. Así compuestos como los sintetizados en la presente tesis pueden dar origen a cavidades en las que se puedan alojar otro tipo de moléculas como hemos visto y corroborado en los análisis de rayos X, del capítulo anterior. Estos fenómenos son fácilmente observables por este tipo de técnica. Así Gdaniec y Polonski han recogido experimentos en esta dirección para compuestos de inclusión de DCA y CA (ácidos desoxicólico y ácido cólico) con varias moléculas sin centros quirales actuando como huéspedes, existiendo un mecanismo de reconocimiento quiral dinámico en los compuestos de inclusión de DCA y CA³⁰. También este fenómeno es seguido por dicroísmo circular para moléculas no quirales que forman complejos con el ADN, situándose en entornos o alojamientos quirales dando señales en DC, lo que confirma a menudo la interacción entre la molécula no quiral y el ADN, proporcionando información de la posición de la misma en el complejo con ADN³¹. Asimismo, esta técnica es empleada también en el seguimiento de desnaturalización de proteínas como la apomioglobina, ácidos nucleicos y carbohidratos³². Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, son asociados en el caso de las proteínas principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí.

Para observar el comportamiento de nuestro compuesto debido a su tendencia a la formación de hidrogeles a alta concentración, por encima de 5 mM, se ha preparado una disolución 20 mM de AdSucCNa en agua y en tampón C/BC de Na. Los resultados obtenidos mediante DC se muestran en la Figura 3.42.

[#] <http://www.biologia.com.ar/files/seminarios/sem%20dicrosimo%20circular.pdf>

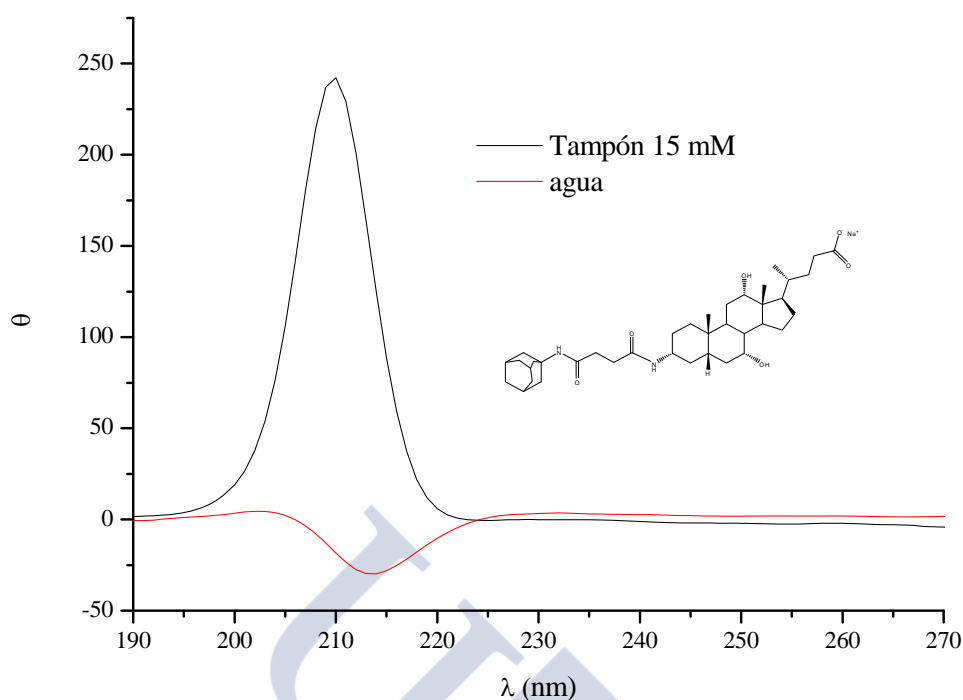


Fig.3.42 - Espectro de Dicroísmo circular para el AdSucCNa para una concentración 20 mM en agua, línea roja, y en tampón C/BC 15 mM línea negra.

Se observa claramente que la señal medida (considerada como la diferencia entre las Abs (A) de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (I) y hacia la derecha (D)) muestra una clara tendencia a desviar la luz hacia la izquierda o valores negativos (levógira). Midiendo en toda la región que va del UV lejano 180-250 nm y parte del UV cercano 250-350 nm, observamos que existe un máximo negativo a 213 nm. La presencia de tampón provoca la formación de un hidrogel con mayor consistencia, produciéndose un reordenamiento molecular interno, dando lugar a un máximo positivo en torno a los 211 nm que se debe en gran medida a un mayor ordenamiento de las moléculas de AdSucCNa en el sistema.

Se ha realizado un ensayo consistente en variar la temperatura de la disolución, con una muestra menos concentrada de AdSucCNa 2 mM, en tampón C/BC de Na 15 mM. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.43.

Si comparamos el espectro obtenido a concentración 2 mM, se observa que el máximo se ha desplazado ligeramente hacia valores más bajos (≈ 206 nm), al igual que la intensidad total de la señal, lo cual es de esperar al bajar la concentración de la muestra. Al aumentar la temperatura de la muestra hasta 55 °C, se observa que existe una pérdida de ordenamiento del sistema debido, en gran medida, a un efecto del aumento de la entropía del sistema y un aumento en la libertad de movimiento de las moléculas en el mismo, consecuente con la pérdida del hidrogel hacia un estado más fluido.

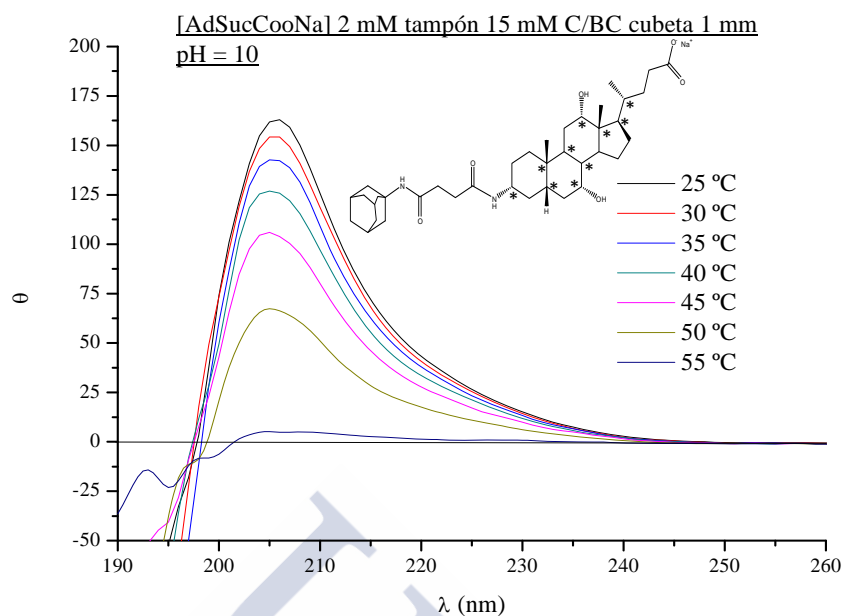


Fig.3.43 - Espectro de Dicroísmo circular para el AdSuccoona para una concentración 2 mM en tampón C/BC 15 mM, variación con la temperatura, los asteriscos muestran los centros quirales de la molécula.

Para seguir conociendo el comportamiento de nuestro sistema hemos realizado pequeñas variaciones del pH, no observándose cambios significativos en el sistema a valores de pH comprendidos en el intervalo 9 -12, como puede verse en la Figura 3.44.

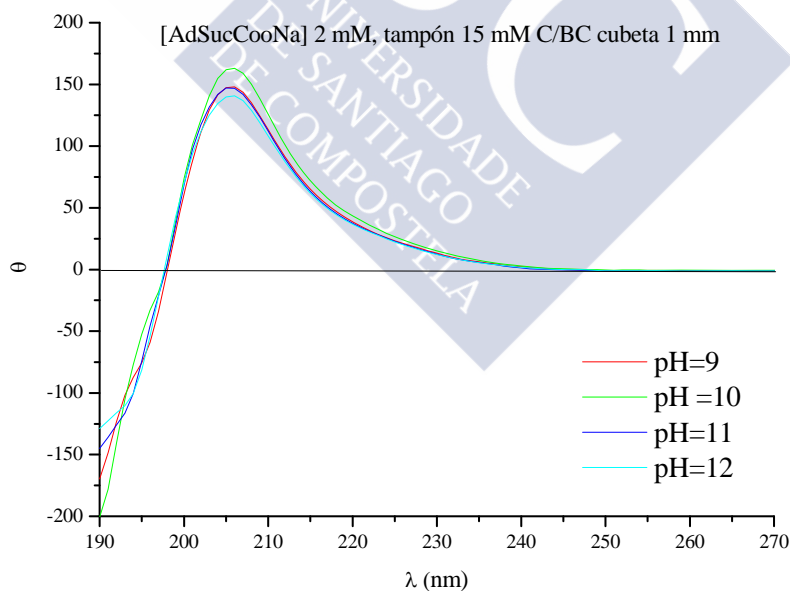


Fig.3.44 - Espectro de Dicroísmo circular para el AdSuccoona para una concentración 2 mM en tampón C/BC 15 mM, variación del pH entre 9-12.

Se han hecho algunos ensayos sobre el efecto del tampón en el sistema, para lo que se prepararon muestras con diferentes concentraciones de tampón C/BC de Na, 1, 2, 5 y 15 mM, mostrando la Figura 3.45 los resultados obtenidos.

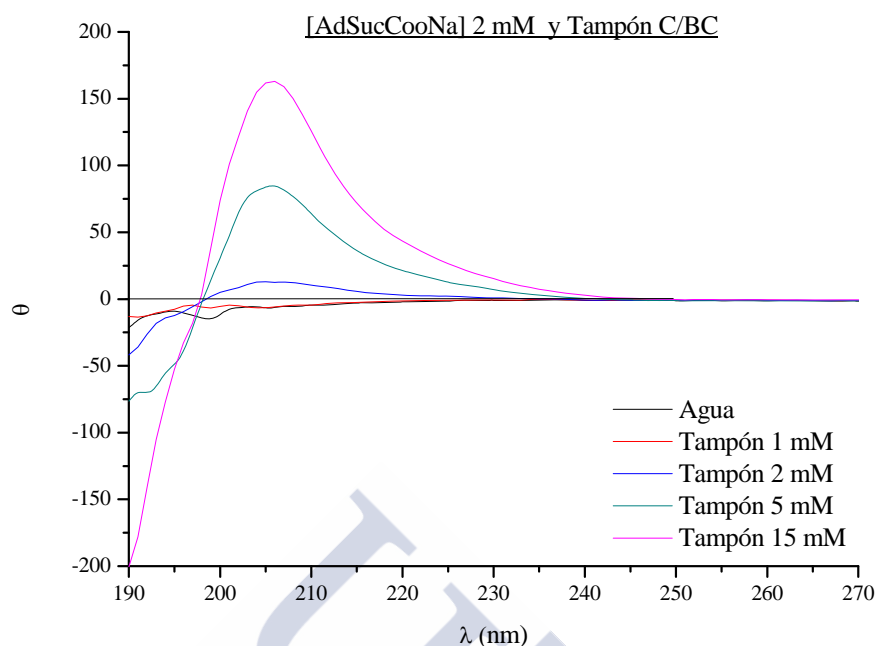


Fig.3.45 - Espectro de Dicroísmo circular para el AdSuccNa para una concentración 2 mM en diferentes concentraciones de tampón C/BC.

Se observa que el efecto del tampón actúa como efecto de relleno en el sistema y en la formación del gel. En la industria el tampón C/BC de Ca, por ejemplo, es empleado como agente de relleno para el control de la viscosidad, la disminución de contracciones y coeficientes de extensión térmica, en gran medida para alcanzar la reducción de los costes de producción.

Observamos que a partir de 2 mM de tampón C/BC de Na, se comienza a alcanzar una mayor ordenación del sistema que va en aumento a medida que aumentamos la concentración de tampón, como se muestra en la Figura 3.45.

Por último hemos tratado de observar el efecto que tenía la adición de NaCl y NaOH en el sistema, en diferentes concentraciones, para observar si seguían las tendencias observadas hasta el momento. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.46. Se observa claramente que el efecto de aumentar la fuerza iónica del medio mediante la adición NaCl en concentraciones de 5 y 15 mM, es muy similar al obtenido con el tampón, aunque, a concentraciones iguales, el ordenamiento alcanzado en el sistema es menor.

Por otro lado se observa que la presencia de NaOH en el medio, en concentraciones de 2, 5 y 10 mM, tiene efecto en cuanto a alcanzar un cierto grado de reordenamiento del sistema, que se estabiliza a las concentraciones de 5 y 10 mM, alcanzando un pH básico, pero sin alcanzar la estructura obtenida en presencia de tampón en el medio.

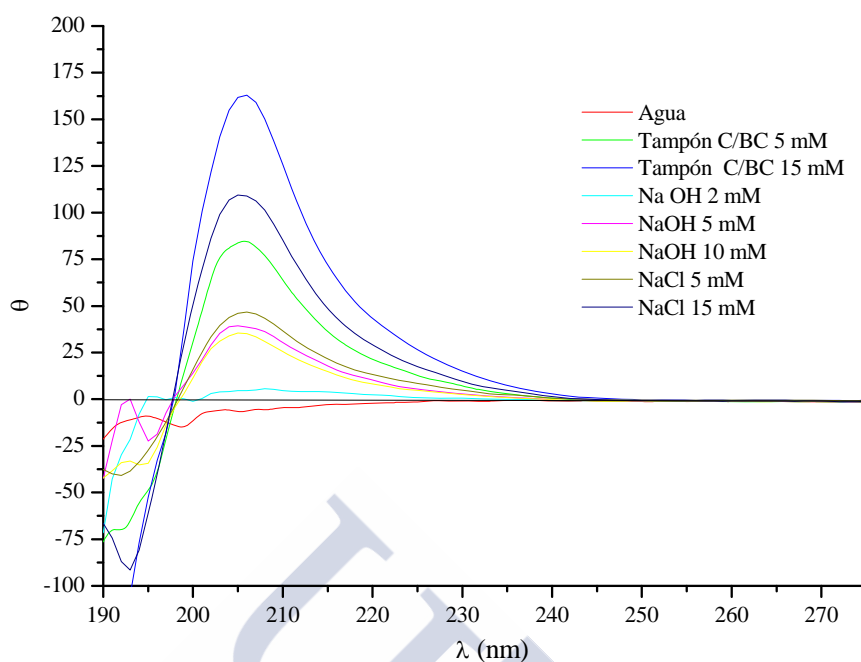


Fig.3.46 - Espectro de Dicroísmo circular para el AdSUCNa para una concentración 2 mM en Agua y diferentes concentraciones de tampón C/BC, NaOH y NaCl.

Debido a su tendencia a la formación de hidrogeles a alta concentración, por encima de 5 mM, se ha preparado una disolución 20 mM de AdSUCNa en agua y en tampón C/BC de Na. Los resultados obtenidos mediante espectroscopia de absorción se muestran en la Figura 3.47.

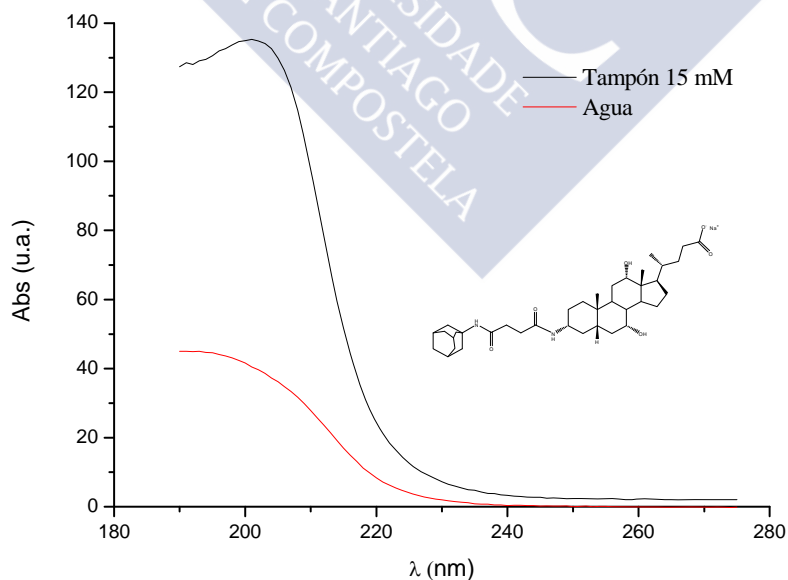


Fig.3.47 - Espectro de Absorción para el AdSUCNa para una concentración 20 mM en agua, línea roja, y en tampón C/BC 15 mM línea negra.

Se observa que para la muestra en tampón se alcanza un máximo de absorción en torno a 205 nm, siendo la absorbancia mucho mayor para la muestra que presenta tampón C/BC de Na en el medio. Para la muestra en Agua el máximo de absorbancia se situaría sobre los 190 nm. Los resultados obtenidos, no tienen mayor significación estructural.

3.2.3.5 ESTUDIO DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Mediante esta técnica se han medido dos muestras 20 mM de AdSUCNa en tampón C/BC de Na. Los resultados pueden observarse en las Figuras 3.48 y 3.49. Los termogramas corresponden al momento de preparación de la muestra y transcurrido un mes, ya que se había observado la formación de un cristal líquido que presenta birrefringencia al ser visualizado mediante láminas polarizadoras.

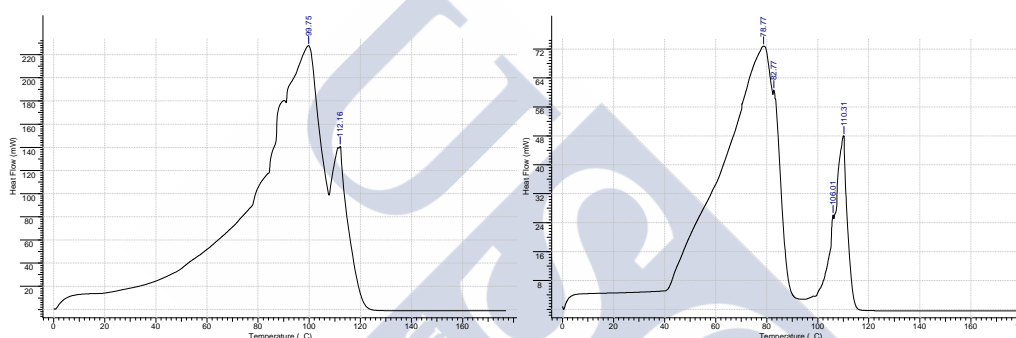


Fig.3.48 - Termograma de Calorimetría diferencial de barrido para el AdSUCNa para una concentración 20 mM en tampón C/BC 15 mM, en el momento de la preparación y pasado un mes.

Se observa que existen dos picos endotérmicos a 112°C y 100°C, correspondientes a la deshidratación del gel. Después de un mes se observan también dos picos endotérmicos de deshidratación que ahora se sitúan a 110°C y 79 °C.

Se ha realizado el mismo experimento con una muestra 20 mM de AdSUCNa en agua mili-Q. Los resultados pueden observarse en la Figura 3.49 en el momento de preparación de la misma y transcurrido un mes, ya que se observa también en este caso la formación de un cristal líquido que presenta birrefringencia a través de láminas polarizadoras.

En este caso existen tres picos endotérmicos a 79°C, 105°C y un nuevo pico a 131 °C que no habíamos presenciado hasta el momento, correspondientes a la deshidratación del gel. Transcurrido un mes se observan simplemente dos picos endotérmicos de deshidratación que ahora se sitúan a 110°C y 80 °C, al igual que sucedía para la muestra anterior. El pico a 80 °C suele corresponder con una fase esméctica y colestérica y el pico sobre 100 °C sería correspondiente al fenómeno de deshidratación de la muestra

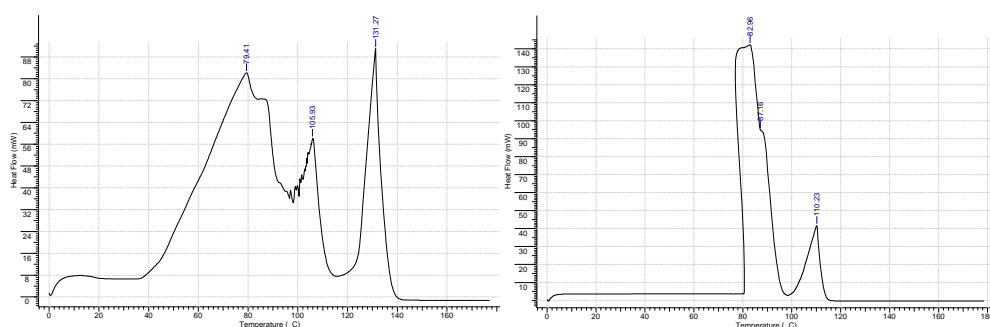


Fig.3.49 - Termograma de Calorimetría diferencial de barrido para el AdSucCNa para una concentración 20 mM en agua, en el momento de la preparación y pasado un mes.

2.3.6 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM).

Las muestras estudiadas mediante difracción circular fueron también analizadas mediante TEM. Para ello, se han preparado las muestras siguiendo el mismo orden que para DC.

Se ha realizado un ensayo, con una muestra de AdSucCNa 2 mM, variando la temperatura a la cual se realizaba el ensayo, con presencia de tampón C/BC de Na 15 mM, a 25°C, 40°C y 60°C. La Figura 3.50 muestra una imagen representativa.

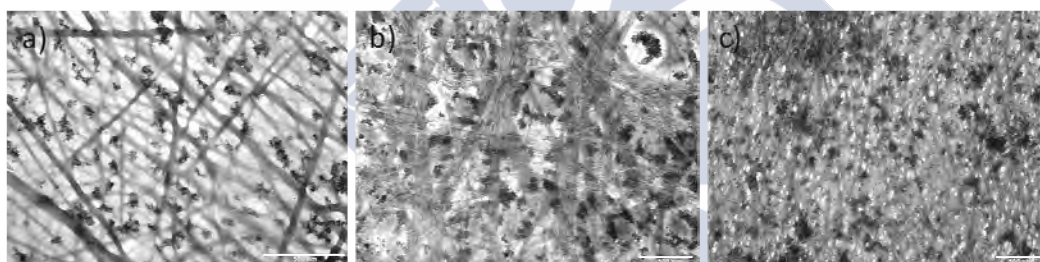


Fig.3.50 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSucCNa 2 mM en tampón C/BC 15 mM, pH=10, variando la temperatura a) 25°C, b) 40°C y 60°C. Escala 500 nm.

Mientras que en la imagen a) existe un hidrogel con una configuración típica, formada por fibras entrecruzadas formadas por moléculas del compuesto con unos anchos de fibra de unos 15 ± 3 nm, a medida que aumentamos la temperatura (imagen b) se observa como la viscosidad del hidrogel va disminuyendo, se va haciendo más fluido, con su consecuente pérdida de espesor en el tamaño de fibra, conllevando la pérdida de consistencia del gel. Por último, la imagen c) corresponde a una temperatura en la cual la estructura del gel se ha perdido casi por completo obteniendo fibras más pequeñas y estrechas y una muestra mucho más fluida que las dos anteriores.

Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente en sus viales herméticamente tapados. Transcurrido 1 mes volvieron a ser visualizadas mediante la misma técnica. Se ha encontrado, que en este caso se producía un fenómeno de cristalización de la muestra, que se puede observar en la Figura 3.51, con su correspondiente cambio de comportamiento.

Sigue existiendo el hidrogel, pero con una menor consistencia, que se traduce que al aumentar la temperatura se produce el cambio de la formación de estructuras fibrilares o tubulares a la aparición de agregados de tipo globular a 60°C. También destacamos la presencia de gran cantidad de estructuras cristalinas.

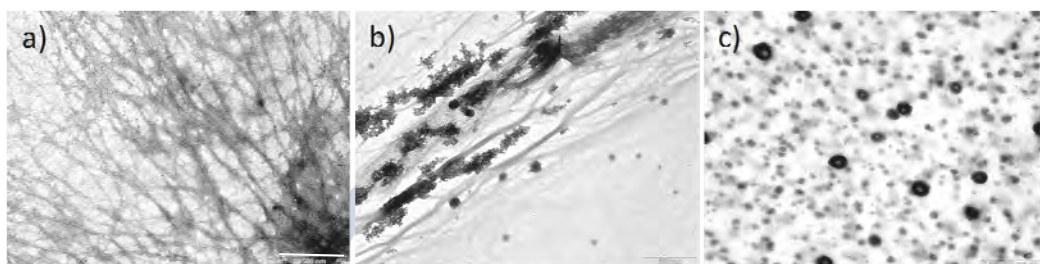


Fig.3.51 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSUCNa 2 mM en tampón C/BC 15 mM, pH=10, variando la temperatura a) 25°C, b) 40°C y 60°C. Escala 500 nm.

Se ha realizado un ensayo, con una muestra de AdSUCNa 2 mM, variando el pH en la zona entre 8-12, con presencia de tampón C/BC de Na 15 mM. La Figura 3.52 muestra una imagen representativa.

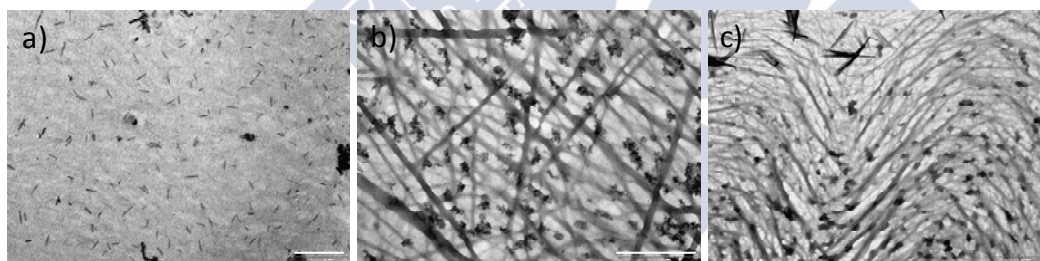


Fig.3.52 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSUCNa 2 mM en tampón C/BC 15 mM, variando el PH con NaOH y HCl a) pH=8, b) pH=10 y c) pH=12. Escala a) y b) de 500 nm, c) 1 μ m.

Al igual que lo detectado mediante la técnica de DC, apenas se observan cambios para las muestras entre pH 9-12, con la estructura de gel típica ya vista, con presencia de agregados esféricos y estructuras cristalinas en el medio del hidrogel. Sin embargo para la muestra de pH=8, parece que esta estructura se ha destruido parcialmente, apareciendo en este caso precipitados y pequeños agregados cuyo tamaño es 15 ± 3 nm de ancho y 200-350 nm de largo. (Estas diferencias pueden ser atribuidas a la elaboración de las muestras para la medición mediante esta técnica).

Pasado 1 mes, las imágenes obtenidas de las muestras se muestran en la Figura 3.53. En ella cabe destacar la aparición de cristales que aparecen para la muestra de pH=8, así como las fibras ya vistas para las muestras de pH=10 y 12.

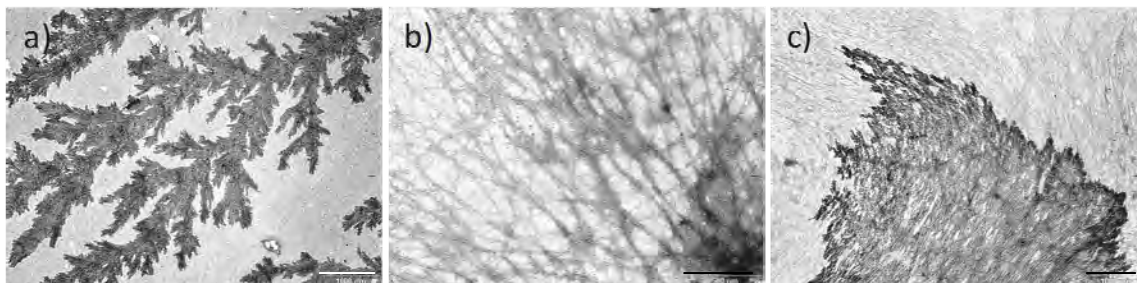


Fig.3.53 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSucCNa 2 mM en tampón C/BC 15 mM, variando el PH con NaOH y HCl a) pH=8, b) pH=10 y pH=12. Escala a) y c) 1 μ m y b) 500nm.

Siguiendo la misma metodología hemos estudiado el efecto del tampón en el sistema, para lo que se prepararon muestras con concentraciones de tampón C/BC de Na, 1, 2, 5 y 15 mM, comparándolas con una muestra en agua mili-Q sin tampón. En la figura 3.54 se muestran imágenes representativas de los comportamientos obtenidos.

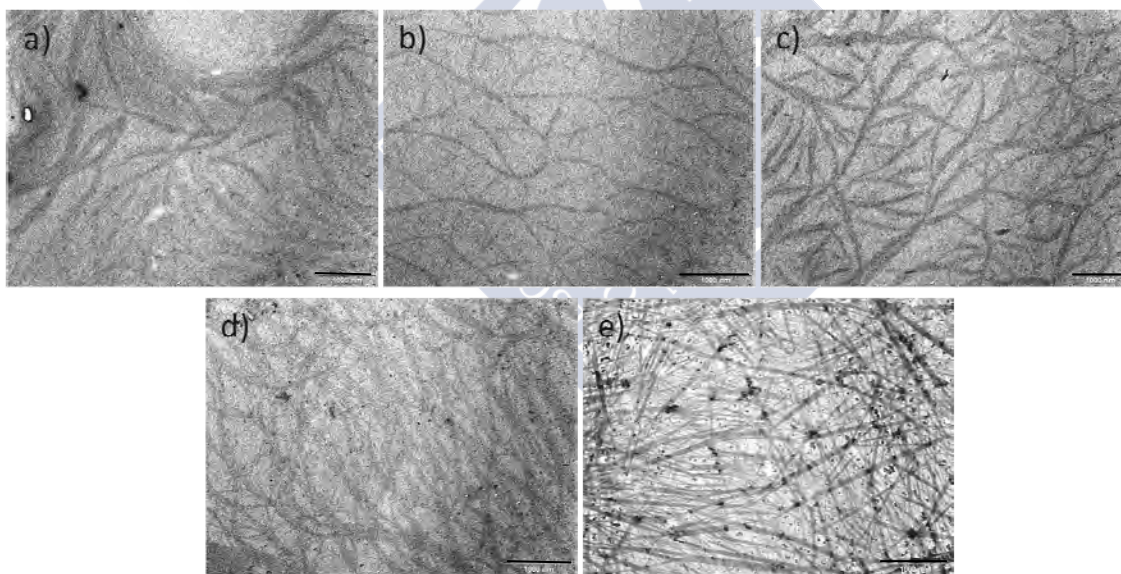


Fig.3.54 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSucCNa 2 mM en a) Agua mili-Q, b) C/BC 1 mM, c) C/BC 2 mM, d) C/BC 5 mM y e) C/BC 15 mM. Escala 1 μ m para todas ellas.

El hidrogel se vuelve más consistente a medida que aumenta el porcentaje de tampón, debido a la existencia de un mayor número de fibras y un mayor ordenamiento estructural interno, hecho consistente con lo observado mediante DC.

La Figura 3.55 corresponde a imágenes obtenidas transcurrido un mes, pudiendo detectarse que se produce una desestabilización del sistema, con la aparición en muchos casos de precipitados cristalinos en forma de agujas o agregados cristalinos.

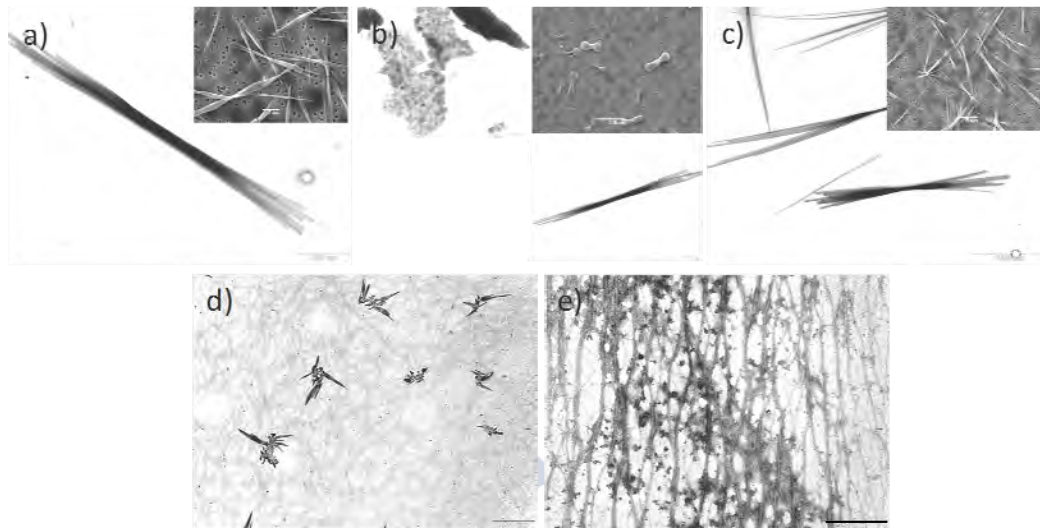


Fig.3.55 - Imágenes de microscopía TEM y SEM para muestras de AdSucCNa 2 mM en a) Agua mili-Q, escala 1 μm , b) C/BC 1 mM, escala 500nm, 10 μm y 5 μm de izquierda a derecha y arriba hacia abajo c) C/BC 2 mM, escala 5 μm , d) C/BC 5 mM, escala 2 μm y e) C/BC 15 mM, escala 500 nm.

Por último se han realizado un par de muestras con NaOH 15 mM y NaCl 15 mM para ver el efecto que tenían tales parámetros sobre las muestras. La Figura 3.56 resume el comportamiento de las muestras en estos casos. En ambas imágenes cabe destacar la presencia de cristales, posiblemente de NaCl y NaOH, presentes en un medio con fibras y agregados de diferentes tamaños.

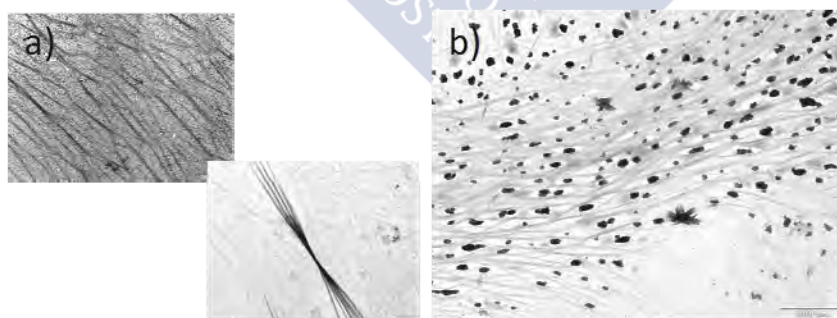


Fig.3.56 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSucCNa 2 mM con a) 15 mM de NaCl, escala 2 μm y b) 15 mM de NaOH, escala 1 μm .

Se ha observado el mismo fenómeno anterior pasado un mes, mostrando un ejemplo en la Figura 3.57.

Al haber observado que a concentraciones altas se formaban cristales líquidos se han tomado imágenes mediante TEM y SEM de las muestras estudiadas mediante DSC en tampón y agua. Las muestras sobre las que se ha realizado el estudio tenían una concentración 20 mM de AdSucCNa en 15 mM tampón C/BC de Na, tiempo cero, en el cual se observaba la formación de un hidrogel. En la Figura 3.58 se ven dos imágenes SEM.

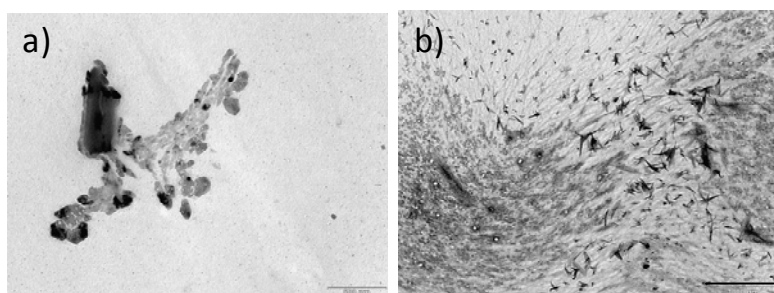


Fig.3.57 - Imágenes de microscopía TEM para muestras de AdSucCNa 2 mM con a) 15 mM de NaCl, escala 0,5 nm y b) 15 mM de NaOH, escala 1 μ m.

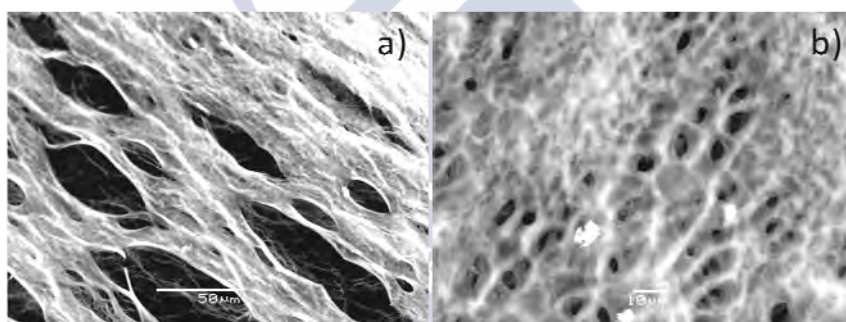


Fig.3.58 - Imágenes de microscopía SEM red tridimensional de hidrogel para muestras de AdSucCNa 20 mM en Tampón C/BC Na 15 mM a) escala 50 μ m y b) escala 10 μ m.

Después de un mes se observa la formación del cristal líquido, del cual también se han obtenido imágenes mediante microscopía TEM y SEM (Figura 3.59).

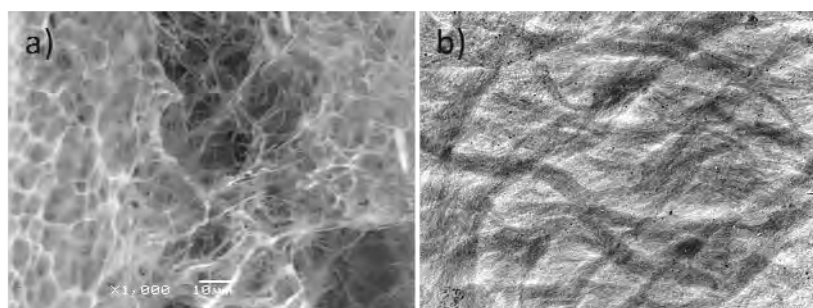


Fig.3.59 - Imágenes de la red tridimensional de Cristal Líquido para AdSucCNa 20 mM en Tampón C/BC Na 15 mM pasado un mes a) escala 10 μ m imagen SEM y b. Escala 2 μ m imagen TEM.

Se ha seguido el mismo el mismo procedimiento para las muestras en agua, para una muestra 20 mM. En el momento de preparación de la muestra, se han obtenidos imágenes SEM (Figura 3.60) que evidencian una estructura tridimensional con fibras de hidrogel. En este caso, son claramente menos compactas que en presencia del tampón, lo que es debido, en gran medida, al efecto de relleno que tiene el C/BC de Na en este tipo de estructuras.

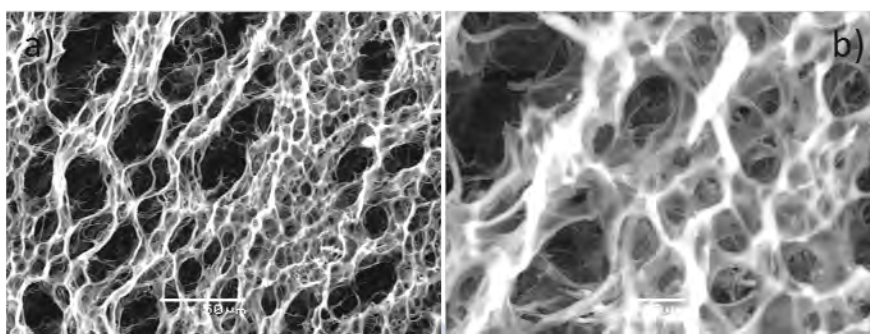


Fig.3.60 - Imágenes SEM de la red tridimensional de Cristal Líquido para AdSucCNa 20 mM en agua $t=0$, a) escala 50 μm y b) escala 10 μm .

La Figura 3.61 muestra las imágenes obtenidas después de un mes de preparación de la muestra.

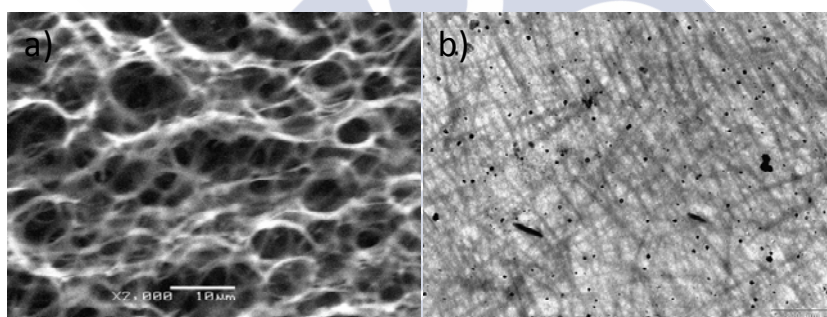


Fig.3.61 - Imágenes de la red tridimensional de Cristal Líquido para AdSucCNa 20 mM en Tampón C/BC Na 15 mM pasado un mes a) escala 10 μm imagen SEM y b) escala 2 μm imagen TEM.

Al igual que sucede anteriormente se observa que existe una red menos densa en cuanto que en agua no existe el efecto de relleno que observamos en presencia tampón.

3.2.4 AdGlutCA - [3 β , 5 α , 7 α , 12 α]-3[(N-Adamantan-1-il-glutaramil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico

3.2.4.1 SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE

Al igual que en los casos anteriores se han preparado diferentes muestras para realizar el experimento de gelificación. En la tabla 3.22, se muestran los resultados de las pruebas realizadas sobre este compuesto en los diferentes disolventes estudiados.

Tabla 3.22 – Las observaciones del estado se han realizado en el momento del calentamiento, justo después de enfriar pasado unos 30 min., a las 24h y a los 7 días del calentamiento. n=no soluble, s=soluble, p=precipitado, (-)=poco, (t)=turbio, (c)=cristalino.

Disolvente	p.e. (°C)	Estado antes calentar	Estado al enfriar	Estado a las 24h	Estado a los 7 días
Benceno	80	n	p(c)	p	p
Tolueno	110.6	n	p(c)	p	p
p-Xileno	138	n	p(c)	p	p
m-xileno	138.5	n	p(c)	p	p
Ciclohexano	81	n	p(c)	p(c)	p(c)
Hexano	68	n	p(c)	p	P
n-Pentano	36	n	p(c)	p(c)	p(c)
2,2,4-Trimetilpentano	99	n	p(c)	p	P
Benzaldehido	179	s	s(c)	s(c)	p(c)
Acetofenona	202	n	s	s	p(c)
Clorobenceno	132	n	s	s	p
Anisol	155	s	s(c)	s	p
1-Pentanol	137	n	s	p	p
1,4-Dioxano	101	s(-)	s(t)	p(c)	p(c)
2-Butanol	98	s(-)	s(t)	p(c)	p(c)
2-Propanol	82	s(-)	s(t)	S(t)	P
Cloroformo	62	n	s(t)	s(t)	p
Diclorometano	40	s(-)	s(t)	S(t)	p
Tetrahidrofurano	66	s(-)	s(t)	S(t)	p
Dimetilsulfóxido	189	s	S(-)	p	p

Para este compuesto no logramos obtener monocristales, capaces de ser resuelto mediante microscopía de rayos-X, pero sí que se ha obtenido polvo cristalino, y agujas que pueden servir como métodos de purificación del compuesto si este tuviese algún interés a nivel industrial, comercial, etc.

Se observa también que a diferencia del AdSucCNa, este compuesto no tiene poder gelificante en agua, aunque la diferencia entre las dos moléculas es simplemente de un -CH₂- adicional en el AdGluCNa. Sin embargo, esta diferencia le proporciona a la molécula un mayor grado de libertad en cuanto a rotación y movimiento de la cadena hidrófoba entorno a los dos enlaces amida, por lo que su solubilidad en disolventes polares se ve incrementada.

3.2.4.2 ESTUDIO DE DENSIDAD

Se ha realizado un estudio de la densidad del AdGluCNa en agua para concentraciones entre 10 y 60 mM, para observar la estabilidad y variación de la misma con la concentración, hemos observado que el compuesto presenta una buena solubilidad en el rango de concentraciones estudiado a temperatura ambiente, 25 °C, con un comportamiento ascendente en el cual la densidad aumenta al aumentar la concentración del compuesto, obteniéndose una tendencia lineal de la siguiente forma $\rho(g/ml) = 0.0008 \cdot C(mg/ml) + 1.0001$, con $r^2=0.999$. La dependencia de la densidad con la concentración es muy similar a las obtenidas para los compuestos anteriormente estudiados.

3.2.4.3 ESTUDIO DE TENSIÓN SUPERFICIAL.

Al igual que con los compuestos anteriores se han realizado medidas de tensión superficial. El AdGluCA fue empleado en su forma de sal sódica en agua mili-Q y en buffer 15 mM de carbonato y bicarbonato sódico, con un pH de 10. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.62.

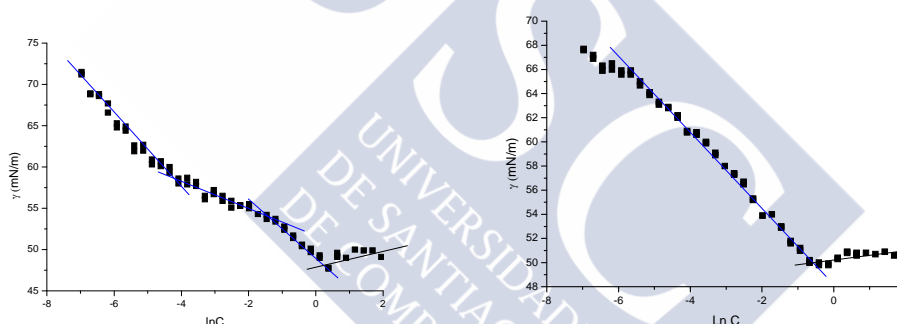


Fig.3.62 - Balanza de tensión superficial en agua y buffer 15 mM, respectivamente, para el AdGluCNa

En la Figura 3.62 se resaltan posibles puntos de inflexión. Se observa que la muestra en medio acuoso presenta una dinámica difícil de interpretar, posiblemente debido a la ausencia de concentración de sales inertes las cuales juegan un papel importante a la hora de la estabilización del sistema.

En presencia de regulador el valor de $cac = 0.51$ mM es ligeramente inferior a los correspondientes a los ácidos biliares naturales y similar a los de otros derivados con grupos hidrófobos en la posición C3.

Tabla 3.23 - Parámetros deducidos de los experimentos de tensión superficial para la agregación y adsorción en la interfase aire-agua para AdGluCNa en Agua y Tampón C/BC de Na 15 mM.

Medio	cac (mM)	$10^6 \Gamma$ ($mol \cdot m^{-2}$)	a_0 (Å^2)
Tampón C/BC 15 mM	0.51	1.26	132

La Tabla 3.23 recoge el valor de $a_0 = 132 \text{ \AA}^2$ obtenido en la disolución con regulador en estas mismas condiciones. Para esta molécula no se han obtenido datos cristalográficos para poder realizar un estudio del área de la sección horizontal, pero por analogía con éstos, el valor de 132 \AA^2 sugiere que es muy probable que la disposición de la molécula en la interfase aire-agua en las condiciones de estudio sea casi completamente paralela a la interfase. Recordemos que para los compuestos anteriores hemos obtenido los valores AdCH₂CNa, 93 \AA^2 , NbCH₂CNa, 107 \AA^2 y AdSucCNa(agua), 214 \AA^2 .

3.2.4.4 ESTUDIO DE FLUORESCENCIA

Mediante la técnica de fluorescencia determinaremos el valor de la *cac* para este sistema, al igual que en los casos anteriores. La Figura 3.63 muestra la representación gráfica de la relación I_1/I_3 obtenida a partir del espectro de fluorescencia del pireno. En este caso, la caída de la intensidad es más suave que para los compuestos anteriores lo que sugiere la existencia de un intervalo de concentraciones más amplio a las que aparecen los agregados. El valor de la *cac* obtenido, corresponde al punto de inflexión de la curva, es 2.2 mM , relativamente alejado del valor determinado por tensión superficial.

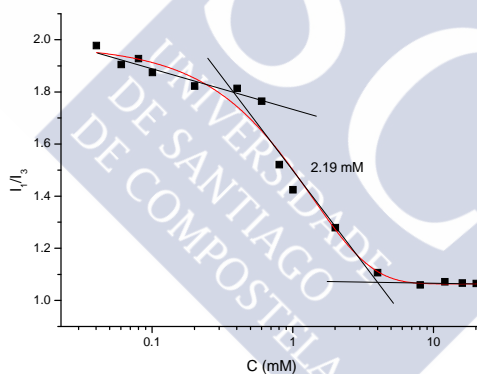


Fig.3.63 - Medidas de fluorescencia con una concentración de pireno $7 \times 10^{-6} \text{ M}$ para el AdGluCNa en tampón C/BC 15 mM .

La relación I_1/I_3 toma valores próximos a 2 cuando la concentración es baja (véanse la Tabla 3.3 y la Figura 3.63), por lo que en estas condiciones sólo existen monómeros de surfactante en la disolución o los agregados no son lo suficientemente grandes para incorporar moléculas de pireno en su interior. Por lo tanto, el pireno se encuentra en el medio acuoso polar.

Por otra parte, a concentraciones más elevadas, por encima de la *cac*, cuando la interfase está claramente saturada y existen agregados en el seno de la disolución, la relación I_1/I_3 toma valores que están próximos a 1.1, valor relativamente más alto que los obtenidos para el colato sódico 0.75.²⁸, y para el *AdCH₂CNa*, 0.9. En definitiva, los derivados *NbCH₂CNa* y *AdGluCNa* generan entornos muy similares para albergar el pireno en su seno con relaciones I_1/I_3 que situaríamos entre el n-butanol y el metanol, que es un medio menos hidrófobo que el que forman los agregados del colato de sodio y de *AdCH₂CNa*.

3.2.4.5 ESTUDIO DE DISPERSIÓN DE LA LUZ.

Al igual que con los compuestos estudiados anteriormente hemos empleado las técnicas estáticas y dinámicas de dispersión de luz láser, para obtener una serie de información que nos será útil a la hora de estudiar el comportamiento del *AdGluCNa* en disolución.

3.2.4.5.a - Medidas de dispersión de luz dinámica, (Dynamic Light Scattering, DLS).

Se han preparado diferentes disoluciones de *AdGluCNa* con concentraciones comprendidas entre 10 mM y 60 mM, en presencia de tampón carbonato/bicarbonato (C/BC) sódico 15 mM y con diferentes concentraciones de NaCl (0.12, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M). Un análisis de los datos mediante el método de cumulantes sugiere la existencia de una distribución de partículas cuyo diámetro efectivo tiene un valor promedio de 52-82 nm y que varía ligeramente al aumentar la concentración del compuesto, estabilizándose a las concentraciones más altas.

El método de CONTIN muestra una distribución polidispersa con tamaños de partícula entre 2-3 nm y 153-235 nm. También vemos una ligera tendencia a estabilizar los agregados o partículas de mayor tamaño al aumentar la fuerza iónica del medio, estos fenómenos ya habían sido descritos para los compuestos anteriores.

En la Tabla 3.24, vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de *AdGluCNa* en disolución acuosa, medidas a diferentes ángulos.

Tabla 3.24 Datos obtenidos DLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	152	0.125	3.2 (23%)	164	2.5
90°	82	0.195	2.7 (41%)	154	1.2
150°	37	0.311	2.9 (56%)	134	1.2
C=20mM, 50°	99.7	0.327	2.4 (23%)	247	1.7
90°	58.6	0.296	2.9 (53%)	235	1.2
150°	35.6	0.268	2.4 (64%)	105	1.6
C=30mM, 50°	53.3	0.388	2.5 (50%)	162	1.8
90°	44.4	0.257	2.8 (40%)	186	1.5
150°	38.3	0.197	2.8 (51%)	105	1.6
C=40mM, 50°	118	0.231	2.9 (29%)	240	1.6
90°	52.8	0.326	2.5 (51%)	207	1.2
150°	47.4	0.204	2.9 (55%)	135	1.6
C=60mM, 50°	154	0.061	2.3 (33%)	240	1.5
90°	67.6	0.086	2.2 (52%)	153	1.2
150°	26.7	0.262	2.3 (59%)	122	1.2

La Tabla 3.25 resume los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de AdGluCNa en disolución acuosa con una concentración 0.12 M de NaCl, medidas también a diferentes ángulos.

Tabla 3.25 Datos obtenidos DLS, para el NbCH₂CNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 0.12 M de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	128	0.111	5.8 (35%)	236	3.8
90°	50.7	0.250	5.6 (48%)	216	2.8
150°	23.7	0.238	4.8 (70%)	144	2.6
C=20mM, 50°	90.4	0.155	5.4 (46%)	252	3.7
90°	28.1	0.244	5.2 (62%)	182	3.7
150°	20.6	0.184	4.7		4.5
C=30mM, 50°	333.6	0.112	5.2 (38%)	196	2.8
90°	39.3	0.281	5.2 (51%)	186	2.6
150°	21.6	0.131	2.8		2.7
C=40mM, 50°	56.9	0.280	3.3 (28%)	299	2.7
90°	26.7	0.211	4.8 (70%)	183	3.4
150°	12.9	0.160	3.8		3.7
C=60mM, 50°	358	0.116	4.3		3.5
90°	18.4	0.163	4.4 (69%)	213	3.3
150°	6.1	0.150	4.3 (91%)	123	2.7

Como tendencia general podemos observar que la presencia de fuerza iónica en el medio produce un aumento del tamaño de partícula estabilizada, que se mantiene prácticamente constante a las concentraciones de estudio. Esto se observa claramente en los tamaños de la distribución más pequeña obtenida mediante el método CONTIN.

La Tabla 3.26 resume los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de AdGluCNa en disolución acuosa con una concentración 0.2 M de NaCl,

medidas también a diferentes ángulos. Se observa un muy pequeño aumento en el tamaño del agregado estabilizado, aumento que es mucho menor que el observado en el caso anterior.

Tabla 3.26 Datos obtenidos DLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 0.2 M de NaCl, Poly, polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	67.8	0.444	5.4 (41%)	247	4.1
90°	44	0.262	6.6 (43%)	228	3.1
150°	26.6	0.208	5.6 (61%)	157	3
C=20mM, 50°	99.7	0.209	5.6 (39%)	288	4.3
90°	40.4	0.223	5.8 (49%)	224	4.1
150°	24.2	0.171	5.9 (72%)	180	3.7
C=30mM, 50°	163.2	0.161	5.4 (29%)	247	4.3
90°	65.2	0.268	5.6 (45%)	232	3.5
150°	40.3	0.240	5.6 (65%)	187	3.8
C=40mM, 50°	97.9	0.120	5.6 (52%)	292	4
90°	30.3	0.175	5.6 (73%)	213	2.8
150°	10	0.135	4.9 (88%)	98	2.6
C=60mM, 50°	198.3	0.072	2.9		2.8
90°	14.7	0.187	5 (77%)	191	3.5
150°	8.4	0.112	4.6 (92%)	82	2.7

Un aumento de la fuerza iónica del medio hasta 0.3 M de NaCl no conlleva un aumento del tamaño. La Tabla 3.27 resume los datos obtenidos.

Tabla 3.27 Datos obtenidos DLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 0.3 M de NaCl, Poly, polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	157	0.080	6.4 (29%)	243	4.4
90°	57.7	0.204	6.3 (50%)	184	3.3
150°	30.9	0.207	6.3 (61%)	171	4.2
C=20mM, 50°	73.5	0.362	6 (37%)	296	5.1
90°	33.7	0.246	6.3 (59%)	206	4.5
150°	29.6	0.159	3.2		3.1
C=30mM, 50°	172.6	0.094	6 (32%)	306	5
90°	53.1	0.224	6.3 (42%)	267	4
150°	54.8	0.131	6.4 (72%)	179	4.9
C=40mM, 50°	76.3	0.113	5.9 (64%)	247	4.2
90°	24.2	0.180	5.6 (82%)	280	3
150°	9.5	0.125	5.8 (86%)	191	3.1
C=60mM, 50°	37.9	0.168	3.3		3.1
90°	15.7	0.168	4.9 (87%)	193	2.9
150°	8.1	0.120	5.9 (92%)	125	4.8

Se muestran en la Tabla 3.28 vemos un resumen de los datos obtenidos para las diferentes concentraciones de estudio de AdGluCNa en disolución acuosa con una concentración 400 mM de NaCl, medidas también a diferentes ángulos, observando la

estabilización en el tamaño del agregado, en donde las variaciones en promedio del tamaño son muy pequeñas.

Tabla 3.28 Datos obtenidos DLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 400mM de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	103	0.360	7 (29%)	309	4.9
90°	44.1	0.303	6.7 (47%)	185	4.5
150°	34.9	0.182	6.5 (75%)	135	4
C=20mM, 50°	190.7	0.041	7.4		6.8
90°	33.9	0.209	7.2 (63%)	244	4.5
150°	21.5	0.158	6.6 (84%)	104	5.4
C=30mM, 50°	114.5	0.164	8.3 (22%)	278	7.5
90°	47.4	0.114	7.5 (57%)	195	5.8
150°	19.6	0.185	5.3		5
C=40mM, 50°	85.4	0.064	6.6 (76%)	318	4.6
90°	24.6/24.1	0.168/0.159	8.6/3.8 (64%)	164	7.8/3.7
150°	9.9	0.129	6.6 (91%)	179	5
C=60mM, 50°	36.7	0.276	6 (70%)	224	4.9
90°	25.8	0.171	5.5 (77%)	173	3.1
150°	9.4	0.121	6.5 (86%)	192	4.5

La Tabla 3.29 resume los datos obtenidos en presencia de 0.5 M de NaCl. De tales valores se deduce que, en el intervalo 0.3–0.5 M de NaCl, el tamaño promedio de las partículas se mantiene aproximadamente constante.

Tabla 3.29 Datos obtenidos DLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 60 mM medido a diferentes ángulos 50°, 90° y 150°, en disolución acuosa con 500mM de NaCl, Poly , polidispersidad, V e I, volumen e intensidad medidos en función de los coeficientes de difusión D.

Concentración y Ángulo de medición	Cumulantes		CONTIN (I&D)		CONTIN (V&D)
	d _{eff} (nm)	Poly	d (nm)	d (nm)	d (nm)
C=10mM, 50°	188.2	0.056	10 (20%)	217	10.2
90°	52.3	0.300	7 (36%)	174	4.7
150°	41.9	0.139	6.9 (73%)	107	5
C=20mM, 50°	123.9	0.112	6.9 (36%)	254	5.3
90°	32.3	0.267	6.7 (57%)	173	4.9
150°	18	0.198	7.2 (75%)	146	4.7
C=30mM, 50°	168.3	0.080	10.2 (33%)	321	9.2
90°	32.8	0.197	6.6 (66%)	207	3.9
150°	15.6	0.178	7.3 (80%)	195	5.3
C=40mM, 50°	56.4	0.167	8.7 (41%)	259	7.5
90°	23.2	0.182	4.6		4.5
150°	9.2	0.130	6.5 (93%)	91	5
C=60mM, 50°	230.1	0.074	4.9		4.8
90°	29.7	0.136	6.6 (79%)	153	5
150°	11.2	0.116	8.7 (85%)	165	7.2

3.2.4.5.b Medidas de dispersión de luz estáticas a 90°, (Static Light Scattering, SLS).

Antes de las medidas de dispersión de la luz se realiza una medida de la variación del índice de refracción con la concentración de la muestra de estudio para determinar el valor (dn/dc). En el caso del AdGluCA, en su forma de sal sódica, en presencia de una concentración de 15mM Carbonato/Bicarbonato Sódico, se obtiene el valor de (dn/dc) = 0.1481±0.0075 mL/g.

Para la concentración de 60 mM se han realizado varios ensayos de SLS a diferentes ángulos para tratar de determinar M_w y los números de agregación mediante la realización de una representación de Debye. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3.30 y la Figura 3.64.

Tabla 3.30 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM, siendo χ^2 chi-cuadrada reducida.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 (cm ³ mol/g ²)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	M_w (g/mol) (N_{ag})-corregido
50	37360±300	689	(2.539±0.052)·10 ⁻⁴	55	32 (18)	(3±0.6)×10 ⁴ (47±9)
70	33530±300	392	(1.139±0.007)·10 ⁻³	50		
90	30030±290	226	(1.334±0.008)·10 ⁻³	44	46 (20)	(1.9±0.2)×10 ⁴ (28±3)
110	27020±240	194	(1.438±0.008)·10 ⁻³	40		
130	22950±180	182	(1.455±0.009)·10 ⁻³	34		
150	21690±140	192	(1.527±0.007)·10 ⁻³	32	57 (18)	(1.2±0.1)×10 ⁴ (17±1)

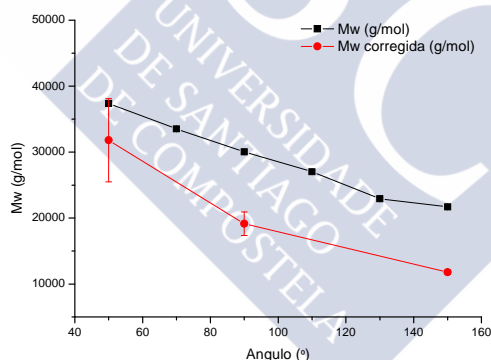


Fig. 3.64 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM .

Si nos centramos en la población de partículas pequeñas próximas al 50% obtenemos un M_w promedio de 1.5×10^4 con un N_{ag} promedio de 23 moléculas.

Se ha realizado el mismo procedimiento para las muestras con diferentes concentraciones de NaCl, o de fuerza iónica. Para el caso de 0.12 M de NaCl, se obtienen los datos mostrados en la Tabla 3.31 y en la Figura 3.65. Los valores resultantes son: $M_w = 3.3 \times 10^4$ y $N_{ag} = 49$ moléculas.

Tabla 3.31 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.12 M de NaCl.

Ángulo (°)	M _w (g/mol)	χ ²	A ₂ (cm ³ mol/g ²)	N _{ag}	% pequeña(N _{ag})	M _w (g/mol) (N _{ag})-corregido
50	122650±950	3630	(1.227±0.010) ·10 ⁻⁴	181	49 (89)	(1.8±0.5)×10 ⁴ (28±8)
70	92710±660	2020	(4.638±0.019) ·10 ⁻⁴	137		
90	76530±530	1660	(5.168±0.022) ·10 ⁻⁴	113	60 (68)	(2.8±0.3)×10 ⁴ (41±4)
110	64700±400	1230	(5.128±0.023) ·10 ⁻⁴	96		
130	58680±310	1290	(5.213±0.022) ·10 ⁻⁴	87		
150	54870±230	1800	(5.281±0.018) ·10 ⁻⁴	81	92 (75)	(3.9±0.7)×10 ⁴ (58±10)

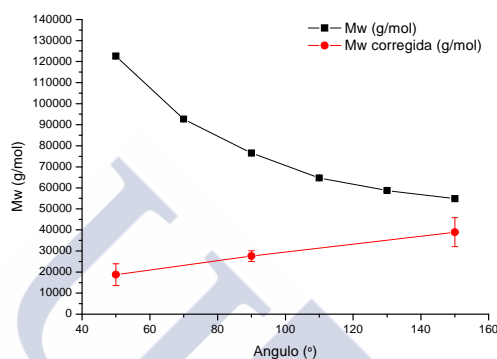


Fig. 3.65 Representación del Mw frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 120 mM de NaCl.

Se ha realizado el mismo procedimiento aumentando la concentración de NaCl a 0.2 M. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.32 y en la Figura 3.66. Los valores resultantes son: M_w(promedio)= 3.0×10⁴ y un N_{ag} (promedio)= 44 moléculas.

Tabla 3.32 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 200 mM de NaCl.

Ángulo (°)	M _w (g/mol)	χ ²	A ₂ (cm ³ mol/g ²)	N _{ag}	% pequeña(N _{ag})	M _w (g/mol) (N _{ag})-corregido
50	311300±3100	19300	(2.448±0.008) ·10 ⁻⁴	181	52 (94)	(3.0±0.2)×10 ⁴ (44±3)
70	200600±1900	9260	(3.223±0.012) ·10 ⁻⁴	137		
90	132500±950	6030	(3.558±0.014) ·10 ⁻⁴	113	57 (64)	(2.8±0.2)×10 ⁴ (41±3)
110	103290±650	4270	(3.814±0.015) ·10 ⁻⁴	96		
130	94850±530	4770	(3.930±0.014) ·10 ⁻⁴	87		
150	84800±360	5750	(4.020±0.012) ·10 ⁻⁴	81	76 (62)	(3.2±0.3)×10 ⁴ (47±4)

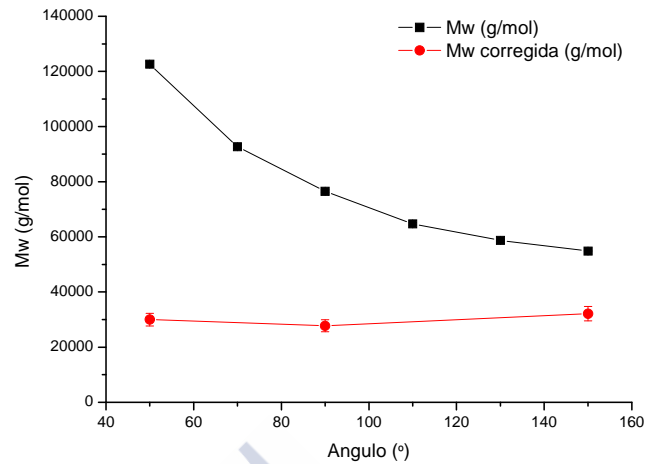


Fig. 3.66 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.2 M de NaCl.

Análogamente, la Tabla 3.33 y la Figura 3.67 recogen los datos obtenidos en presencia de NaCl a 0.3 M. Los valores promedio obtenidos son: $M_w = 3.7 \times 10^4$ y $N_{ag} = 54$ moléculas.

Tabla 3.33 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.3 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 (cm ³ mol/g ²)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	M_w (g/mol) (N_{ag})-corregido
50	265700±1500	15400	(2.215±0.006) · 10 ⁻⁴	393	52 (204)	(3.1±0.1)×10 ⁴ (45±2)
70	175040±960	5890	(2.798±0.008) · 10 ⁻⁴	259		
90	126440±620	3370	(3.023±0.010) · 10 ⁻⁴	187	64 (120)	(3.7±0.2)×10 ⁴ (54±3)
110	104870±480	2600	(3.120±0.010) · 10 ⁻⁴	155		
130	91590±360	2730	(3.073±0.010) · 10 ⁻⁴	135		
150	82630±250	3130	(3.048±0.009) · 10 ⁻⁴	122	82 (100)	(4.4±0.5)×10 ⁴ (64±8)

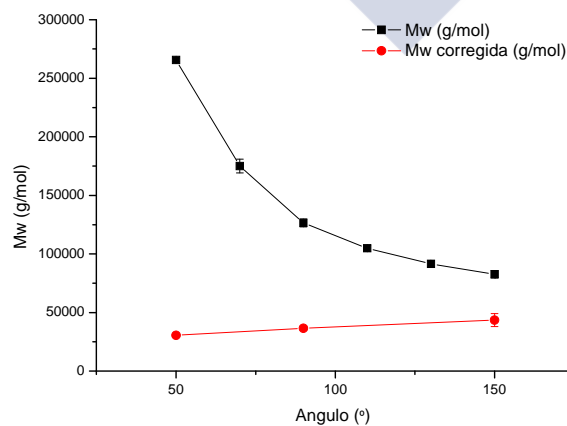


Fig. 3.67 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.3 M de NaCl.

La Tabla 3.34 y la Figura 3.68 recogen los datos correspondientes a NaCl 0.4 M. Ahora los valores promedio son: $M_w = 4.9 \times 10^4$ y $N_{ag} = 73$ moléculas.

Tabla 3.34 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.4 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 (cm ³ mol/g ²)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	M_w (g/mol) (N_{ag})-corregido
50	213580±770	8620	(1.895±0.004) ·10 ⁻⁴	316	59 (186)	(4±1)×10 (62±15)
70	148130±560	2980	(2.343±0.006) ·10 ⁻⁴	219		
90	115860±460	1620	(2.617±0.008) ·10 ⁻⁴	171	62 (106)	(4.2±0.4)×10 ⁴ (63±6)
110	102130±390	1280	(2.715±0.009) ·10 ⁻⁴	151		
130	92950±320	1480	(2.758±0.009) ·10 ⁻⁴	137		
150	87330±240	1720	(2.787±0.007) ·10 ⁻⁴	129	87 (110)	(6.4±0.9)×10 ⁴ (95±13)

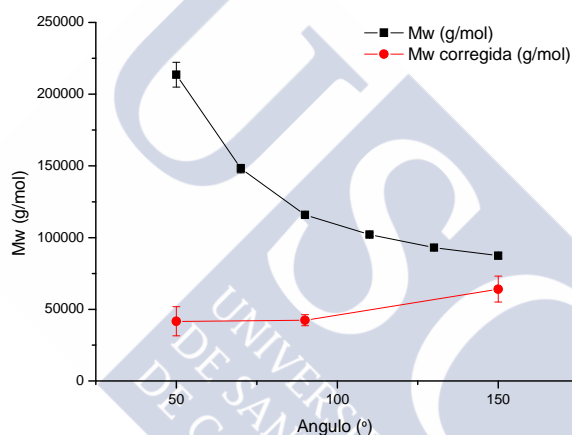


Fig. 3.68 Representación del M_w frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.4 M de NaCl.

Para finalizar, se ha aumentado la concentración de NaCl hasta 0.5 M, habiéndose obtenido los datos mostrados en la Tabla 3.35 y en la Figura 3.69. Los valores promedio son: $M_w = 4.3 \times 10^4$ y $N_{ag} = 64$ moléculas.

Tabla 3.35 Datos obtenidos SLS, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM, medido a diferentes ángulos con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.5 M de NaCl.

Ángulo (°)	M_w (g/mol)	χ^2	A_2 (cm ³ mol/g ²)	N_{ag}	% pequeña(N_{ag})	M_w (g/mol) (N_{ag})-corregido
50	320200±1300	10800	(1.791±0.004) ·10 ⁻⁴	473	59 (186)	(3.1±0.4)×10 ⁴ (46±6)
70	194640±790	2600	(2.274±0.005) ·10 ⁻⁴	288		
90	134220±520	936	(2.439±0.007) ·10 ⁻⁴	198	62 (106)	(4.0±0.5)×10 ⁴ (59±7)
110	110860±390	637	(2.386±0.008) ·10 ⁻⁴	164		
130	96890±300	756	(2.297±0.007) ·10 ⁻⁴	143		
150	90700±230	1000	(2.311±0.006) ·10 ⁻⁴	134	87 (110)	(5.9±0.3)×10 ⁴ (87±5)

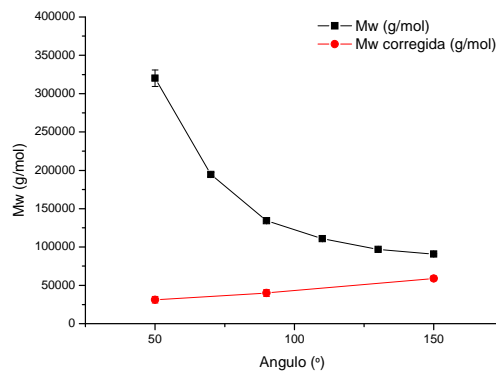


Fig. 3.69 Representación del Mw frente el ángulo de medición, para el AdGluCNa con concentraciones de 60 mM con tampón C/BC de Na 15 mM y 0.5 M de NaCl.

Al representar la variación del coeficiente de virial (corregido) en función de la concentración de NaCl medido a 90°, observamos la tendencia que se muestra en la Figura 3.70.

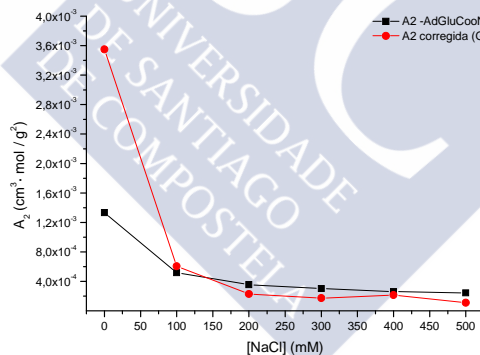


Fig. 3.70 Representación de los coeficientes de virial obtenidos, A_2 , frente a la concentración de NaCl para las muestras de AdGluCNa descritas anteriormente.

Se determinaron los coeficientes de difusión para todas las concentraciones y todas las fuerzas iónicas a 90°. Al representarlos frente a la concentración, se obtiene la Figura 3.71. Se observa que al aumentar la fuerza iónica disminuye D.

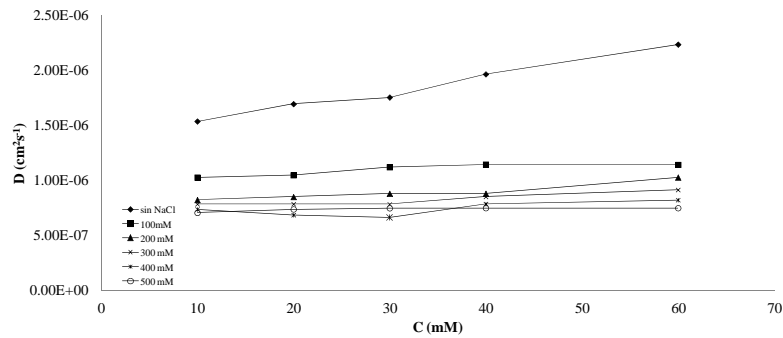


Fig. 3.71 Representación de los coeficientes de difusión calculados frente a la concentración de AdGluCA, en función de la concentración de NaCl.

A partir de 0.3 M de NaCl, podemos observar como existe una cierta estabilización del coeficiente de difusión.

Del ajuste lineal $\overline{D}_T = \overline{D}_0(1 + k \cdot C + \dots)$ calculamos \overline{D}_0 y k . Los datos resultantes se resumen en la Tabla 3.36 y en la Figura 3.72.

Tabla 3.36 Coeficientes de Difusión obtenidos del ajuste lineal y constante k , de la pendiente del ajuste, para AdGluCNa a las diferentes concentraciones de NaCl.

[NaCl]	\overline{D}_0	k
0	$(1.39 \pm 0.03) \cdot 10^{-6}$	$10.1 \cdot 10^{-3}$
100	$(1.01 \pm 0.03) \cdot 10^{-6}$	$2.50 \cdot 10^{-3}$
200	$(0.76 \pm 0.03) \cdot 10^{-6}$	$5.10 \cdot 10^{-3}$
300	$(0.73 \pm 0.02) \cdot 10^{-6}$	$3.87 \cdot 10^{-3}$
400	$(0.66 \pm 0.05) \cdot 10^{-6}$	$3.62 \cdot 10^{-3}$
500	$(0.71 \pm 0.01) \cdot 10^{-6}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$

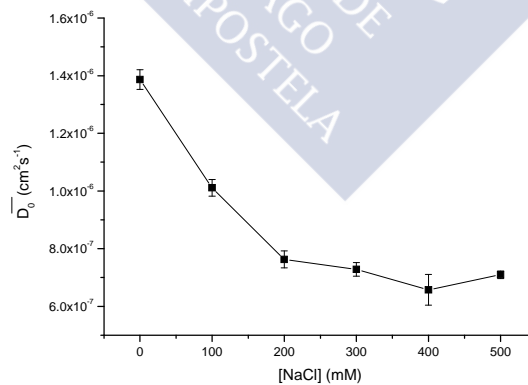


Fig. 3.72 Representación de los coeficientes de difusión calculados frente a la concentración de NaCl para el AdGluCNa.

3.2.4.6 DISPERSIÓN DE RAYOS X A BAJO ÁNGULO (SAXS - SMALL-ANGLE X RAY SCATTERING)

Se han realizado medidas mediante SAXS a una disolución de concentración 20 mM en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15 mM, obteniéndose un radio de giro, R_g , de $1.69 \pm 0.1 \text{ \AA}$, distancia máxima ij en la partícula, D_m , 96.31 \AA y la intensidad a $q=0$, $I(0) = 0.783$. Los datos experimentales obtenidos se pueden observar en la Figura 3.73.

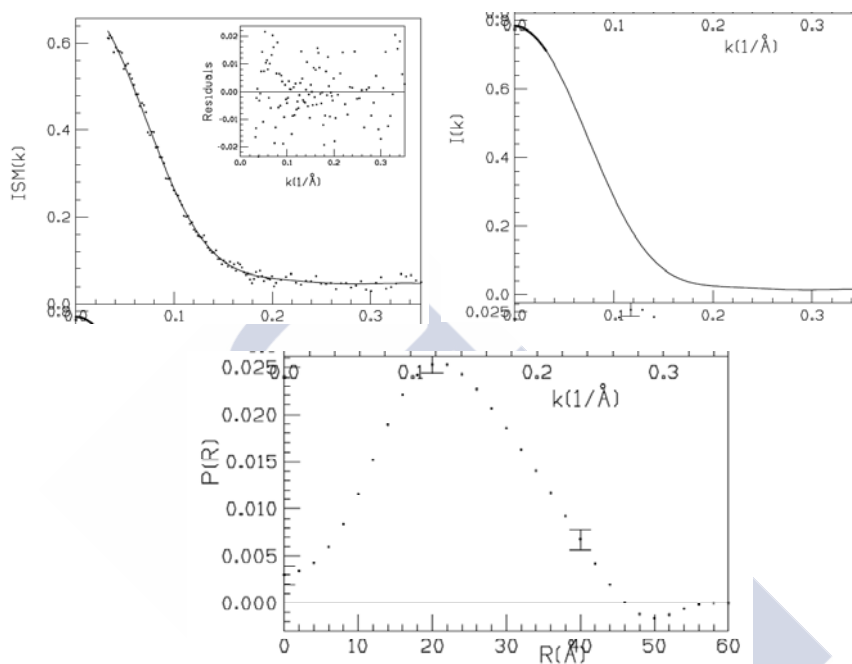


Fig. 3.73 Representación del Intensidad de la radiación dispersada el patrón de dispersión y los residuos, y patrón de dispersión calculado [$e^2/\text{\AA}^3$] frente a $Q[\text{\AA}^{-1}]$, y representación del Factor de forma frente a la Distancia de todos los pares atómico ij en la molécula en \AA para una concentración 20 mM de AdGluCNa en Tampón C/BC Na 15 mM.

3.2.4.7 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)

Se han preparado diferentes disoluciones de AdGluCNa con concentración 0.1 mM, en Tampón Carbonato/Bicarbonato 15mM.

Del análisis de las imágenes se obtienen el siguiente tamaño experimental medios: diámetro= $38 \pm 11 \text{ nm}$, ($N=116$), Figura 3.74.

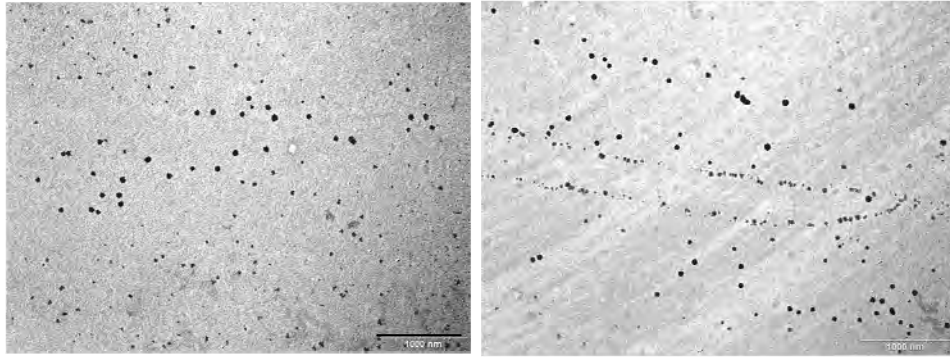


Fig. 3.74 Imágenes TEM tomadas para una concentración 0.1 mM de AdGluCNa en Tampón C/BC Na 15 mM. Escala de 1 μ m.

Las imágenes de la Figura 3.75 corresponden a una concentración 20 mM en Tampón C/BC Na 15 mM. El tamaño experimental resultante es: diámetro = 22 ± 8 nm, (N=104).

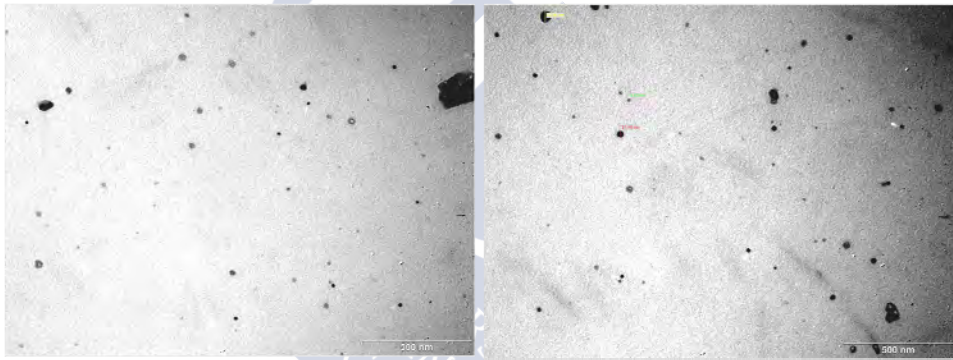


Fig. 3.75 Imágenes TEM tomadas para una concentración 20 mM de AdGluCNa en tampón C/BC de Na, escala de 500 nm.

3.3 COMENTARIOS ADICIONALES

Hemos observado que el AdCH₂CA es capaz de formar organogeles en diferentes compuestos como acetofenona y clorobenceno, mientras que el NbCH₂CA, amplía esta capacidad al anisol y formaba esferulitas de gel en dioxano. También debemos de destacar que ninguno de ellos formaba hidrogeles en las concentraciones de estudio. Sin embargo, el AdSucCA representa una excepción ya que se comporta como un buen agente gelificante en agua. Este comportamiento se debe en gran medida a la incorporación de un enlace amida entre el grupo adamantilo y el otro grupo amida que lo une al núcleo del esteroide. Sin embargo, al incorporar un grupo metileno adicional, que separa los dos grupos amida, se pierde esta capacidad gelificante, en gran medida, por lo que no influye tanto el tamaño del grupo hidrofóbico terminal en esta propiedad, como la limitación de los grados de libertad de dicho grupo.

Por otro lado, se observa que los datos de área por molécula aumenta según la siguiente secuencia AdCH₂CA < NbCH₂CA < AdGluCA mientras que la tendencia de la energía libre en la interfase aire/agua es inversa.

La concentración de agregación crítica estudiada mediante fluorescencia y tensión superficial muestra la relevancia de la incorporación del grupo hidrófobo en la molécula de partida. Observando que el empleo del norbornilo daba unos valores mayores de cac comparado con los otros tres compuestos estudiados. Por otra parte una mayor separación del grupo hidrófobo del núcleo esteroideo y su mayor movilidad parece que genera una disminución en el valor de cac obtenida.

Si observamos los tamaños de partículas o de agregados que han sido estudiados en los diferentes medios y condiciones, observamos que existe una capacidad clara de estabilizar agregados de mayor tamaño al ir aumentando la fuerza iónica del medio, pasando de los 2-4 nm a los 6-10 nm, según el compuesto analizado, mientras que el tamaño aproximado de agregado está muy próximo entre ellos, como muestran los datos de dispersión de la luz dinámica, y la técnica de SAXs.

También se ha observado que en el caso particular del AdSucCA, tiene capacidad de formar cristales líquidos, y mediante la variación de la fuerza iónica del medio, es posible invertir la luz polarizada absorbida por la muestra variando ésta de dextrógira a levógira y viceversa.

Mediante la técnica de TEM y SEM y debido al bajo contraste y al procesado de las muestras, se observa que los tamaños de partículas medidos son bastante más grandes que los observados por otras técnicas y bastante próximos entre sí, para los diferentes compuestos estudiados.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Willemen, H. M. Aggregation behavior of cholic acid derivatives in organic solvents and in water. ISBN 90-5808-5714-X (2002).
- 2 Norde, W. SOME APPLICATIONS OF THE GIBBS ADSORPTION EQUATION. *Colloids and Interfaces in Life Sciences* Marcel Dekker (2003).
- 3 Mukhopadhyay, S., Ira, Krishnamoorthy, G. & Maitra, U. Dynamics of Bound Dyes in a Nonpolymeric Aqueous Gel Derived from a Tripodal Bile Salt. *J. Phys. Chem. B* 107, 2189-2192 (2003).
- 4 Prosser, A. J. & Franses, E. I. Adsorption and surface tension of ionic surfactants at the air-water interface: review and evaluation of equilibrium models. *Colloids Surfaces, A* 178, 1-40 (2001).
- 5 Menger, F. M., Shi, L. & Rizvi, S. A. A. Re-evaluating the Gibbs Analysis of Surface Tension at the Air/Water Interface. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10380-10381 (2009).
- 6 Li, P. X. *et al.* Application of the Gibbs Equation to the Adsorption of Nonionic Surfactants and Polymers at the Air-Water Interface: Comparison with Surface Excesses Determined Directly using Neutron Reflectivity. *Langmuir* 29, 9324-9334 (2013).
- 7 Xu, H. *et al.* Limitations in the Application of the Gibbs Equation to Anionic Surfactants at the Air/Water Surface: Sodium Dodecylsulfate and Sodium Dodecylmonooxyethylenesulfate Above and Below the CMC. *Langmuir* 29, 9335-9351. (2013).
- 8 Li, P. X., Thomas, R. K. & Penfold, J. Limitations in the Use of Surface Tension and the Gibbs Equation To Determine Surface Excesses of Cationic Surfactants. *Langmuir* 30, 6739-6747 (2014).
- 9 Small, D. M. The Physical Chemistry of Cholanic Acids. *in The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism; Nair, P. P., Kritchevski, D., Eds.; Plenum Press: New York.* Chapter 8, 249-356 (1971).
- 10 Miyoshi, H. *et al.* Mixed Monolayer Formation of Bile Acid Mixtures: Chenodeoxycholic Acid with Ursodeoxycholic Acid and Cholic Acid with b-Muricholic Acid. *J. Colloid Interface Sci.* 149, 216-225 (1992).
- 11 Thomas, D. C. & Christian, S. D. Micellar and Surface Behavior of Sodium Deoxycholate Characterized by Surface Tension and Ellipsometric Methods. *J. Colloid Interface Sci.* 78, 466 (1980).
- 12 Carey, M. C., Montet, J. C. & Small, D. M. Surface and Solution Properties of Steroid Antibiotics: 3-Acetoxyfusidic Acid, Cephalosporin P1 and Helvolic Acid. *Biochemistry* 14, 4896-4905 (1975).
- 13 Swanson-Vethamuthu, M., Almgren, M., Hansson, P. & Zhao, J. Surface Tension Studies of Cetyltrimethylammonium Bromide—Bile Salt Association. *Langmuir* 12, 2186-2189 (1996).
- 14 Meijide, F. *et al.* Formation of tubules by p-tert-butylphenylamide derivatives of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in aqueous solution. *Steroids* 77, 1205-1211 (2012).
- 15 Trillo, J. V. *et al.* Self-aggregation mechanism of a naphthylamide cationic derivative of cholic acid. From fibers to tubules. *RSC Adv.* 4, 5598-5606 (2014).
- 16 Carrazana, J., Jover, A., Meijide, F., Soto, V. H. & Vázquez Tato, J. Complexation of Adamantyl Compounds by b-Cyclodextrin and Monoaminoderivatives. *J. Phys. Chem. B* 109, 9719-9726 (2005).
- 17 Trillo, J. V. *et al.* Diarmed (adamantyl/alkyl) surfactants from nitrilotriacetic acid. *Colloids Surf. B* 123 974–980, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.056 (2014).
- 18 Okuyama, K. *et al.* Molecular and crystal structure of the lipid-model amphiphile, dioctadecyldimethylammonium bromide monohydrate. *Bull. Chem Soc. Jpn.* 61, 1485-1490 (1988).
- 19 Prime, E. L. *et al.* Rational design of monolayers for improved water evaporation mitigation. *Colloids Surfaces A* 415, 47-58. (2012).

- 20 Tajima, K. Radiotracer studies on adsorption of surface-active substance at aqueous surface. II. Effect of excess salt on the adsorption of sodium dodecyl sulfate. *Bull. Chem Soc. Jpn.* 43, 3063-3066 (1970).
- 21 Kratochvil, J. P., Hsu, W. P. & Kwok, D. I. How Large Are the Micelles of Di-a-hydroxy Bile Salts at the Critical Micellization Concentrations in Aqueous Electrolyte Solutions? Results for Sodium Taurodeoxycholate and Sodium Deoxycholate. *Langmuir* 2, 256-258 (1986).
- 22 Coello, A., Meijide, F., Rodríguez Núñez, E. & Vázquez Tato, J. Aggregation Behavior of Bile Salts in Aqueous Solution. *J. Pharm. Sci.* 85, 9-15 (1996).
- 23 Jover, A., Meijide, F., Rodríguez Núñez, E. & Vázquez Tato, J. Aggregation behavior of bile salts. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* 3, 323-335 (1999).
- 24 Soto Tellini, V. H. Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* (2006).
- 25 Hofmann, A. F. & Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.* 25, 1477-1489 (1984).
- 26 Roda, A. et al. Bile acids with a cyclopropyl-containing side chain. IV. Physicochemical and biological properties of the four diastereoisomers of 3a,7b-dihydroxy-22,23-methylene-5b-cholan-24-oic acid. *Journal of Lipid Research* 28, 1384-1397 (1987).
- 27 Carey, M. C. Measurement of the physical-chemical properties of bile salt solutions. *Bile Acids in Gastroenterology*. L. Barbara, R. H. Dowling, A. F. Hofmann, E. Roda. Lancaster. MTP Press Limited, 19-56 (1983).
- 28 Jover, A. et al. Unusual Pyrene Excimer Formation during Sodium Deoxycholate Gelation. *Langmuir* 12, 1789-1793 (1996).
- 29 Alvarez Alcalde, M. Estructuras supramoleculares generadas por ácidos biliares y ciclodextrinas. *Estructuras supramoleculares generadas por ácidos biliares y ciclodextrinas, Tesis Doctoral, USC* (2007).
- 30 Toda, F., Bishop, R. & by, E. Separations and Reactions in Organic Supramolecular Chemistry: Perspectives in Supramolecular Chemistry. *Separations and Reactions in Organic Supramolecular Chemistry: Perspectives in Supramolecular Chemistry* 8, Wiley, ISBN: 0-470-85448-85440 (2004).
- 31 Schmuck, C. Highlights in Bioorganic Chemistry – Methods and Applications. *Highlights in Bioorganic Chemistry – Methods and Applications*, }, Edited by Carsten Schmuck, Helma Wennemers, Wiley VCH, (2004).
- 32 Lindo, J. C., Tranter, G., E.; & Holmes, J. L. *Encyclopedia de spectroscopy and spectrometry* Volumen 1 (2000).

4

Derivado de Ácido Cólico con Tioles. Resinas epoxi y Nanopartículas de Au. Mezclas Cataniónicas.

Este capítulo tiene dos apartados diferenciados. En primer lugar, trata sobre la síntesis de derivados de ácido cólico incorporando a su estructura grupos tioles y que fue realizada para la obtención de nuevos derivados para su posterior aplicación en la estabilización de nanopartículas de Au, habiendo caracterizado su tamaño y su forma. Estos compuestos tienen potenciales aplicaciones en el mundo de la biomedicina y biotecnología. Como extensión a este apartado se han resumido dos trabajos que se han desarrollado hacia el final de la presente tesis a modo de exploración de nuevas líneas de investigación sobre la unión de resinas epoxi, nanopartículas metálicas y diferentes técnicas de curado, haciendo uso de técnicas estadísticas para el diseño de experimentos y ahondando en el estudio de algunas de las propiedades de los nanocomposites obtenidos.

En segundo lugar, en este capítulo también se estudiarán tres compuestos sintetizados derivados del ácido cólico por la posición, 24 dando origen a dos especies di-aniónica y di-catiónica, para analizar los sistemas cataniónicos generados. Por último y debido a las características potenciales que pueden presentar las moléculas como agentes captadores de metales, se propone y sintetiza una tercera molécula derivada de las anteriores. Estos derivados, en conjunto o por separado, empleadas como agentes de complejación de metales, pueden tener diferentes tipos de aplicaciones de carácter industrial y farmacológico.

Siempre es bueno que el conocimiento sea compartido.

(Alberto Espinosa – El mundo Amarillo)

La síntesis y comportamiento de los tensioactivos cataniónicos han sido publicados en

Langmuir, 29(40), 09/2013



4.1 DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO CON TIOLES

4.1.1 NANOPARTÍCULAS DE ORO

En los últimos años, las nanopartículas han cobrado gran interés en la industria de los polímeros. Se tratan de partículas con dimensiones inferiores a los 100 nm que provienen de diferentes materiales, siendo los más comunes los metales y sus óxidos, los materiales cerámicos y los silicatos.¹ Las nanopartículas que integran los coloides metálicos suelen ser nanopartículas de metales como Au, Ag, Fe y Cu, en suspensión en un disolvente dado.

Los coloides metálicos se conocen desde hace mucho tiempo: en la antigüedad, los coloides de oro se empleaban como sustancias colorantes en la fabricación de vidrios. Desde Faraday se conocen las propiedades ópticas especiales de las suspensiones de nanopartículas metálicas, las cuales poseían un color diferente según el método de fabricación. El mecanismo preciso para dicha coloración fue propuesto por G. Mie quien mostró que los colores de los coloides metálicos, considerados como suspensiones de partículas esféricas, eran una consecuencia conjunta de la absorción y difusión de la luz. En los últimos tiempos las técnicas de fabricación y modificación de coloides metálicos o semiconductores se han desarrollado extraordinariamente con el fin de obtener partículas con morfologías y propiedades adecuadas para ser empleadas en dispositivos nanoscópicos con aplicaciones diversas: dispositivos electrónicos, ópticos, espectroscópicos, etc. El control de la forma y el tamaño de la nanopartícula obtenida es importante ya que las propiedades optoelectrónicas que de ellas deriven dependen íntimamente estos parámetros.

A la hora de preparar coloides metálicos, se debe prestar especial atención a la estabilización de los mismos mediante diferentes medios o agentes protectores ya que las partículas coloidales en suspensión tienden a precipitar con el tiempo. En el presente capítulo, emplearemos las moléculas sintetizadas como agente protectores y determinaremos la forma y tamaño de las nanopartículas así estabilizadas.

Existen referencias bibliográficas desde principios del siglo XX, describiendo la síntesis de nanopartículas en agua. Así, en 1917, Neeta y col.² describieron la síntesis de partículas coloidales de oro estabilizadas con octadecanotiol, describiendo la posibilidad de la realización de transferencias de fases entre una fase acuosa y otra orgánica, empleando ciclodextrinas.

En 1985, Turkenvich publicó una revisión, en dos partes, con unas 53 referencias bibliográficas, referidas a la síntesis, estructura y morfología de los sistemas coloidales de oro.³⁻⁴ Entre otros aspectos, destacó la reducción de sal de oro con citrato de sodio a 100 °C, para la obtención de una disolución estable de nanopartículas de Au de 20 nm

de diámetro. También presentó el proceso de formación de las nanopartículas como un proceso en tres etapas, nucleación, crecimiento y coagulación, describiendo cada uno de ellos por separado.

En la segunda parte analizó la relación existente entre la coloración de la disolución de oro coloidal y el tamaño de partícula mediante el estudio de las bandas de absorción de las disoluciones obtenidas, analizando más profundamente los procesos de crecimiento y nucleación. Así mismo, analizó la importancia de las soluciones coloidales de platino, y aleaciones de platino-oro en cuanto a las propiedades catalíticas.⁴

En 1996 Fricker y col. presentaron una revisión bibliográfica en la que trata de establecer los usos médicos de los compuestos de oro, desde el punto de vista de su uso en el pasado, el presente y sus aplicaciones futuras. Destacaron el uso de complejos de oro en el siglo XX, en el tratamiento de artritis reumatoide, analizando su uso en la interacción con las proteínas, interacción en la transcripción genética, así como el uso de complejos de oro con actividades antitumorales y antimicrobianas.

En 1999, Link y col.⁵ estudiaron el comportamiento de los espectros de absorción UV-VIS de las nanopartículas de Au esféricas y cilíndricas, en función de su tamaño, así como la posibilidad de formar partículas esféricas a partir de las cilíndricas mediante la irradiación con láser a una longitud de onda determinada.

Un año más tarde, Schimdbaur⁶ publicó una revisión bibliográfica de unos 100 artículos aproximadamente, dando relevancia al término "*aurophilicity*". Este término, fue introducido en 1989 para describir los fenómenos de la química estructural del oro que no podían ser descritos mediante los conceptos de la química de enlace convencional y que hace especial el comportamiento del Au en comparación con el de otros elementos como el cobre, plata, platino y mercurio. Simultáneamente, Shipway y col.⁷ presentaron una nueva revisión bibliográfica de unos 287 artículos, sobre las aplicaciones de las nanopartículas en los campos de la electrónica, óptica y como sensores, destacando su interés desde el punto de vista de la nanotecnología y nanoingeniería, describiendo diferentes métodos de síntesis y fijación de las nanopartículas a diferentes sustratos.

En el año 2001, Tetsu Yonezawa y col. dieron cuenta de la estabilización de nanopartículas de Au con un nuevo ligando disulfuro, empleando NaBH_4 para la preparación de las nanopartículas. Las nanopartículas resultantes tenían un tamaño de unos 2 nm estables y su polidispersidad era baja. La metodología de síntesis seguida fue la desarrollada por Brust y col.⁸ Debido a su simplicidad y buenos resultados en cuanto a tamaño de partícula y polidispersidad, esta es la técnica que sigamos nosotros en el presente trabajo.

En el año 2002, Paulini y col.⁹ publicaron un artículo sobre el efecto de ligandos ramificados en la estructura y estabilidad de monocapas de nanopartículas de oro, destacando su gran aplicabilidad en dispositivos y materiales, sintetizan nanopartículas de Au, con grupos funcionales amida en la monocapa variando los grupos funcionales terminales, destacando las fuerzas de los enlaces de hidrógenos intramonocapa en torno al núcleo de Au. Esto es interesante desde el punto de vista de la presente tesis, ya que nuestras moléculas modificadas van a presentar grupos amida que podrían interactuar de la misma forma, dándole una mayor estabilidad a la nanopartícula (véase la Figura 4.1.)

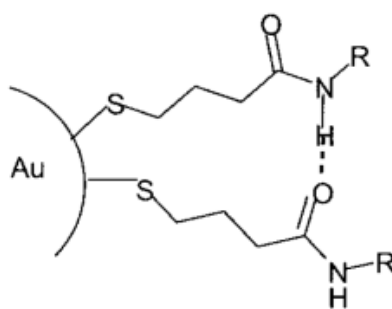


Fig. 4.1. Enlaces de hidrógeno entre los grupos amida de la monocapa de la nanopartícula de oro. ⁹

En 2004, Daniel y col.¹⁰ realizaron un amplio estudio bibliográfico a través de 665 publicaciones. Detallaron diferentes métodos sintéticos para la formación y estabilización de las nanopartículas de Au y presentaron una descripción pormenorizada de los métodos físicos para la síntesis de nanopartículas tales como: fotoquímica (UV, IR-cercano), radiolisis, termolisis y ultrasonidos. También describieron la síntesis de nanopartículas bimetálicas de Au con Ag, Pd, Pt, TiO, Fe, Zn, Cu, ZrO₂, CdS, Fe₂O₃ y Eu. Así mismo, describieron la síntesis de polímeros con nanopartículas de Au, destacando principalmente dos modos de formación del compuesto nanopartícula-polímero. El primero consiste en la síntesis *in situ* de las nanopartículas en la matriz polimérica mediante la reducción de la sal metálica disuelta en la matriz o por evaporación del metal en la superficie del caliente. El segundo, menos empleado, consiste en la polimerización de la matriz en torno a las nanopartículas. Seguiremos este método al intentar introducir nuestras nanopartículas estabilizadas con sal biliar en el seno de un polímero tipo resina epoxídica. También recogieron el empleo de dendrímeros tipo PAMAM con nanopartículas de Au, para su empleo como sensores, así como el empleo de otro tipo de sustratos, sílica, etc... Adicionalmente, describieron las propiedades físicas de las nanopartículas de oro, las características de sus espectros de absorción visible, fluorescencia, electroquímica y propiedades electrónicas de las mismas y, entre muchas otras, destacaron sus aplicaciones en el campo de la biología, la catálisis y en la óptica no lineal.

Los autores destacaron que aunque el oro se presenta como un elemento inerte, la reactividad de los núcleos de oro que conforman las nanopartículas tienen útiles aplicaciones en catálisis incluso a baja temperatura. La extraordinaria variedad de estructuras, propiedades y aplicaciones, así como la posibilidad de combinación de las nanopartículas de oro con otras moléculas motivan un gran interés desde el punto de vista interdisciplinar al involucrar diferentes aspectos de la química, física, biología y medicina.¹⁰

En 2005, Bhargava y col.¹¹ describieron la síntesis y caracterización de nanopartículas de Au formadas mediante la reducción de la sal de Au empleando diferentes aminoácidos como L-tirosina, glicil-L-tirosina y L-arginina, caracterizándolas mediante el empleo de SAXs y HRTEM. En este mismo año, Jurvilliers y col.¹² describieron la obtención de nanopartículas de oro a gran escala mediante una nueva técnica en un solo paso mediante la reducción de AuBr₃ con *t*-BuOLi activado con LiH en dioxano, obteniendo nanopartículas con baja polidispersidad.

4.1.2 DERIVADOS DE SALES BILIARES CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

En los últimos años se han incorporado modificaciones a las sales biliares o se han empleado conjugados de las mismas incorporando grupos tioles en sus estructuras, para estudiar su comportamiento en la estabilización de nanopartículas, así como sus posibles aplicaciones en diversos campos.

En 2006 Bhat y Maitra¹³ y col. describieron la síntesis de una serie de tioles anfifílicos como agentes para estabilizar las nanopartículas de oro. Destacan que los grupos hidroxilo de los esteroides pueden adjuntar grupos activos para el empleo de funciones específicas como catálisis, transferencia de energía, sensores, etc. Emplearon derivados de sales biliares obtenidos por transformación de su posición 24 en un grupo tiol y también un trímero del ácido cólico como agente gelificante, destacando su empleo como un medio excelente para la estabilización estructural de las nanopartículas, presentándolo como un método novedoso para la obtención de este tipo de materiales compuestos. Es la primera referencia bibliográfica en la que encontramos el empleo de los derivados de ácidos biliares para la estabilización de nanopartículas de oro.

En 2008, Kolehmainen y col. ¹⁴ describieron que el concepto del empleo de los ácidos biliares y sus conjugados en la nanociencia como una idea novedosa la cual abre fascinantes campos, desarrollando en este artículo la estabilización de nanopartículas metálicas mediante el empleo de un derivado tiol del ácido litocólico mediante la

incorporación de L-cisteina etil éster mediante un enlace amida por la posición 24 del ácido biliar.

Cuatro años más tarde, Maitra y col.,¹⁵ describieron la formación de hidrogeles mediante el empleo de colato de sodio en presencia de diferentes iones metálicos como Ca^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} and Ag^{+} . Algunos de los hidrogeles obtenidos han sido empleados para la síntesis de materiales híbridos con nanopartículas de oro y de plata, destacando las posibles aplicaciones de estos materiales híbridos nanopartícula-gel.

En 2013 Rodríguez y col.¹⁶ describen la formación de complejos de nanopartículas de Au, con bisursodeoxicolato(etilIndiamina)-platino(II), $[\text{Pt}(\text{UDC})_2(\text{en})]$, PtU_2 , aludiendo a metodologías y trabajos anteriores del grupo.¹⁷⁻¹⁸ y estudian la actividad citotóxica contra las células de osteosarcoma MG63.

En este mismo año Maitra y col.¹⁹ presentaron una nueva familia de dímeros de derivados de ácidos biliares unidos mediante enlaces éter, formando organogeles en diferentes disolventes aromáticos. Realizando estudios reológicos de los mismos. También han empleado las nanofibras en los organogeles para la incorporación y generación de nanopartículas de oro de diferentes tamaños y formas dando lugar a nuevos materiales híbridos gel-nanopartícula.

4.1.3 PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS COLOIDES METÁLICOS

En general, los coloides poseen unas propiedades ópticas derivadas del tamaño de las nanopartículas en suspensión y, en particular, los coloides metálicos presentan unas propiedades ópticas específicas derivadas de su naturaleza metálica. Sin embargo, en muchos casos, pueden diferir de las de los metales a nivel macroscópico. En la realidad, las nanopartículas metálicas pueden ser consideradas como un estado intermedio entre un simple átomo y el material a escala macroscópica.

Las propiedades de los materiales macroscópicos miniaturizados difieren en muchos aspectos de los materiales de origen, siendo una característica importante el hecho de que sus niveles electrónicos sean discretos, lo que da lugar a la manifestación de efectos cuánticos. Entre estos efectos está el de los plasmones, nombre que reciben las oscilaciones colectivas de los electrones libres existentes en los metales, las cuales llevan asociadas niveles energéticos tales que las transiciones electrónicas entre las mismas dan lugar a la extinción de una parte de la luz incidente, dando lugar a un efecto de coloración en estos sistemas. Cuando las partículas metálicas son de pequeño tamaño en relación con la longitud de onda, la absorción predomina sobre la difusión. La energía de los plasmones depende de la naturaleza del metal así como de la morfología y tamaño de la nanopartícula.

4.1.4 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LAS SUPERFICIES DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la estabilidad de los coloides metálicos, son sus propiedades superficiales, las cuales son de gran importancia con vistas a aplicaciones posteriores.

Las nanopartículas metálicas presentan una interfase con cargas positivas, resultantes de un defecto de electrones en los átomos de la superficie que pasan al medio que las circundan. Esta carga es neutralizada por iones negativos, normalmente procedentes de las sales empleadas en la preparación del coloide. Se forma entonces una doble capa eléctrica que da lugar a la llamada capa de Stern (Figura 4.2), integrada por iones *rígidamente* unidos a la superficie del metal. A continuación se encuentra la capa de difusión, en la que los iones presentan mayor movilidad.

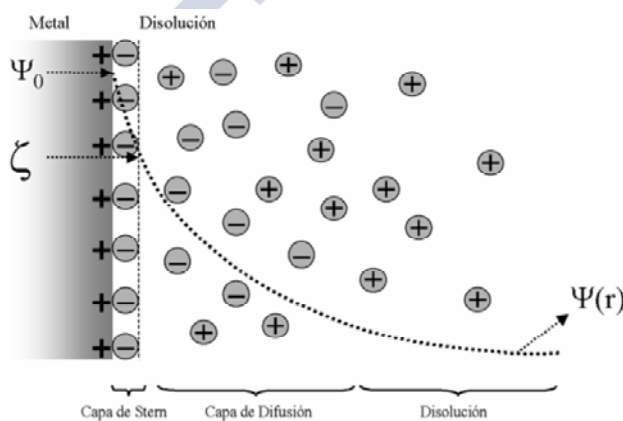


Fig. 4.2. Distribución de iones sobre la superficie de la nanopartícula metálica y curva de potencial eléctrico (Ψ) en función de la distancia a la superficie.

Como consecuencia de la distribución de cargas positivas y negativas sobre la superficie, la partícula presenta una carga neta negativa. La carga residual del metal en su superficie es una propiedad importante que asegura la estabilidad de la partícula en suspensión. El potencial eléctrico en la superficie es difícil de determinar. Sin embargo es más fácil determinar el potencial en la interfase entre la capa de Stern y la de difusión, que es el potencial ζ . Este potencial es más empleado, ya que su valor depende en buena parte de las propiedades físico-químicas de las nanopartículas, tales como la movilidad, difusibilidad y estabilidad.

La estabilidad de estos sistemas está gobernada por un balance de las fuerzas atractivas tipo van der Waals y las repulsivas electrostáticas entre nanopartículas. Las fuerzas electrostáticas de repulsión entre partículas dependen de la distancia según $1/r^2$ mientras que las fuerzas de atracción son mucho más débiles ya que depende de $1/r^6$, siendo r la distancia entre partículas. Las partículas tienen que vencer un

potencial máximo para poder aproximarse lo suficiente como para adherirse y/o agregarse. La barrera energética depende del potencial Z de las nanopartículas.

La reducción del potencial Z puede inducirse mediante la adsorción de una molécula neutra sobre el metal, o bien por la neutralización de la carga residual de la partícula, lo que da lugar a una reducción en la barrera de potencial y se produce la agregación de las partículas.²⁰

4.1.5. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

El área superficial de las nanopartículas se incrementa con el descenso de su tamaño. Así una partícula de 1 nm de diámetro tendrá el 100% de sus átomos en la superficie, una partícula de 10 nm, tendría únicamente en torno al 15% de sus átomos en la superficie. En consecuencia una nanopartícula pequeña con una alta área superficial será más reactiva.

Además, el cambio cualitativo en la estructura electrónica produce un confinamiento cuántico, lo que les proporcionará unas propiedades catalíticas inusuales a estas partículas, totalmente distinto del material sólido macroscópico.²¹

4.1.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.6.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU

Una de las partes fundamentales de este capítulo consiste en la formación de las nanopartículas de Au que posteriormente serán caracterizadas y estabilizadas con los derivados de sal biliar que hemos sintetizado. Para ello es fundamental conocer la síntesis y las características de las nanopartículas de Au que trataremos de estabilizar. Aunque brevemente (ya que las publicaciones citadas no constituyen más que una pequeña parte de las innumerables publicaciones y trabajos desarrollados en los últimos años sobre las nanopartículas metálicas), hemos visto en la Introducción las rutas de síntesis y sus aplicaciones.

Para el desarrollo de este capítulo nos centramos en dos de las rutas más empleadas para la obtención de nanopartículas de Au, rutas ampliamente estudiadas y de las que trataremos de reproducir algunos de los trabajos bibliográficos a la hora de escoger el mejor método sintético desde el punto de vista de la calidad de nanopartícula obtenida y su tamaño. Las dos rutas serán la reducción de sal de Au mediante (i) citrato sódico y (ii) borohidruro sódico, para luego adaptar las condiciones para la estabilización con nuestras moléculas.

Para ello la primera ruta estudiada se describe a continuación.

4.1.6.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU CON CITRATO DE SODIO

Para la síntesis de nanopartículas de Au con citrato en agua seguiremos el siguiente procedimiento descrito por Liu *et al.*²² Se vierte 1 ml de una disolución en agua 5 mM de H₂AuCl₄ sobre 18 ml de agua, obteniendo 19 ml de una disolución de H₂AuCl₄ (0,26 mM); se calienta hasta ebullición (Tabla 4.1) y se añade el volumen correspondiente de una disolución 19,4 mM de citrato de sodio en función de la relación reductor/oro que escojamos. Continuamos calentando hasta que el cambio de color, a púrpura claro, sea evidente. Transcurridos unos 15 minutos a ebullición, se deja enfriar a temperatura ambiente. Tratando de caracterizar Las nanopartículas obtenidas se caracterizan mediante UV-VIS (Figura 4.3) y microscopía TEM (Figura 4.4).

Tabla. 4.1. Disoluciones preparadas, absorbancia máxima obtenida de los espectros UV-VIS, diámetro medio obtenido en función del número de partículas estudiadas y número medio de átomos de oro calculados por nanopartícula de Au sintetizada.

V (ml) disolución H ₂ AuCl ₄ 0,26 mM	V (ml) disolución citrato sódico 19,4mM	Relación Citrato / Au	Abs máxima (nm)	(D) diámetro medio (nm)	n° partículas medidas	10 ⁻⁴ N/ Número medio de átomos de oro por nanopartícula
19	0,5	2	529	13±1	154	6,8±2
19	1	4	520	13±1	151	6,8±2
19	2	8	524	15±1	152	10±2
19	4	16	527	17±2	159	15,2±5
19	6	24	525	21±3	160	29±12
19	8	31	522	20±2	154	25±7

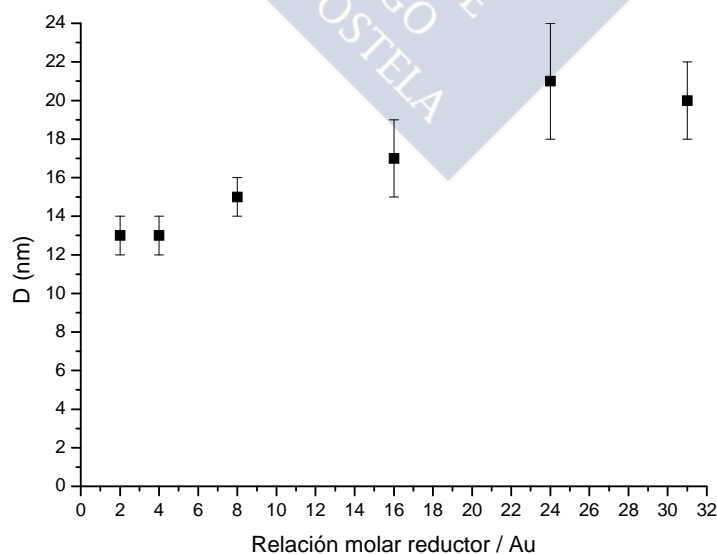


Fig. 4.3. Diámetros de nanopartícula obtenidos mediante microscopía TEM en función de la relación reductor/sal de oro empleada.

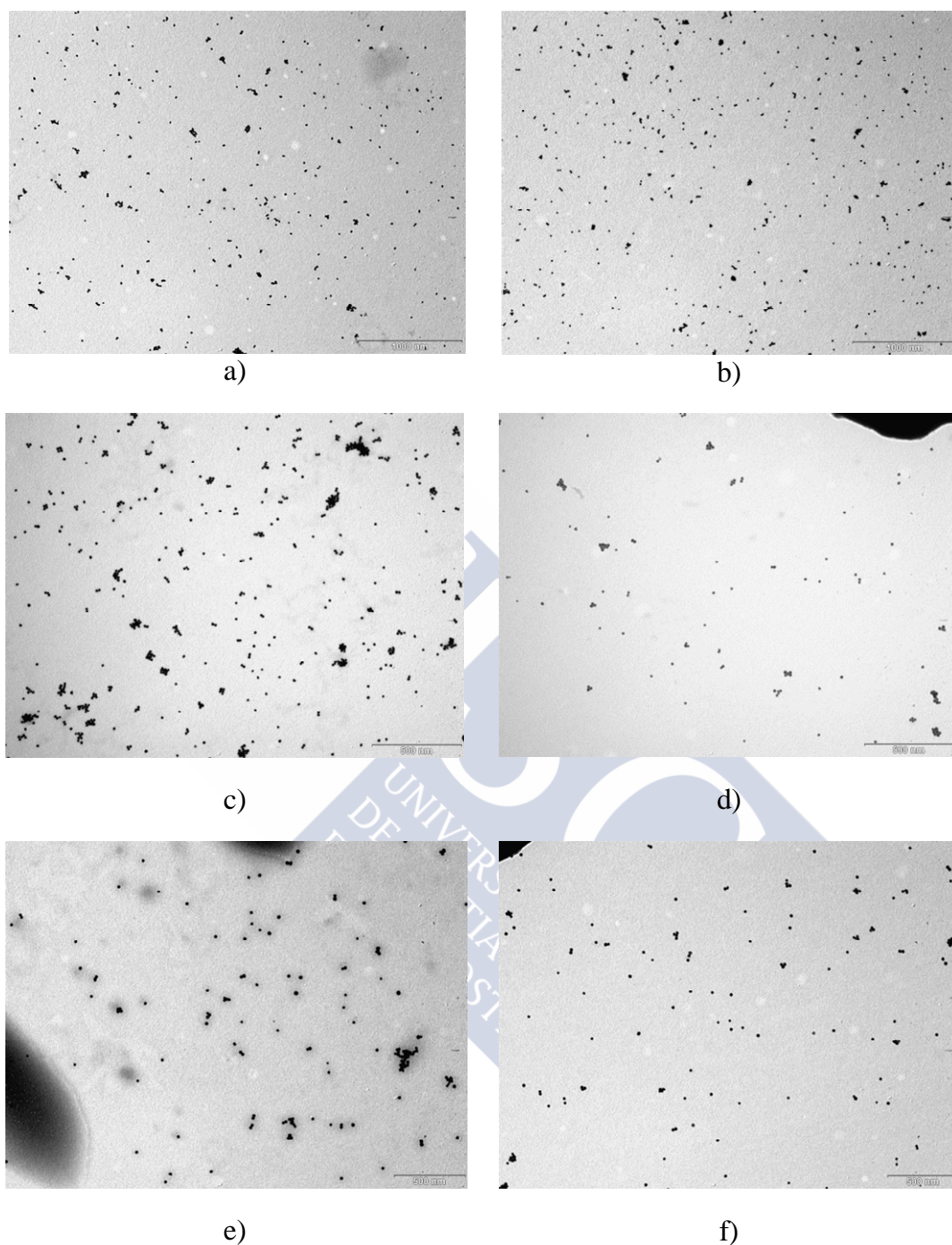


Fig. 4.4. Imágenes TEM para las diferentes muestras elaboradas relación citrato/Au:
a) 2, b) 4, c) 8, d) 16, e) 24, f) 31. Escala a) y b) 1 μm; c), d), e), y f) 0.5 μm.

La Figura 4.3 muestra una clara tendencia general a aumentar el tamaño de las nanopartículas a medida que vamos aumentando la relación citrato/Au, así como su polidispersidad.

El número medio de átomos de oro por nanopartícula puede ser calculado mediante el análisis de las micrografías de TEM, obteniéndose los datos mostrados en la tabla anterior. Usando el software ImageJ, se determina el diámetro medio del núcleo de las partículas (D, nm), asumiendo la forma esférica y una estructura fcc. El número medio de átomos de oro (N) para este tipo de nanoesferas es calculado mediante la ecuación 4.1.

$$N = \frac{\pi \cdot \rho \cdot D^3}{6 \cdot M} \cdot N_A = 30,89602 \cdot D^3 \quad \text{Ec.4.1}$$

Siendo ρ la densidad para el oro fcc (19,3 g/cm³) y M (= 196,967 g/mol) la masa atómica del oro y N_A el número de Avogadro.

La concentración molar de la disolución de nanopartículas, consideradas esféricas, se puede determinar dividiendo el número total de átomos de oro (N_{Total}, equivalente a la cantidad inicial de sal de oro añadida a la disolución de reacción) entre el número medio de átomos de oro por nanoesfera o nanopartícula (N) como muestra la ecuación 4.2.

$$C = \frac{N_{Total}}{N \cdot V \cdot N_A} \quad \text{Ec. 4.2.}$$

Siendo V el volumen de la disolución de la reacción en (litros) y N_A el número de Avogadro. Se asume que la reducción de Au(III) a átomos de Au es del 100%. La concentración de las disoluciones diluidas puede ser calculada a partir de esta concentración inicial de acuerdo con la concentración relativa (Tabla 4.2).

Tabla. 4.2. Concentración molar de nanopartículas calculadas para cada una de las disoluciones obtenidas.

Diámetro medio (nm)	10 ⁴ N: Número medio de átomos de oro por nanopartícula	10 ¹⁰ (C) Concentración molar de nanopartículas en la disolución (mol de nanopartículas Au / L)
13±1	6.8±2	37±9
13±1	6.8±2	36±8
15±1	10±2	23±5
17±2	15±5	14±5
21±3	29±1)	0.7±0.3
20±2	25±7	0.7±0.2

La absorptividad molar (ϵ) en el máximo puede ser determinado mediante la ley de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot b \cdot C$, siendo A = la absorbancia medida para cada concentración y b el camino óptico (1 cm).

Se ha empleado el método de dilución-extracción²³ para la determinación de dichas absorptividades para las concentraciones y relaciones que se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla. 4.3. Absorptividades molares calculadas en cada una de las disoluciones elaboradas en función de las relaciones de reductor empleado.

Citrato/Au = 2. $\lambda = 529\text{nm}$		Citrato/Au = 4. $\lambda = 520\text{nm}$		Citrato/Au = 8. $\lambda = 524\text{nm}$	
10°C_i (Au)	Absorbancia	10°C_i (Au)	Absorbancia	10°C_i (Au)	Absorbancia
3.7	0.958	3.6	0.914	2.3	0.741
3.0	0.766	2.91	0.736	1.8	0.591
2.4	0.615	2.33	0.593	1.44	0.468
1.9	0.493	1.86	0.475	1.16	0.371
1.5	0.395	1.49	0.38	0.924	0.298
1.2	0.315	1.19	0.304	0.739	0.239
Citrato/Au = 16. $\lambda = 527\text{nm}$		Citrato/Au = 24. $\lambda = 525\text{nm}$		Citrato/Au = 31. $\lambda = 522\text{nm}$	
10°C_i (Au)	Absorbancia	10°C_i (Au)	Absorbancia	10°C_i (Au)	Absorbancia
1.4	0.52	0.69	0.718	0.74	0.603
1.13	0.411	0.552	0.564	0.592	0.483
0.906	0.329	0.442	0.456	0.474	0.365
0.724	0.265	0.354	0.363	0.379	0.296
0.58	0.214	0.283	0.291	0.303	0.239
0.464	0.172	0.226	0.236	0.6	0.195

C_i representa la concentración de Au en la disolución final, para la relación de citrato sódico/ Au correspondiente, λ la longitud de onda máxima a la cual han sido medida las absorptividades para cada muestra mediante UV-VIS.

Se han obtenido representaciones similares a las mostradas en la Figura 4.5 para cada una de las diferentes relaciones citrato/Au. Esta figura recoge un ejemplo de espectro de absorción UV-Vis para la muestra CiAuNPs-2, nanopartículas estabilizadas con citrato sódico. También se muestra el ajuste lineal de la curva absorbancia-concentración para la misma muestra, obteniéndose para todas ellas coeficientes de correlación muy próximos a 1, obteniéndose un buen ajuste lineal de los datos experimentales para todas las muestras de nanopartículas. La Tabla 4.4 recoge las absorptividades molares obtenidas.

Otro hecho importante es que el aumento del tamaño del núcleo de las nanopartículas produce un crecimiento del valor de las absorptividades molares según la ecuación ($\ln \epsilon = k \cdot \ln D + a$), por lo que el crecimiento es exponencial (Figura 4.6). El coeficiente de correlación es igual a 0.927. Este hecho está de acuerdo con la teoría de Mie y el estudio recogido por El-Sayed y col.^{5,24}

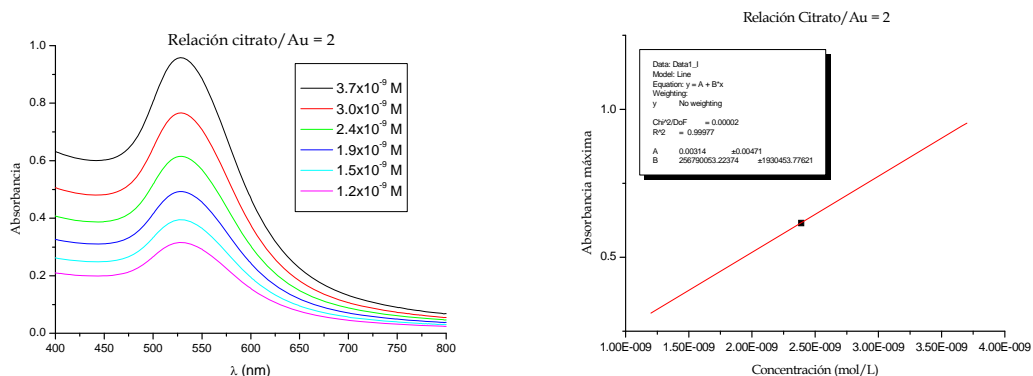


Fig. 4.5. Espectros UV-VIS para la muestra CiAuNPs-2 a las diferentes concentraciones y representación del ajuste lineal de los máximos de la absorbancia.

Tabla. 4.4. Absortividades molares calculadas en cada una de las disoluciones elaboradas en función de las relaciones de reductor empleado, la constante dieléctrica del agua a 25°C es de 78.4.

Muestra	Concentración inicial (10 ⁴ mol Au /L)	Diámetro NPs. D(nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) x10 ⁻⁸
CiAuNPs-2	2.53	13±1	2.56±0.02
CiAuNPs-4	2.47	13±1	2.54±0.004
CiAuNPs-8	2.35	15±1	3.24±0.01
CiAuNPs-16	2.15	17±2	3.67±0.02
CiAuNPs-24	1.98	21±3	10.32±0.04
CiAuNPs-31	1.83	20±2	8.02±0.08

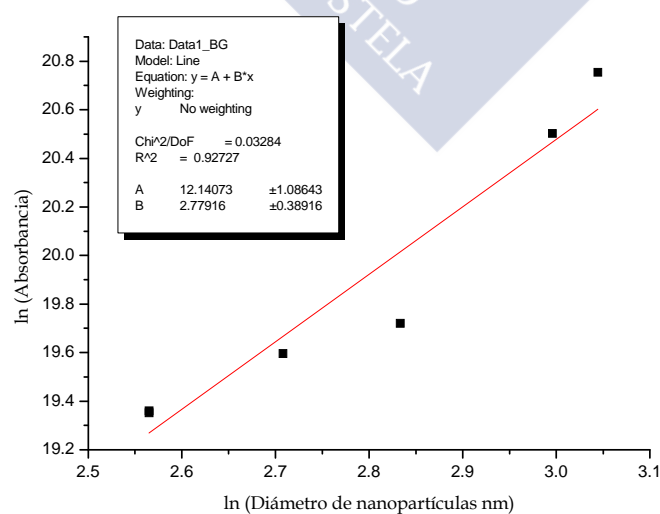


Fig. 4.6. Representación de ln(ϵ) frente al ln(D).

Los valores de $k=2.78$ y $a = 12.4$ obtenidos se aproximan a los publicados por Liu y col. (3.32 y 10.8), así como a los recogidos por El-Sayed y col. (2.75 y 11.7 para los estudios experimentales y 3.36 y 8.1 para los cálculos teóricos).

4.1.6.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU CON BOROHIDRURO DE Na.

En este caso, el agente reductor para la síntesis de nanopartículas de Au en agua es el borohidruro de sodio. Para ello, seguimos el mismo procedimiento descrito anteriormente, añadiendo 1 ml de una disolución acuosa 5 mM de HAuCl_4 sobre 18 ml de agua, obteniendo 19 ml de una disolución de HAuCl_4 (0,26 mM) a temperatura ambiente y mantenida bajo continua agitación. Se añaden los ml correspondientes, gota a gota, de una disolución 19,4 mM de borohidruro de sodio según las cantidades recogidas en la Tabla 4.5, y continuamos agitando hasta que el cambio de color (a púrpura) sea evidente, transcurrida una hora. Se realizaron medidas de UV-VIS y microscopía TEM.

Tabla. 4.5. Disoluciones preparadas, absorbancia máxima obtenida de los espectros UV-VIS, diámetro medio obtenido en función del número de partículas estudiadas y número medio de átomos de oro calculados por nanopartícula de Au sintetizada, así como las estructuras obtenidas en cada caso.

19 ml HAuCl_4 , 0.26 mM	(V) ml disolución Borohidruro sódico 19.4 mM	Relación Borohidruro / Au	Abs máxima (nm)	Diámetro medio (nm)	nº partículas medidas	(N) Número medio de átomos de oro por nanopartícula
BHAuNPs-2	0.5	2	530		Agregación	
BHAuNPs-4	1	4	521	11±2	154	$(4±2) \times 10^4$
BHAuNPs-8	2	8	524	5±1	156	$(3±2) \times 10^3$
BHAuNPs-16	4	16	518		Estructuras vermiformes	
BHAuNPs-24	6	24	521		Estructuras vermiformes	
BHAuNPs-31	8	31	513		Estructuras vermiformes	

La Figura 4.7 recoge algunas imágenes TEM obtenidas para cada una de las muestras que se han elaborado. En comparación con el método anterior es posible obtener nanopartículas de menor tamaño, pero la estabilidad de las mismas es mucho peor que en el caso del citrato, obteniéndose, en los casos extremos de relaciones reductor/sal, estructuras vermiformes o agregados de nanopartículas como observamos en la tabla anterior y en las imágenes TEM.

Siguiendo la misma metodología anterior determinamos la concentración molar de nanopartículas en la disolución. Como anteriormente, asumimos que la reducción de Au(III) a átomos de Au es del 100%. La concentración de las disoluciones diluidas, pueden ser calculadas a partir de esta concentración inicial de acuerdo con la

concentración relativa, para los dos casos en los cuales obtuvimos nanopartículas de tipo esférico (Tabla 4.6).

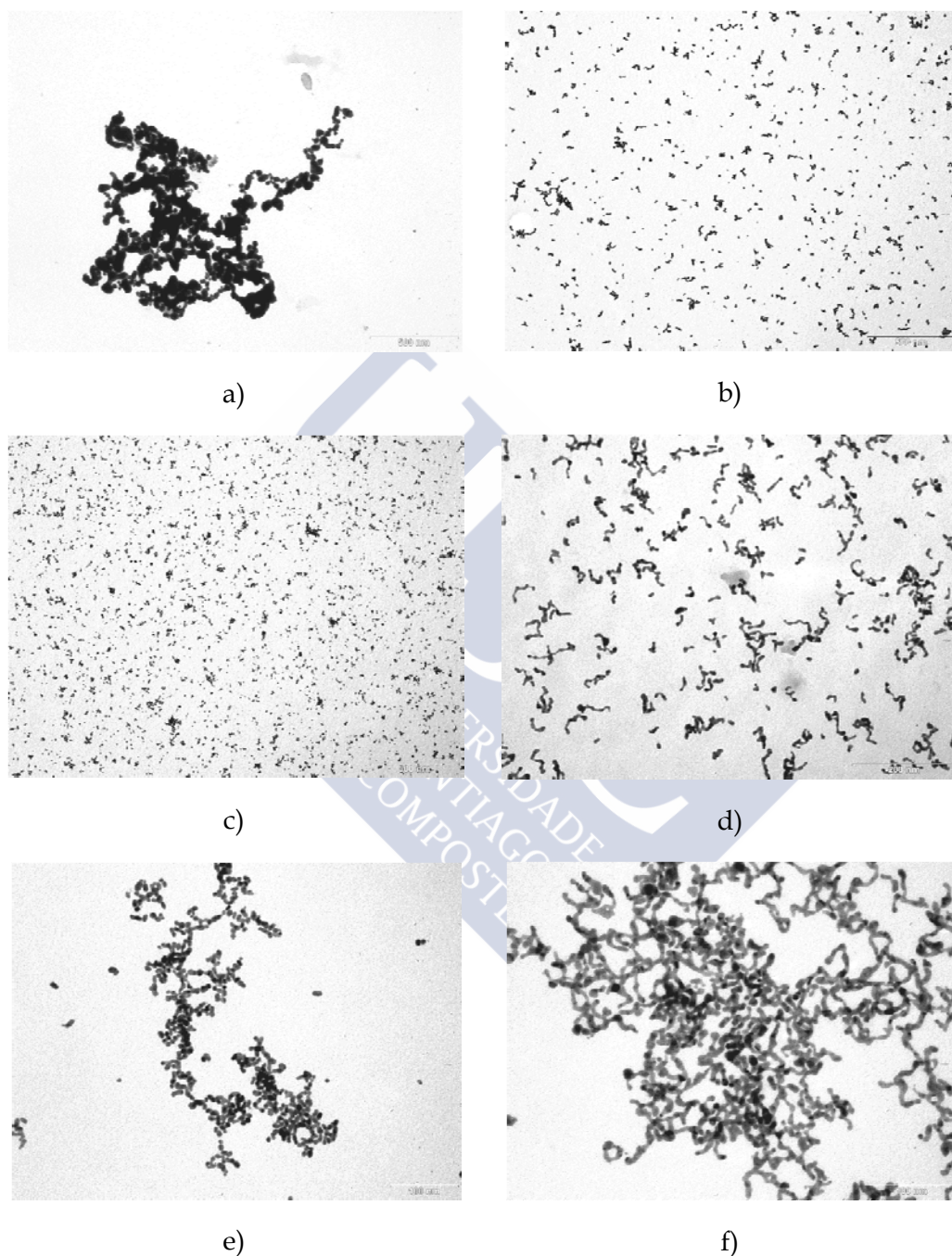


Fig. 4.7. Imágenes TEM para las diferentes muestras elaboradas relación citrato/Au: a) 2, b) 4, c) 8, d) 16, e) 24, f) 31.

Tabla. 4.6. Concentración molar de nanopartículas calculadas a partir de los datos experimentales.

Diámetro medio (nm)	(N) Número medio de átomos de oro por nanopartícula	(C) Concentración molar de nanopartículas en la disolución (mol de nanopartículas Au / L
11±2	(4.1±2)×10 ⁴	(6±3)×10 ⁻⁹
5±1	(3.9±2)×10 ⁴	(6±4)×10 ⁻⁸

Determinaremos la absorptividad molar siguiendo la ley de Lambert-Beer y empleando el método de dilución-extracción. Los datos de absorbanza obtenidos se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla. 4.7. Absorbancias obtenidas en función de las relaciones de reductor,

Borohidruro/Au = 4. $\lambda = 521\text{nm}$		Borohidruro/Au = 8. $\lambda = 524\text{nm}$	
C_i (Au)×10 ⁻⁹	Absorbancia	C_i (Au)×10 ⁸	Absorbancia
6.0	0.6136	6.1	0.6590
4.8	0.4956	4.9	0.5318
3.8	0.3996	3.9	0.4307
3.1	0.3193	3.1	0.3459
2.5	0.2566	2.5	0.2794
2.0	0.2051	2.0	0.2232

C_i representa la concentración de Au en la disolución final; para la relación de borohidruro sódico/Au correspondiente y λ la longitud de onda máxima a la cual han sido medida la absorptividad molar. Se han obtenido representaciones similares a las mostradas en la Figura 4.7 para cada una de las diferentes relaciones borohidruro/Au. En ella se muestra un ejemplo de espectro de absorción UV-Vis para la muestra BHANPs-8, nanopartículas estabilizadas con borohidruro sódico y la representación correspondiente ley de Lambert-Beer. Las absorptividades molares obtenidas se recogen en la Tabla 4.8.

Al igual que sucedía con el citrato observamos que el aumento del tamaño del núcleo de las nanopartículas produce un crecimiento significativo del valor de las absorptividades molares, aunque en este caso, debido a la ausencia de datos intermedios, simplemente podremos analizar dicha tendencia de crecimiento. A pesar de tener sólo dos puntos y no poder verificar la linealidad exigida, hemos estimado los valores de k y a , iguales a 1.7 y 15.0 respectivamente. Estos valores están más alejados de los determinados Liu y col. y por El-Sayed y col. ya citados, así como de los obtenidos mediante el método anterior, esto es, mediante la reducción con citrato. Esto puede ser debido en parte a la escasez de concentraciones a las cuales pudieron ser

determinados los correspondientes valores, pero sobre todo a los procesos de asociación de las nanopartículas detectados mediante TEM.

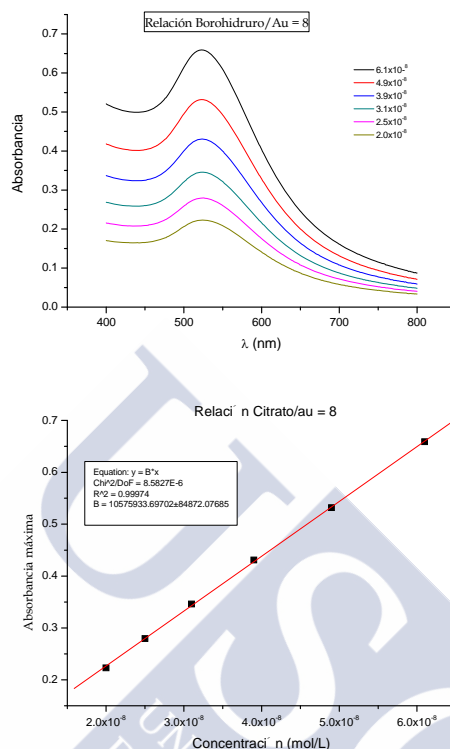


Fig. 4.7. Espectros UV-VIS para la muestra BHAuNPs-8 a las diferentes concentraciones empleando el método de dilución extracción y representación de la absorbancia *vs* concentración.

Tabla. 4.8. Absortividades molares en cada una de las disoluciones elaboradas en función de las relaciones de reductor empleado. La constante dieléctrica del agua a 25°C es de 78.4.

Muestra	Concentración inicial (10 ⁴ mol Au /L)	Diámetro NPs. D(nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)×10 ⁻⁸
BHAuNPs-4	2.47	11±2	1.03±0.004
BHAuNPs-8	2.35	5±1	0.11±0.001

En definitiva, hemos observado pues que empleando citrato obteníamos disoluciones más estables para un rango de concentraciones más amplio. Esto es en parte debido al papel de estabilización de las nanopartículas que proporciona el citrato, mientras que en el caso del borohidruro se consiguen tamaños de nanopartículas más pequeños al ser un mejor agente reductor, actuando a temperatura ambiente, sin necesidad de elevar la temperatura de la disolución, pero el rango de concentraciones y de relaciones reductor/sal es menor. Para los estudios posteriores hemos elegido este último reductor ya que nos ofrece la posibilidad de alcanzar nanopartículas de menor

tamaño y para aumentar la estabilidad del sistema trataremos de emplear alguna de las moléculas que sintetizaremos a continuación.

4.1.7. DERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO CON GRUPOS TIOL

4.1.7.1. DÍMERO DE BIS(MERCATOETILAMINA)BIS(COLATOSÓDICO) DE AEDT

Siguiendo la ruta sintética que se describe en el Apéndice A de Síntesis, hemos sido capaces de sintetizar el dímero de ácido cólico con un puente de unión de AEDT modificado con mercaptoetilamina para añadir dos grupos tioles que nos permitan la interacción con las nanopartículas de Au. La molécula sintetizada en su forma ácida, se muestra en la Figura 4.8.

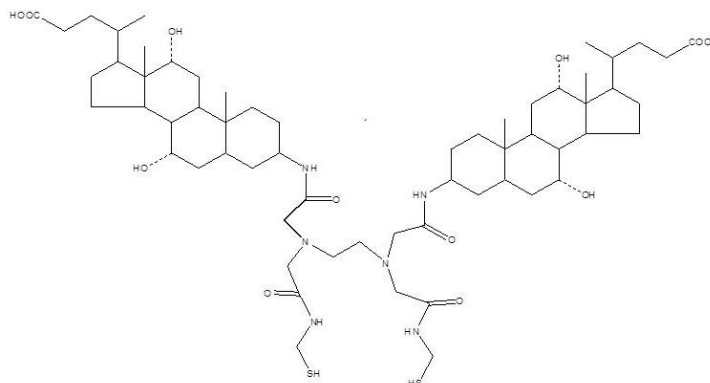


Fig. 4.8. Dímero de Ácido Cólico con puente AEDT y mercaptoetilamina con dos grupos tioles.

Con este dímero se ha realizado un estudio de gelificación típico en diferentes disolventes orgánicos en su forma ácida. No se han obtenidos cristales del mismo. Se ha observado que presenta solubilidad en disolventes como: 1-pentanol, 2-butanol, 2-propanol, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido y parcialmente en 1,4-dioxano. En el resto de disolventes orgánicos ensayados, la solubilidad fue escasa o inexistente en las condiciones de experimentación desarrolladas y que ya fueron descritas en el capítulo 3.

La incorporación de los grupos tiol a la molécula permite tener dos grupos muy activos para la estabilización de las nanopartículas de Au. También presenta otra serie de grupos que pueden también participar en dichos procesos como son los grupos hidroxilo del núcleo esteroideo que se han mantenido intactos en el proceso sintético, así como los dos grupos carboxílicos terminales, que permiten que sea una molécula con una buena solubilidad en agua aunque dependiente del pH de la disolución. Debemos destacar que la presencia de dos grupos tiol en la molécula también presenta la posibilidad de formar puentes disulfuros.

4.1.7.2. SÍNTESIS DEL COMPUESTO: [3B, 5A, 7A, 12A]-3[(TIOGLICOIL)-AMINO]-7-12-DIHIIDROXICOLAN-24-OATO DE SODIO, TioGlyCNa.

Hemos sido capaces de sintetizar el glicolato de ácido cólico con un grupo tiol, que permite la interacción con las nanopartículas de Au. La molécula sintetizada se muestra en la Figura 4.9. Ver apéndice A de síntesis.

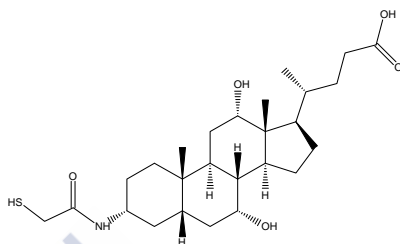


Fig. 4.9. Esquema de la molécula TioGlyCA sintetizada.

4.1.7.3. SÍNTESIS DEL COMPUESTO: [3B, 5A, 7A, 12A]-3[(MERCAPTOPROPANOIL)-AMINO]-7-12-DIHIIDROXICOLAN-24-OATO DE SODIO, MerProCNa.

Siguiendo la misma ruta sintética anterior, hemos sido capaces de sintetizar el mercaptopropanoato de ácido cólico con un grupo tiol que permite la interacción con las nanopartículas de Au. La molécula sintetizada se muestra en la Figura 4.10.

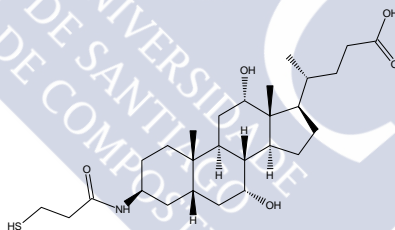


Fig. 4.10. Esquema de la molécula TioGlyCA sintetizada realizada mediante Chemdraw.

4.1.7.4. SÍNTESIS DEL COMPUESTO: [3B, 5A, 7A, 12A]-3[(N-(TERT-BUTOXICARBONIL)-S-TRITIL-L-CISTEINIL)-AMINO]-7-12-DIHIIDROXICOLAN-24-OATO DE SODIO, BOC-Cys-TrtCNa.

Siguiendo la misma ruta sintética de los compuestos anteriores, hemos sido capaces de sintetizar la molécula protegida. Se ha conseguido la resolución cristalina del producto al salir de la columna cromatográfica, durante la fase de desprotección del grupo BOC y trifenilo así como del éster de metilo de la sal biliar. Se han empleado diferentes rutas pero hemos tenido problemas con la aparición de subproductos que no nos han permitido la obtención de un producto de buena calidad (Figura 4.11).

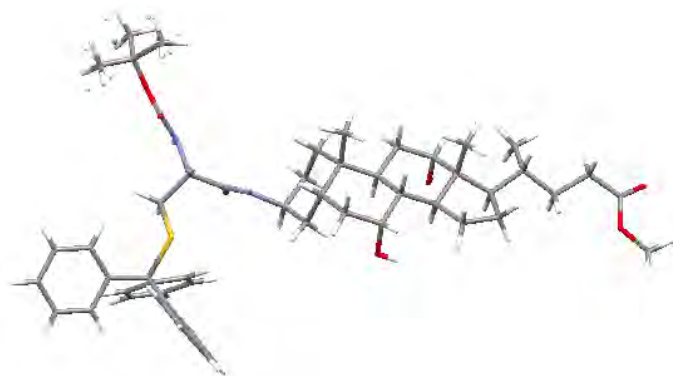


Fig. 4.11. Imagen del cristal obtenido para el BOC-Cys-TrtCOOMe.

4.1.8. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU CON LOS DERIVADOS DE SAL BILIAR

Una vez hemos obtenido los compuestos deseados, tratamos de sintetizar las nanopartículas de Au y estabilizarlas mediante el recubrimiento con las sales biliares modificadas.

Para la síntesis y estabilización de las nanopartículas de Au, como hemos comentado anteriormente, emplearemos como reductor el NaBH_4 , con la relación sal de Au/reductor intermedia entre aquellas que nos han proporcionado mejores resultados en el primer apartado. Para la estabilización de dichas nanopartículas se ha probado con diferentes relaciones molares de sal de Au/dímero de sal biliar, siendo las relaciones probadas las siguientes: 1:1 y 2:1. Mediante TEM se estudiaron las partículas obtenidas.

1- Nanopartículas de Au, con relación molar 1:1 sal de Au/dímero.

Para dicha síntesis hemos cogido 1 ml de una disolución acuosa de 5 mM de HAuCl_4 sobre 18 ml de Agua mili-Q, obteniendo 19 ml de una disolución acuosa de HAuCl_4 (0,26 mM). Añadimos 5,96 mg de dímero en su forma de sal sódica, con una relación molar sal de Au/ditiole de 1:1 y se deja aprox. 1 h en agitación observando un cambio en la coloración de amarillo a lila (rosa claro), indicativo de que el dímero ya ha actuado en parte como reductor. Posteriormente se añaden 1,5 ml NaBH_4 (19,4 mM) en MeOH. Se deja en agitación durante 2 h más y filtramos a través de un filtro de 45 μm .

La Figura 4.12 recoge algunas imágenes obtenidas mediante microscopía TEM. Se observa que el tamaño obtenido es muy similar al de nanopartículas cuando usábamos el citrato sódico como agente reductor, hecho atribuible a que, al igual que el citrato, el dímero actúa como reductor y estabilizador de las

nanopartículas de Au generadas. Queda evidente que el dímero biliar interacciona con la sal de Au reduciendo y estabilizando dichas nanopartículas.

2- Nanopartículas de Au, con relación molar 2:1 de sal de Au/dímero.

Siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito, se adicionan ahora 2,98 mg del dímero (en forma de sal) en agua. Se observa que, en este caso, antes de añadir el NaBH_4 no ha habido cambio de coloración, por lo que se supone que no existe suficiente cantidad de dímero para generar la reducción de la sal de oro. Una vez adicionado el borohidruro se deja en agitación durante 2 h más y filtramos a través de un filtro de $45 \mu\text{m}$. La disolución obtenida se estudia mediante micrografía TEM obteniendo las imágenes que se muestran en la Figura 4.13.

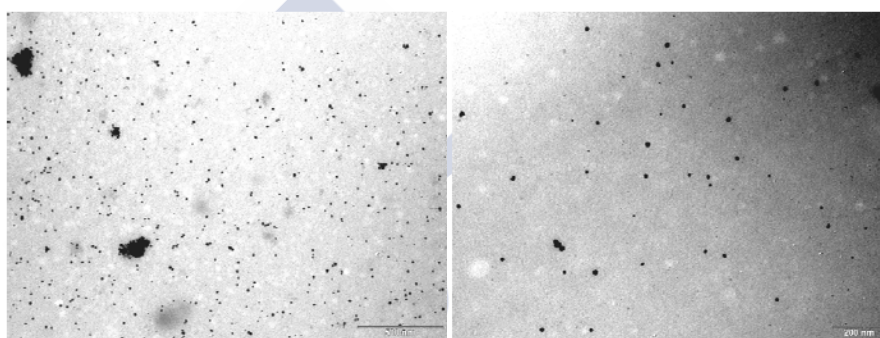


Fig. 4.12. Nanopartículas estabilizadas con Dímero de sal biliar con relación molar 1:1. Diámetro medio 14 ± 2 nm. (N=165 nanopartículas analizadas, diámetros máximo y mínimo: 21nm y 9 nm).

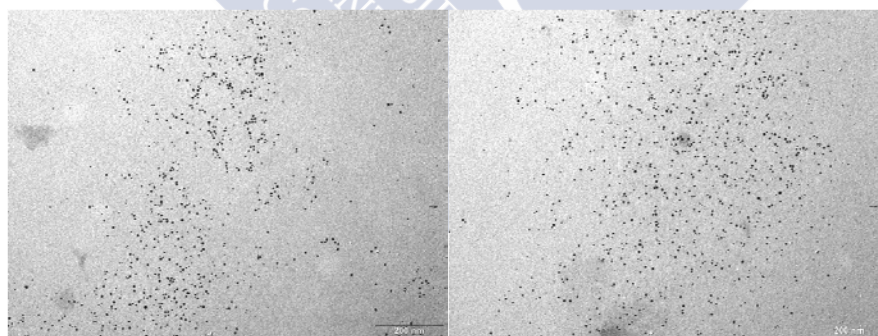


Fig. 4.13. Nanopartículas estabilizadas con Dímero de sal biliar con relación molar 2:1, diámetro medio 6 ± 1 nm (N=164 nanopartículas analizadas, diámetro máximo 10 nm y mínimos de 4 nm).

En vista a los resultados hasta aquí comentados, se decidió realizar un ensayo sin la adición de reductor, para lo cual se siguieron los procedimientos anteriormente descritos y se obtuvieron imágenes TEM.

3- Manteniendo una relación molar 2:1 de sal de Au/dímero, se mantiene la disolución en agitación durante tres horas sin añadir ningún reductor. Las

imágenes muestran que existe bastante agregación y una mayor heterogeneidad (Figura 4.14). Sin filtrar la disolución presenta una coloración amarilla.

- 4- Manteniendo una relación molar 4:1 de sal de Au/dímero, hemos obtenido una disolución de color violáceo muy claro, con un espectro de absorción con una banda con un máximo en 612 nm, indicativo de que la reducción no se ha producido en la dirección que deseamos con tamaños de nanopartículas relativamente más grandes y más polidispersos, en torno a los 10 nm.

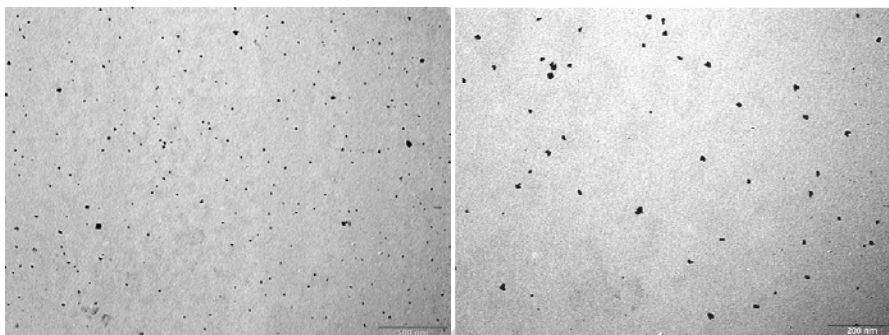


Fig. 4.14. Nanopartículas estabilizadas con Dímero de sal biliar con relación molar 2:1, diámetro medio 9 ± 1 nm ($N=121$, dimensiones máxima y mínima: 12 y 6 nm).

- 5- A partir de una disolución preparada como lo indicado en el punto anterior, se obtuvieron imágenes TEM de las disoluciones pero sin filtrarlas para tratar de determinar la influencia del filtrado en la disolución. Los resultados obtenidos fueron similares a los del punto 3, por lo que podemos concluir que el filtrado no influye en exceso en el tamaño y distribución de nanopartículas obtenidas (Figura 4.15).

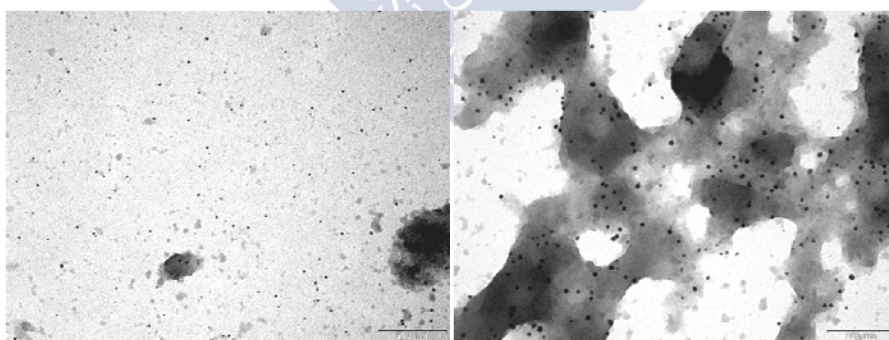


Fig. 4.15. Nanopartículas estabilizadas con Dímero de sal biliar con relación molar 2:1, diámetro medio 7 ± 1 nm ($N=201$, dimensiones máxima y mínima: 11 y 4 nm).

- 6- Siguiendo los procedimientos descritos pero con una mayor cantidad de reductor, añadiendo 2 ml NaBH_4 (19,4 mM) en MeOH, en la que se debería de obtener el tamaño de partícula mínimo, se observa que la polidispersidad de la

disolución ha aumentado ligeramente así como el tamaño de partícula (Figura 4.16).

Hemos visto que la sal biliar interactúa con la sal de Au para ayudar en la reducción de la misma para la obtención de las nanopartículas y que el dímero biliar mediante sus grupos tioles, ayuda a proporcionar una mayor estabilidad a las nanopartículas al unirse a su superficie.

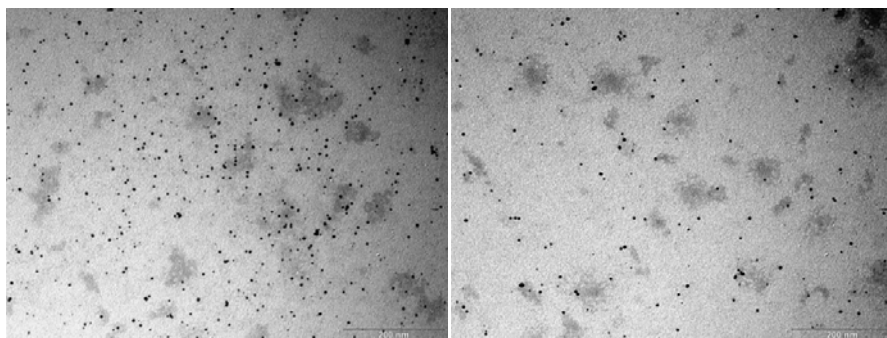


Fig. 4.16. Nanopartículas estabilizadas con Dímero de sal biliar con relación molar 2:1, diámetro medio 7 ± 2 nm ($N=246$, dimensiones máxima y mínima: 13 y 2 nm).

Con respecto a la estabilidad de las partículas con el tiempo, podemos indicar que se obtuvieron imágenes TEM de las disoluciones más representativas con sal biliar transcurridos 4 meses desde su preparación y no se observaron cambios significativos en las muestras.

La Figura 4.17 muestra el proceso cinético de formación de las nanopartículas, habiendo preparado las disoluciones como ya se ha indicado en presencia de sal de Au, borohidruro sódico y ácido mercaptopropanoico. Se observa que a medida que avanza la reacción, disminuye la banda asociada a los grupos C-SH, así como la banda asociada a la sal de oro, Au^{+3} . A la disminución de las bandas anteriores, hay que asociarle la aparición de la banda plasmónica asociada a la formación de las nanopartículas de Au (directamente asociada a la coloración de la disolución), que variará según el tamaño y forma de las mismas.

Se ha realizado una comparativa entre los espectros de UV-VIS de las muestras de nanopartículas obtenidas para una muestra de TioGlyCNa con relación molar Au:TioGlyCNa, 2:1, Au:MerProCNa 2:1 y Au:DimCNa 2:1 y 1:1. Los espectros de absorción vis-UV se muestran en la Figura 4.18.

Para las muestras probadas, el menor tamaño se ha obtenido cuando se emplea el TioGlyCNa como protector, con un tamaño de partículas próximo a los 3 nm, mientras que para el MerProCNa, el tamaño obtenido es muy similar al obtenido cuando se empleaba sólo el ácido mercaptopropanoico como agente protector. Al emplear el

ácido tioglicólico, las muestras obtenidas presentaban un tamaño mayor, próximo a 6 nm. Por último, la banda en 562 nm obtenida en presencia del dímero, confirma el tamaño de nanopartícula estabilizada obtenida mediante TEM (6 nm).

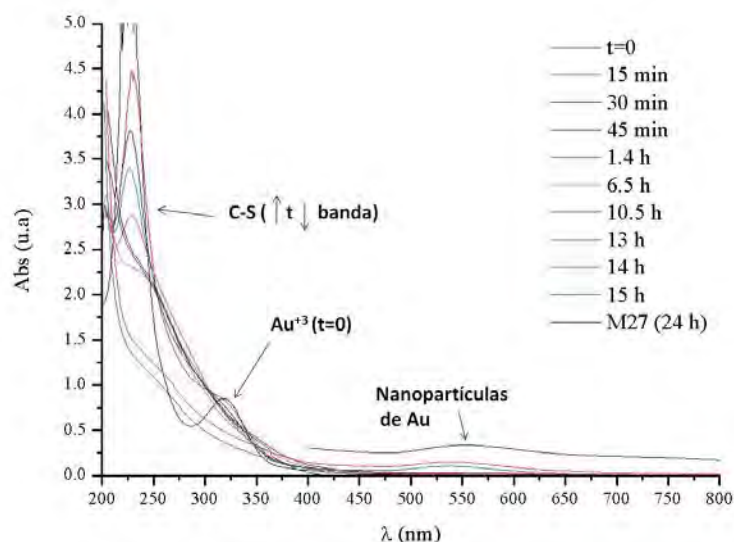


Fig. 4.17. Seguimiento de la formación de nanopartículas mediante espectroscopia UV-VIS, para una muestra de sal de Au, borohidruro sódico y ácido mercaptopropanoico seguida durante 24 h.

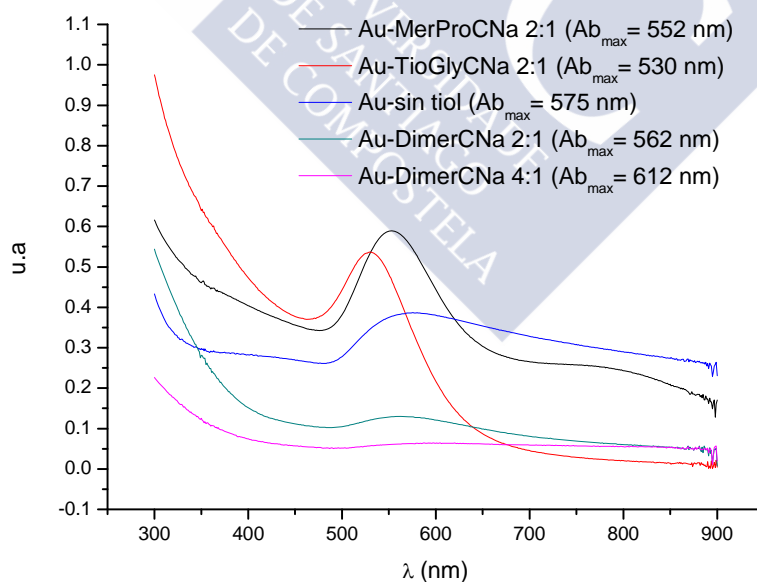


Fig. 4.18. Espectros de absorción vis-UV y longitud de onda para el valor máximo de absorbancia, para disoluciones de Nanopartículas de Au con los derivados de ácido colico sintetizados, con las siguientes relaciones molares Au:TioGlyCNa, 2:1, Au:MerProCNa 2:1 y Au:DimCNa 2:1 y 1:1.

4.2 NANOCOMPOSITES EPOXI CON NANOPARTÍCULAS DE ORO.

Durante la elaboración de este trabajo exploratorio, se establecieron los siguientes objetivos de partida:

- Optimización del método de curado convencional (en estufa) del sistema Epoxi/endurecedor (BADGE/m-XDA) mediante el empleo del diseño de experimentos.
- Estudio de la síntesis de nanopartículas de oro, con diferentes grupos de protección.
- Fabricación de Nanocomposites (combinación de las resinas epoxi/endurecedor y nanopartículas de Oro como agentes de relleno), así como su estudio cinético.

Como prepolímero epoxídico se eligió el BADGE(n=0) (Figura 4.19), por ser un compuesto ampliamente utilizado (construcción, electrónica, aeronáutica, adhesivos...) sobre el que se han realizado numerosos estudios. Además, es un compuesto muy versátil y es objetivo de otra de las líneas de investigación del grupo.

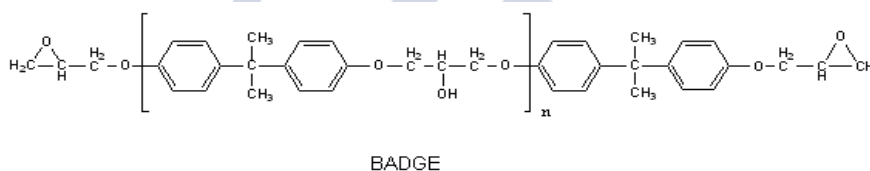


Figura 4.19. Ejemplo de resina derivada del BADGE(n=0): diglicil éter de Bisfenol A.

Como agente reticulante se ha elegido también una amina alifática con un grupo fenilo como es la m-XDA o metaxililenediamina. El resultado de la reacción es un polímero termoestable.

Para producir el curado y originar la red tridimensional con un grado de entrecruzamiento adecuado necesitamos un aporte calorífico a la reacción, siendo el tiempo y la temperatura las variables que fundamentalmente afectan al proceso de curado. La variación de estos factores permite obtener redes más o menos entrecruzadas, con propiedades diferentes. Para el estudio del efecto de estas variables se recurrió al diseño estadístico de experimentos, por lo que como *primer paso se investigó la optimización de las mismas*.

Una vez encontradas las condiciones óptimas de curado, y conocida la *síntesis de nanopartículas de Au* mediante el empleo de diferentes agentes estabilizadores, se ha intentado obtener el tamaño de nanopartícula más pequeño y más estable, para su posterior incorporación a la red polimérica.

Por último tratamos la *preparación y curado de los nanocomposites* y el estudio cinético del proceso de curado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) aplicando diferentes modelos cinéticos.

4.2.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CURADO

Para la optimización del método de curado se ha recurrido al diseño de experimentos que consiste en la estimación de los efectos que tienen diferentes variables simultáneamente y que afectan directamente al sistema. Esto permitió modificar intencionadamente las variables para obtener los cambios deseados en el producto final. Como ya hemos adelantado, las variables que hay que tener en cuenta son la temperatura y tiempo de precurado y la temperatura y tiempo de curado.

Podemos definir un diseño factorial completo²⁵ como aquel en el que medimos todas las condiciones posibles de los niveles elegidos de los factores o variables del sistema. Ello representa la antítesis de lo que sería la aproximación clásica en donde la respuesta se investiga para cada variable, mientras que el resto de las variables se mantienen constantes. En el diseño factorial encontraremos dos razones de peso para su utilización en aquellos experimentos en los que la respuesta depende del nivel o valor de las variables de estudio:

- i) El diseño factorial ayuda a detectar y estimar cualquier interacción que el estudio de una variable independiente no puede hacer.
- ii) Si los efectos de las variables son aditivos, el diseño factorial requiere menos medidas experimentales que la aproximación clásica para proporcionar la misma precisión.

El primer paso hacia la determinación de los factores y las interacciones que afectan de manera importante a la respuesta se podrá hacer utilizando un experimento factorial en el que cada variable tenga dos niveles, conocidos habitualmente como *alto y bajo*, *mínimo y máximo*, *+ o -*, etc. La elección exacta de estos niveles se determina principalmente por la experiencia y el conocimiento del grupo y las restricciones físicas del sistema. Los niveles o valores de las variables de los que depende la respuesta de nuestro sistema, que será el valor de la temperatura de transición vítrea, T_g , de la resina epoxi sintetizada, se elegirán con vistas a maximizar la respuesta, mediante la optimización de los niveles de factor óptimos.

Se ha realizado un diseño factorial en 4 bloques, 2^4 , para estudiar los efectos de las cuatro variables mediante 16 experimentos. El diseño fue ejecutado en 4 bloques en días diferentes para evitar los posibles efectos de esta variable. El orden de los experimentos ha sido aleatorio, lo que lo protegerá contra los efectos de variables ocultas. Para el diseño se hizo uso del programa Statgraphics Plus 5.1 para Windows.

Las variables o factores experimentales definidos son: temperatura de precurado (*Temp. Prec.*), el tiempo de pre-curado (*t. Prec.*), temperatura de curado (*Temp. Cur.*) y tiempo de curado (*t Cur.*). Como hemos adelantado, la variable de respuesta comentado será la temperatura de transición vítrea, T_g , obtenida mediante *DSC*, y/o la

T_g máxima calculada a partir de la conversión alcanzada obtenida del análisis IR de las muestras de resina curada. Los extremos o niveles máximo y mínimo escogidos para las diferentes variables fueron los siguientes: Temp. Prec. 25 °C y 45 °C, t Prec. 12 h y 48 h, Temp. Cur. 90 °C y 130 °C y t Cur. 0.5h y 3 h, los cuales fueron escogidos en función de la experiencia del grupo en la elaboración y manejo de este tipo de sistemas.

El valor de T_g (DSC) 123°C más alto fue obtenido para Temp. Prec. 45 °C, t Prec. 48 h, Temp. Cur. 130 °C y t Cur. 0.5h (Figura 4.20). Por otro lado el valor más bajo de reticulación con una T_g (DSC) de 91°C se obtuvo para las condiciones de Temp. Prec. 45 °C, t Prec. 12 h, Temp. Cur. 130 °C y t Cur. 0.5h.

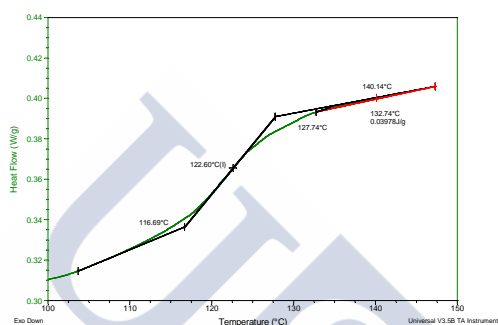


Figura 4.20. Termograma para la determinación de la T_g , mediante la medida en el punto de inflexión de la curva.

4.2.2 OPTIMIZACIÓN SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE AU.

Para la síntesis de nanopartículas de Au, se recurrió al borohidruro de sodio con una relación molar agente reductor/sal de Au igual a 6, que corresponde al menor tamaño de partícula.

Como agentes protectores/estabilizantes de las nanopartículas se emplearon el ácido mercaptopropanoico, el ácido tioglicólico, la 2-mercaptoetilamina y el 2-tiolpropano. Se ha seguido la reacción mediante UV-VIS, comprobando que el ácido mercaptopropanoico era el compuesto con el que conseguíamos el menor tamaño de partícula 4.3 ± 0.9 nm (M27; véase la Figura 4.21), mayor homogeneidad y mayor estabilidad en el tiempo, para la relación reductor/sal de oro indicada. El máximo en el espectro de absorbancia correspondió a 552 nm.

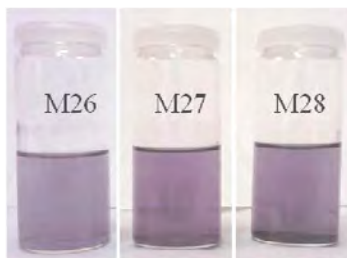


Figura 4.21. Nanopartículas obtenidas con diferentes relaciones molares borohidruro/Au M26=4, M27=6 y M28=8 con ácido mercaptopropanoico como agente protector.

4.2.3 FABRICACIÓN DEL NANOCOMPOSITE

Una vez que hemos estudiado el comportamiento de los diferentes sistemas por separado, se ha mezclado la resina epoxi, con la disolución de nanopartícula optimizada en el punto anterior, para su curado en las condiciones que alcanzábamos una mayor Tg. Los que se resumen en la Tabla 4.8. Los mejores resultados han sido obtenidos siguiendo el siguiente procedimiento: durante 1 hora aproximadamente se mantienen en agitación 2 g de BADGE n=0 con 2 ml (1:1) y 4 ml (1:2) de disolución M27 a 70 °C para que se evapore todo el metanol. Transcurrido este período de tiempo, se redujo la temperatura a 50 °C y se añadió el agente entrecruzante (0.4 ml de m-XDA), en continua agitación. Por último se introdujo la resina en los moldes cilíndricos de vidrio para su posterior ciclo de curado de 48 h a 45 °C y ½ h a 130 °C. La resina curada obtenida mantuvo el aspecto de la disolución original de la nanopartícula y se realizó su estudio mediante DSC y espectroscopia IR. Determinamos de los datos experimentales la temperatura de transición vítrea del sistema y la conversión mediante DSC.

Tabla 4.8. Nanocomposites de resina epoxi (DGEBA/m-XDA): referencia y con diferentes concentraciones de nanopartículas de Au.

Temp. Prec. (°C)	t. Prec. (h)	Temp Cur. (°C)	t. Cur. (h)	Tg (°C)
40	30	120	10	122 (blanco sin nanopartícula)
				122 (relación 1:1)
				118 (relación 1:2)

Se observa que al duplicar la concentración de disolución de nanopartícula en la resina, la Tg desciende ligeramente (de 121 °C a 118 °C), y que cuando adicionamos sólo 2 ml de disolución de nanopartículas M27 la Tg no varía.

4.2.4 AJUSTE CINÉTICO

Una vez que hemos obtenido el sistema deseado, a partir de experimentos DSC isotérmicos y dinámicos, calculamos la conversión del sistema frente al tiempo, así como su variación, permitiendo la estimación de los parámetros cinéticos de la reacción de curado.

Al aplicar el modelo semiempírico propuesto por Chern and Polheim²⁶, ecuación de orden n, Ecuación 4.3, hemos observado que el modelo no se ajusta a los datos experimentales obtenidos.

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_1 \cdot (1 - \alpha)^n \quad \text{Ec. 4.3}$$

Siendo n, el orden de reacción; α , la conversión y k_1 constante de reacción de orden n.

Se ha evaluado el modelo cinético de Sourour y Kamal²⁷ que mezcla los modelos de reacción de orden n y el modelo autocatalítico en una única ecuación, habiendo observado que este modelo es adecuado y se ajusta bien a los datos experimentales, resultando un orden de reacción global de 2. Ecuación 4.4.

$$\frac{d\alpha}{dt} = (k_1 + k_2 \cdot \alpha^m) \cdot (1 - \alpha)^n \quad \text{Ec. 4.4}$$

Siendo k_2 , la constante de reacción del modelo cinético autocatalítico; m, orden de reacción para las reacciones autocatalíticas.

Del análisis se obtuvieron las constantes de las dos reacciones. Evaluando un modelo puramente autocatalítico^{26,28-29}, ecuación 4.5, obtenemos también un orden de reacción de 2 y un ajuste adecuado de los datos experimentales, cuando no empleábamos nanopartículas de Au.

$$\frac{d\alpha}{dt} = (k_2 \cdot \alpha^m) \cdot (1 - \alpha)^n \quad \text{Ec. 4.5}$$

También se ha empleado un modelo semiempírico propuesto por Chern y Polheim²⁶ que tiene en cuenta el volumen libre, ecuaciones 4.6. El método ha sido utilizado por numerosos autores²⁸⁻³² para estudiar la velocidad de reacción controlada por la difusión.

$$F(\alpha) = \frac{1}{1+e^{[A_1 \cdot (\alpha - \alpha_c)]}} \quad \text{y} \quad \frac{d\alpha}{dt} = (k_1 + k_2 \cdot \alpha^m) \cdot (1 - \alpha)^n \cdot F(\alpha) \quad \text{Ec. 4.6}$$

$$\text{Considerando } F(\alpha) = \frac{\left(\frac{d\alpha}{dt}\right)_{\text{teórico}}}{\left(\frac{d\alpha}{dt}\right)_{\text{experimental}}}$$

Obteniéndose los valores de conversión crítica $\alpha_c = 0.99$ y $A_1 = 104$ para un ajuste con un $R^2 = 0.97$

Por último si se realiza un ajuste global teniendo en cuenta todos los factores el orden de reacción global (m+n) obtenido sigue siendo de 2. Ecuación 4.7.

$$\frac{d\alpha}{dt} = (k_1 + k_2 \cdot \alpha^m) \cdot (1 - \alpha)^n \cdot \frac{1}{1+e^{[A_1 \cdot (\alpha - \alpha_c)]}} \quad \text{Ec. 4.7}$$

Como resultado de aplicar todos los modelos a la resina con nanopartícula en su interior, hemos obtenido que al aumentar la cantidad de nanopartículas se modifica el modelo cinético que controla el mecanismo de reacción. Además se observa que la cinética química controla todo el mecanismo de reacción, no apareciendo en todo el proceso el control por difusión. Obteniéndose un orden de reacción global de 1, en presencia de nanopartícula.

4.3 ESTUDIO DE LOS SISTEMAS BADGE(N=0) / M-XDA Y BADGE(N=0)/ M-XDA / NANOPARTÍCULAS DE ORO MEDIANTE ANÁLISIS DIELECTRICO.

A la hora de proyectar este trabajo, habíamos establecido los siguientes objetivos de partida:

- Puesta a punto del Analizador Dieléctrico, calibración y funcionamiento.
- Estudio de las propiedades dieléctricas (permitividad, factor de pérdida y conductividad iónica), para el material nanocompuesto formado por el sistema BADGE n=0/m-XDA/Nanopartícula de Au.
- Comparativa entre un curado rápido y uno convencional o lento.
- Estudio del efecto de la variación de la frecuencia y temperatura en las propiedades del material curado.

4.3.1 ANÁLISIS DIELECTRICO.

El Análisis Dieléctrico (DEA) mide los cambios en las propiedades de un polímero como respuesta a la aplicación de un campo eléctrico periódico (variable con el tiempo). Complementa perfectamente las otras técnicas de análisis térmico identificando las transiciones en las propiedades eléctricas del material.³³ Esta técnica es capaz de detectar propiedades dieléctricas (permitividad, factor de pérdida y conductividad iónica) y fenómenos tales como la transición vítrea, transiciones secundarias, fenómenos reológicos como mínimos de viscosidad, polimerización y entrecruzamiento y relajaciones dipolares.³⁴

Frente a las demás técnicas, una de sus principales ventajas es que cubre un rango de frecuencias de trabajo mucho más amplio y, sobre todo, cabe destacar su extrema sensibilidad a los pequeños cambios que se producen en las propiedades de los materiales, transiciones que a veces no se pueden detectar con otras técnicas.³⁵ En especial, el DEA complementa muy bien el Análisis Dinamomecánico (DMA) en la caracterización de los movimientos internos en los polímeros. Ambos tipos de experimentos son capaces de detectar relajaciones viscoelásticas en las que se observa normalmente la misma relación entre la frecuencia y la temperatura. Sin embargo, es necesario recalcar que solamente las relajaciones que implican reorientaciones de los dipolos bajo un campo oscilante pueden ser observadas mediante el análisis dieléctrico. El análisis dieléctrico es una de las pocas técnicas capaces de seguir la transformación completa de un polímero termoestable, desde el paso de una resina de alto peso molecular a un sólido (red de peso molecular infinito).³⁴

Una de las maneras de realizar las medidas dieléctricas consiste en situar una muestra del material que va a ser estudiado entre dos electrodos de oro, entre los cuales se aplica un voltaje dependiente del tiempo, y se mide la corriente resultante. El

voltaje aplicado produce un campo eléctrico en la muestra y, en respuesta a dicho voltaje, la muestra puede polarizarse eléctricamente e incluso conducir cargas libres desde un electrodo al otro. La relación entre el voltaje aplicado y la corriente producida es lo que se conoce como admitancia.

El campo creado al aplicar un voltaje sinusoidal polariza la muestra, produciendo una oscilación también sinusoidal de los dipolos moleculares con la misma frecuencia que éste, pero desfasada un ángulo θ . El ángulo de desfase se mide comparando el voltaje aplicado con la corriente medida.³⁶ La interpretación de las medidas dieléctricas supone que el comportamiento de la muestra puede ser representado por una admitancia lineal e independiente del tiempo.³⁷ Si una muestra tiene un comportamiento lineal, la intensidad depende proporcionalmente de la magnitud del voltaje aplicado. Todas las experiencias dieléctricas dejan de ser fiables para campos eléctricos del orden de 10^6 V/cm.

Para campos eléctricos cuyos valores están 5 o 6 órdenes de magnitud por debajo de dicho valor. Coln y Senturia³⁸ han demostrado que no existen efectos no lineales para resinas epoxi en estado líquido antes del proceso de curado. Nuestras medidas se han realizado con valores del campo eléctrico de pocos voltios y por lo tanto podemos suponer que el comportamiento de la muestra puede considerarse lineal.³⁷

Sin embargo, para la condición de invarianza temporal, debemos decir que, estrictamente hablando, la admitancia medida es dependiente del tiempo. A pesar de ello, los modelos usados suponen la no dependencia temporal. La justificación de ello radica en el hecho de que las propiedades de la muestra no varían significativamente durante el intervalo requerido para realizar una única medida.

La admitancia está directamente relacionada con dos características fundamentales de un material - conductancia ($1/R$) y capacitancia (C) - en función del tiempo, temperatura y frecuencia. La naturaleza capacitiva de un material está relacionada con la habilidad de éste para almacenar energía eléctrica y la naturaleza conductiva es la habilidad para transferir carga. Además, estas propiedades eléctricas, de gran importancia en sí mismas, están directamente relacionadas con la actividad molecular (cinética química, reología y movilidad molecular). La capacitancia y la conductancia se calculan utilizando las ecuaciones 4.8 y 4.9:

$$C(F) = \frac{I_{medida}}{V_{aplicada}} \frac{\text{sen } \theta}{2\pi f} \quad \text{Ec.4.8}$$

$$1/R(m - Ohm) = \frac{I_{medida}}{V_{aplicada}} \cos \theta \quad \text{Ec.4.9}$$

siendo R = resistencia (Ω), I = corriente (A), V = tensión (V), f = frecuencia aplicada (Hz), θ = desplazamiento del ángulo de fase entre el voltaje y la intensidad.

Los datos experimentales se presentan en términos de la constante dieléctrica compleja, $\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon''$, siendo, ϵ' , es la permitividad real, y ϵ'' es el factor de pérdidas, ambas referidas a ϵ_0 que es la permitividad absoluta en el vacío (8.85×10^{-12} F/m). La disipación se expresa como $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$, siendo δ es el ángulo de fase entre el voltaje de entrada y la corriente de salida. Los valores de la permitividad real ϵ' y de la imaginaria ϵ'' pueden ser determinados experimentalmente mientras que los de la conductividad iónica σ y los del factor de disipación $\tan \delta$ deben ser calculados. Obviamente, ϵ' , ϵ'' y $\tan \delta$ son adimensionales mientras que la conductividad iónica se mide en (pohm/cm). ϵ' es proporcional a la capacitancia y ϵ'' es proporcional a la conductancia. La conductividad σ es obtenida a partir de la medida de ϵ'' .

La permitividad ϵ' y el factor de perdidas ϵ'' proporcionan información sobre el movimiento molecular. ϵ' es una medida del alineamiento de los dipolos, mientras que ϵ'' representa la energía que se necesita para alinear los dipolos y mover los iones, por lo que estas magnitudes tienen dos aportaciones bien diferenciadas (Figura 4.22):

$\epsilon' =$ (permitividad debida a los dipolos inducidos) + (permitividad debida a la alineación de los dipolos).

$\epsilon'' =$ (factor de pérdidas de energía durante la orientación del dipolo) + (factor de pérdidas de energía debidas a la transmisión iónica)

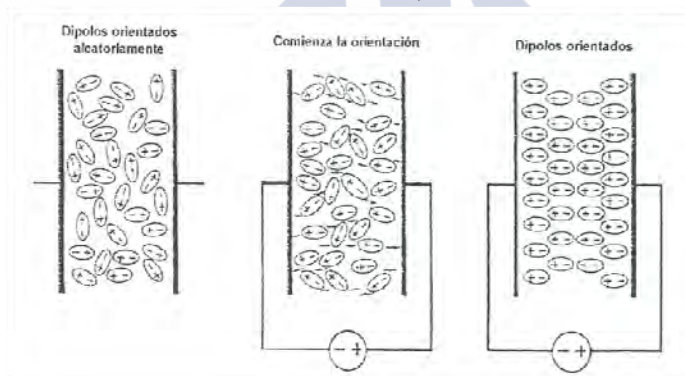


Figura 4.22. Orientación de los dipolos bajo la acción de un campo eléctrico.

En los electrodos de lamina paralela como los empleados en este proyecto, ϵ' y ϵ'' pueden calcularse mediante las ecuaciones:

$$\epsilon' = \frac{c \cdot d}{\epsilon_0 \cdot A} \quad \text{Ec.4.10}$$

$$\epsilon'' = \frac{d}{R \cdot A \cdot 2\pi f \cdot \epsilon_0} \quad \text{Ec.4.11}$$

A = área de la plataforma del electrodo, d = espacio de la lámina, y f = frecuencia (Hz).

En el dominio de temperaturas, y dependiendo del tipo de transición, son frecuentemente utilizadas las ecuaciones de Arrhenius Ec. 4.12 y Vogel Ec. 4.13³⁹

$$\omega = \omega_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Ec. 4.12}$$

$$\omega = A \cdot e^{\frac{-B}{T-T_0}} \quad \text{Ec. 4.13}$$

ω_0 es un parámetro pre-exponencial, E_a es la energía de activación aparente del proceso, A y B son parámetros experimentales, y T_0 es la llamada temperatura de Vogel.⁴⁰⁻⁴¹

Teniendo en cuenta que las magnitudes medidas mediante el análisis dieléctrico son ε' , ε'' y $\tan \delta$ con respecto a la frecuencia y a la temperatura, podemos encontrar una ecuación formalmente idéntica a la de Arrhenius, Ec. 4.14:

$$f = f_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Ec. 4.14}$$

f es la frecuencia constante a la que se realiza cada uno de los experimentos, f_0 es un factor constante de la Ley de Arrhenius. La linealización de esta última ecuación permite obtener la energía de activación del sistema.

4.3.2 FABRICACIÓN DEL NANOCOMPOSITE.

En este trabajo se ha empleado la disolución de nanopartícula de Au, optimizada en los apartados anteriores con ácido mercaptoacético como agente estabilizador de las nanopartículas. Siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente se han realizado los nanocomposites, mezclando la resina epoxi y la nanopartícula para la obtención, esta vez, de láminas de nanocomposite que fueron curadas mediante dos ciclos diferentes.

Uno de ellos, el convencional de 48 h a 45 °C y ½ h a 130 °C optimizado en los apartados anteriores y otro, el curado rápido que es de 20 min a 40°C y de 2 h y 30 min a 103°C.³⁹ Una vez curadas las resinas y desmoldadas se han cortado probetas de 2.5×2.5 cm y 0.5 mm de espesor para su estudio y medición en el equipo de DEA. Figura 4.23.

Se obtiene que la diferencia entre el curado rápido (T_g ,113°C) y el curado optimizado (T_g ,115°C) es de apenas 2 °C, siendo inferior para el curado rápido como era de esperar, aunque la diferencia es poco significativa.

Por otro lado observamos que las placas con nanopartículas tienen una T_g del orden de unos 10 °C inferiores a los obtenidos para las muestras sin nanopartículas (T_g ,106-103°C), también debemos de puntualizar que los valores obtenidos en el curado de placas es ligeramente inferior (\approx 7 °C) a los obtenidos en los apartados anteriores.

Teniendo en cuenta que las condiciones experimentales de Temperaturas de curado y precurado, así como los tiempos de curado y precurado, en el caso del curado convencional eran los mismo que los empleados en el apartado 4.2.1, podemos atribuir estas diferencias al cambio sobre el tipo de probetas empleadas, que anteriormente eran cilíndricas y ahora se han realizado en placas, para llevar a cabo su análisis dieléctrico, por lo que observamos que la geometría de la muestra durante el curado, lo que se traduce en la transferencia de calor en el seno de la muestra, afecta ligeramente a la reticulación del sistema.

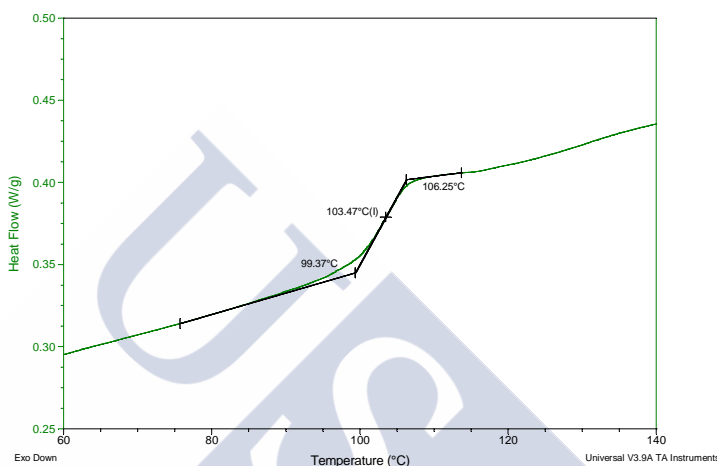


Figura 4.23. Termograma para la determinación de la T_g , mediante la medida en el punto de inflexión de la curva.

4.3.3 ANÁLISIS DIELECTRICO DE LAS MUESTRAS.

Algunos materiales muestran múltiples procesos de relajación, que se refieren a los procesos de relajación a altas y bajas frecuencias⁴² o a los procesos de relajación a distintas temperaturas para una sola frecuencia. Las relajaciones están asociadas generalmente con la temperatura de transición vítrea (T_g) del material y es producida por movimientos cooperativos de las cadenas, también conocidas como transiciones alfa (α). En algunos casos se estudian otras relajaciones como las relajaciones β que aparecen a rangos de temperaturas de -160 a 25 °C, asociadas a movimientos de cadena laterales de la red tridimensional.

Se realizaron determinaciones de los parámetros descritos anteriormente (ϵ' , ϵ'' , $\tan \delta$ y σ en función de la temperatura y las frecuencias aplicadas. Para ello se han dividido cada uno de los parámetros objeto de estudio en bajas frecuencias (0.5 a 2000Hz) y altas frecuencias (2000 a 100000Hz) para una mejor comprensión de los fenómenos que aquí se pretenden explicar. A frecuencias bajas podemos ver que es común para la permitividad que no se observe el fenómeno completo hasta alcanzar frecuencias de 1000 o 2000Hz hecho por el cual se ha establecido en este punto la división de altas y bajas frecuencias.

Del análisis dieléctrico se observa que los blancos empleados sin nanopartículas pero por dos métodos de curado diferentes, que diferenciamos entre un método rápido y uno convencional, la muestra más entrecruzada con una Tg más alta (curado convencional) tiene unas peores propiedades conductivas que la otra alcanzando máximos de conductividad iónica a temperaturas ligeramente superiores. En el caso de las muestras con nanopartículas las tendencias se invierte. Figuras 4.24.

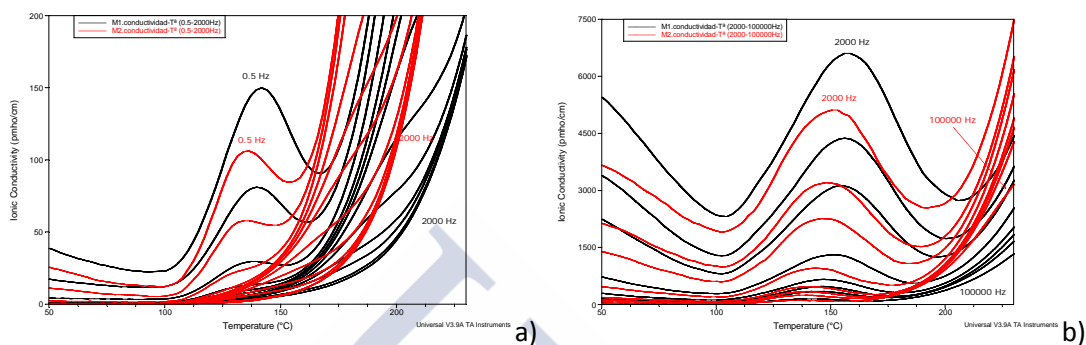


Figura 4.24. Representación de la σ (conductividad iónica) en función de la temperatura para los sistemas de dos métodos de curado, muestra 1 (curado rápido - color negro) y muestra 2 (curado convencional - color rojo). (BADGE + m-XDA + nanopartícula de oro) a) bajas frecuencias de 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 40; 60; 100; 300; 1000 y 2000Hz. b) altas frecuencias de 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000; 70000 y 100000Hz.

4.4 MEZCLAS CATANIÓNICAS.

4.4.1 INTRODUCCIÓN

Las vesículas están habitualmente constituidas por sustancias anfífilas con una doble cadena hidrófoba como pueden ser los fosfolípidos. Sin embargo, en estos últimos años se ha abierto una gran línea de trabajo al poder demostrar la posibilidad de formar vesículas de surfactantes con una única cadena, bajo condiciones favorables. Este es el caso de las mezclas de surfactantes aniónicos y catiónicos, cuyas asociaciones mediante la interacción de sus cabezas polares pueden mimetizar el tipo de estructuras encontradas en los fosfolípidos.⁴³

Las mezclas de surfactantes cataniónicos son obtenidas mediante la interacción de un surfactante aniónico y otro catiónico en agua, sin la extracción de los contraiones inorgánicos. Este tipo de mezclas pueden ser preparadas empleando diferentes relaciones entre ambos compuestos. Con una relación equimolar ambos componentes y la eliminación de los contraiones inorgánicos del sistema, se obtiene una nueva familia de surfactantes conocidos con el nombre de *surfactantes cataniónicos*.

Desde principios de los 90, el interés en los sistemas mixtos de surfactantes aumentó paulatinamente. El desarrollo en un principio se centraba principalmente en tratar de describir las micelas mixtas y la coexistencia de dos tipos de micelas, una rica en uno de los surfactantes y otra rica en el otro, y la mezcla de surfactantes aniónicos y catiónicos formaban sistemas en los cuales aparecían estructuras como vesículas u otras estructuras más complejas.⁴⁴

La principal diferencia entre un surfactante cataniónico y las mezclas de surfactantes cataniónicos es que en los primeros los surfactantes no tienen carga mientras que las mezclas pueden estar cargadas (positiva, negativamente) o sin carga, dependiendo de la composición del sistema. Además, en estos últimos están presentes sales disueltas. Estas diferencias pueden producir grandes variaciones en la estabilidad del sistema dando lugar a una única fase o propiedades de agregación en agua.⁴⁵

A lo largo de los últimos años este tipo de sistemas han despertado un gran interés debido a su gran sinergismo y a las propiedades interfaciales que presentan. Mediante cambios en la relación y cantidad total de surfactantes es posible producir variaciones en el entorno de agregaciones a bajas y altas concentraciones, lo que les proporciona a estos sistemas un amplio rango de posibilidades de trabajo. Estos sistemas son capaces de adoptar una gran diversidad de morfologías de agregación como micelas grandes (discos⁴⁶⁻⁴⁷, tubos, etc.), vesículas estables⁴⁸, cristales líquidos cúbicos, hexagonales, etc⁴⁹, hélices y tubos⁵⁰ o fases laminares, lo que los hace muy interesantes desde el punto de vista de la química supramolecular.⁵¹ También han sido empleados para la

formación de films estables en combinación con polímeros, con un alto grado de ordenamiento y gran robustez, mediante la combinación de estos con agentes de entrecruzamiento para la fijación de la estructura.⁵²

En el año 2000, *Marques y col.*⁵³ publicaron uno de los primeros trabajos en los cuales se estudia una mezcla catanionica entre una sal biliar, el taurodesoxicolato de sodio, y el bromuro de didodecil-dimetilamonio (DDAB). Estudiaron el diagrama de fases de la mezcla y la obtención de regiones en las que se encontró la presencia de micelas, vesículas, cristales líquidos y fases dispersas.

Un año más tarde, *Tondre y col.* publicaron una revisión de los diferentes sistemas vesiculares que habían sido descritos hasta el momento en la bibliografía, discutiendo sobre el potencial de estos sistemas para su uso como sistemas de liberación de sustancias^{47,54} y principios activos.⁵⁵

En 2006, *Vincekovic y col.*⁵⁶ al estudiar las interacciones en agua de mezclas de colato de sodio y cloruros de alquilamonio con 12, 14 y 16 átomos de carbono en la cadena alquílica, observaron una variedad de estructuras dependientes de la relación entre las especies y la concentración de los surfactantes empleados. Así describieron la obtención de micelas esféricas, alargadas, vesículas y bicapas, estructuras helicoidales, tubulares simples y complejas.

Por su parte, *Jiang y col.*⁵⁷ estudiaron la transición vesícula-micela en sistemas de surfactantes catanionicos mediante la adición de colato de sodio o desoxicolato de sodio. Destacaron que las interacciones estéricas entre las sales biliares y los surfactantes catanionicos juegan un papel importante en estos sistemas, destacando las características de estructura anfifílica y la gran área superficial de las sales biliares como factores determinantes en el proceso de transición vesícula-micela.

Con anterioridad, *Tomasic y col.* habían resuelto cristales de ácido cólico combinados con derivados de n-alquilamonio (n= 10, 12, 14, 16), constituyendo esto un sistema cataniónico. Uno de los compuestos manifiesta una nueva ordenación en bicapas de ácido cólico (Figura 4.25), entre las que se incluye el n-alquilamonio como huésped en las zonas hidrofóbicas existentes entre las mismas.⁵⁸

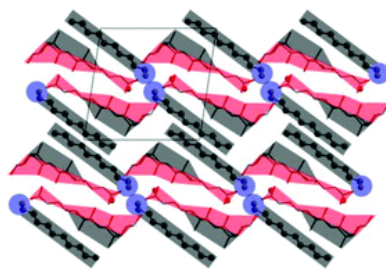


Fig. 4.25 Ejemplo de mezcla cataniónica de ácido cólico y alquilamonio.

En **2010** *Lui y col.*⁵⁹ estudiaron la influencia del ácido cólico en la transición de fases, comportamiento reológico, y microestructuras de mezclas de surfactantes catanionicos libres de sales o contraiones como mecanismo para una mejor compresión de las membranas biológicas y los efectos de los biosurfactantes en las transiciones de fases de los surfactantes. Este mismo estudio lo extendieron al ácido desoxicólico.⁶⁰ Por su parte, *Fernández-Leyes y col.* estudian el efecto de dos sales biliares, desoxicolato de sodio y el deshidrocolato de sodio en las propiedades termodinámicas de monocapas adsorbidas de mezclas catanionicas con bromuro de didodecildimetil amonio.⁶¹

En **2012** *Bhattacharjee y col.*⁶² estudiaron la evolución estructura de mezclas de cloruro de cetilpiridinio y desoxicolato sódico, destacando sus posibles aplicaciones farmacéuticas. Asimismo, *Manna y col.*⁶³ realizaron estudios de mezclas catanionicas de bromuro de alquiltrimetilamonio y colato de sodio y desoxicolato de sodio, destacando sus posibles aplicaciones en la liberación controlada de fármacos, síntesis de nanopartículas, entre otras aplicaciones.

La anterior revisión bibliográfica muestra que, debido a sus potenciales aplicaciones en diferentes campos como la industria farmacológica, nanotecnología, etc., se ha ido incrementando el interés por el estudio de diferentes especies biliares en mezclas cataniónicas

Con estos precedentes, sintetizamos dos derivados del ácido cólico por su posición 24 (Figura 4.26) que pueden dar origen a dos especies di-aniónica y di-catiónica, con el fin de estudiar los posibles sistemas cataniónicos obtenidos mediante la combinación de ambos. Ver Apéndice A de Síntesis.

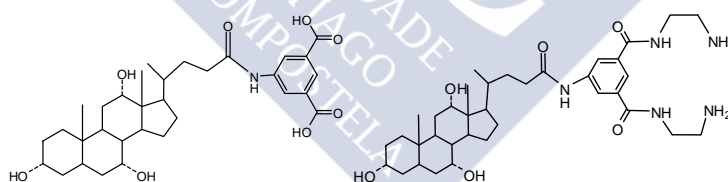


Fig. 4.26 Compuestos sintetizados identificados como IDH (compuesto ácido) e IDEDA (compuesto básico).

A partir de las anteriores, se ha sintetizado un nuevo compuesto (denominado abreviadamente IDEDAC; Figura 4.27) que combina el poder gelificante del IDEDA con la capacidad quelatante que podría proporcionarnos los grupos amido y hidroxilo presentes en las moléculas diseñadas. Ver Apéndice A de Síntesis.

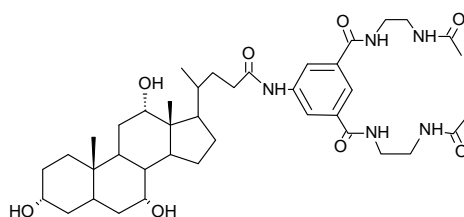


Fig. 4.27. Compuesto sintetizado identificado como IDEDAC.

Como precedentes de la atención anterior, podemos citar el trabajo de Anelli y col.⁶⁴, quienes publicaron una patente en la que se describe la preparación de complejos de gadolinio con tres derivados del ácido cólico para su empleo como agentes de contraste en el diagnóstico de resonancia magnética de imagen (MRI).

Algo más tarde, de Haen y col.⁶⁵ desarrollan una patente en la cual se describen la formación y aplicación de quelatos con ácidos biliares modificados para la complejación con iones metálicos de diversa índole, la presente patente se extiende a los derivados de los ácidos cólico, quenodesoxicólico, desoxicólico, ursodesoxicólico y litocólico. Las modificaciones afectaban las posiciones 3 y 24, mediante diferentes tipos de enlaces con moléculas que actúan como agentes quelantes para diferentes iones metálicos entre los que destacan Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Cr^{+3} , Gd^{+2} , Eu^{+3} , Mn^{+2} , entre otros, también se han empleado con radio isótopos como el ^{51}Cr , ^{159}Gd , ^{67}Ga , entre otros. Los autores destacaron el empleo de estos compuestos como agentes quelatantes de iones metálicos paramagnéticos para ser empleados como agentes de contraste en la Resonancia Magnética de Imagen (MRI).

4.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.2.1 SOLUBILIDAD Y PODER GELIFICANTE

Se ha llevado a cabo el experimento de gelificación típico ya descrito en el capítulo anterior. En la Tabla 4.9 se muestran los resultados de las pruebas realizadas sobre el IDH en los diferentes disolventes estudiados.

Tabla 4.9 - Estudio de gelificación del IDH en diferentes disolventes. Las observaciones del estado se han realizado en el momento del calentamiento, justo después de enfriar pasado unos 30 min., a las 24h y a los 7 días del calentamiento. n=no soluble, s=soluble, (c) formación de cristales.

Disolvente	p.e. (°C)	Estado antes calentar	Estado al enfriar	Estado a las 24h	Estado a los 7 días
Benceno	80	n	n	n	n
Tolueno	110.6	s	s	s	s
p-Xileno	138	n	n	n	n
m-xileno	138.5	s	s	s	s
Ciclohexano	81	n	n	n	n
Hexano	68	n	n	n	n
n-Pentano	36	s	s	s	s
2,2,4-Trimetilpentano	99	n	n	n	n

Benzaldehido	179	s	s	s	s
Acetofenona	202	s	s	s	s
Clorobenceno	132	n	n	n	n
Anisol	155	n	n	n	n
1-Pentanol	137	s	s	s	s
1,4-Dioxano	101	s	s	s	s
2-Butanol	98	s	s	s	s (c)
2-Propanol	82	s	s	s	s
Cloroformo	62	s	s	s	s
Diclorometano	40	n	n	n	n
Tetrahidrofurano	66	s	s	s	s
Dimetilsulfóxido	189	s	s	s	s (c)

Este compuesto es bastante soluble en un amplio abanico de disolventes orgánicos. Algunos, como el DMSO o el 2-butanol, podrían ser buenos para la purificación y cristalización del mismo, ya que aunque no han sido obtenidos buenos monocristales para su resolución mediante Rayos-X, si se ha comprobado que se formaban agujas y otro tipo de estructuras cristalinas, lo que permitiría su purificación mediante recristalización.

La solubilidad de la sal sódica del IDH, que denominaremos como ID2Na, es buena en agua a concentraciones por debajo de 60 mM.

A diferencia del anterior, el IDEDA se comporta de un modo similar al AdSucCA, en el cual la incorporación del residuo succinilo mediante un enlace amida en este caso y en el caso del AdSucCA con dos enlaces amida, cambia radicalmente el comportamiento de la molécula. En el caso del IDEDA, en su forma de sal que denominaremos IDEDA2Cl, tiene un gran poder para la formación de hidrogeles y no se consigue una buena solubilidad en los disolventes orgánicos estudiados.

4.4.2.2 ESTUDIO DE TENSIÓN SUPERFICIAL

Al igual que en el capítulo anterior, se han realizado medidas de tensión superficial empleando el método de Wihelmy. Para el análisis del IDH, lo hemos empleado en su forma de sal sódica en agua mili-Q y en tampón C/BC de Na 15mM, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 4.28. El valor que se deduce para la cac del ID2Na es 5.47 mM

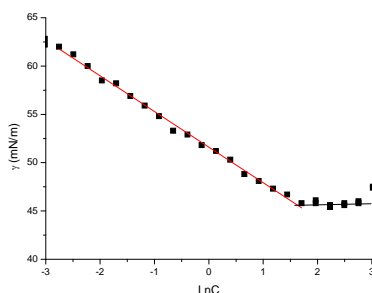


Fig.4.28 Balanza de tensión superficial del ID2Na en regulador tampón carbonato/bicarbonato de sodio 15 mM.

Se ha realizado un ajuste lineal y de la aplicación de la isoterma de Gibbs se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 4.10. El valor del área por molécula en la interfase es de 112 \AA^2 compatible con su estructura molecular si el derivado se dispone paralelamente en la interfase aire-agua.

Tabla 4.10 - Parámetros deducidos de los experimentos de tensión superficial para la agregación y adsorción en la interfase aire-agua del ID-2Na⁺ en regulador tampón carbonato/bicarbonato de sodio 15 mM.

Medio	<i>cac</i> (mM)	$10^6 \Gamma$ (mol · m ⁻²)	<i>a</i> ₀ (Å ²)
Tampón C/BC 15 mM	5.47	1.49	112

Hemos empleado el IDEDA en su forma de sal de cloruro, en agua mili-Q, obteniéndose los resultados de la Figura 4.29, observándose un comportamiento complejo, quizá esperable para estos compuestos sin fuerza iónica en el medio.

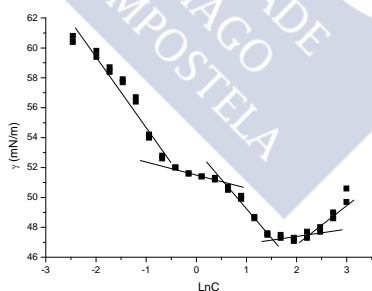


Fig.4.29 Balanza de tensión superficial en agua para el IDEDA2Cl.

Se ha intentado seguir el mismo procedimiento con una disolución 20 mM de IDEDA+2Cl⁻ en tampón carbonato/bicarbonato de sodio 15 mM, pero, en estas condiciones, se forma una fase viscosa, que presentaba birrefringencia la paso de la luz por láminas polarizadas, representativo de un cristal líquido.

Se han realizado también un par de pruebas del comportamiento de una concentración 20mM de ID2Na en agua mili-Q y tampón fosfato /hidrógenofosfato de

sodio 15 mM observándose una buena solubilidad del compuesto en el medio. Sin embargo realizando la misma prueba con una disolución 20 mM de IDEDA2Cl en agua mili-Q y tampón fosfato/hidrógenofosfato de sodio 15 mM se ha obtenido una fase coloidal blanca. También se han realizado pruebas con concentraciones 10 y 2 mM de tampón y se encuentra que para esta última se formaban esferas de gel en la disolución.

4.4.2.3 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM).

Para realizar un estudio preliminar del comportamiento de ambos compuestos como mezclas cataniónicas en agua mili-Q, se decidió preparar las disoluciones que se resumen en la Tabla 4.11.

La muestra M7 es puramente cataniónica ya que se parte del IDH y del IDEDA mezclados con relación molar 1:1 de concentración 0.8 mM en agua mili-Q. Para El resto de las muestras se han preparado a partir de las sales de ambos productos, existiendo en el medio, iones Na⁺ y Cl⁻. También se ha realizado la misma muestra partiendo de las sales para observar los cambios con la presencia de fuerza iónica en el medio.

A modo de resumen, debemos de destacar que para las muestras de concentración 1 mM se han encontrado estructuras en forma de espiral para las tres muestras, con mezcla de espirales cortas y largas para la muestra M3, con mayor proporción de ID2Na. Por otro lado al aumentar la concentración a 2 mM observamos que las muestras adquieren una estructura más propia de gel.

Tabla 4.11 - Muestras preparadas para el estudio TEM de las mezclas cataniónicas de IDH e IDEDA.

	Concentración	Relación molar ID2Na:IDEDA2Cl
M1	1 mM	1:1
M2	1 mM	1:3
M3	1 mM	3:1
M4	2 mM	1:1
M5	3 mM	1:3
M6	4 mM	3:1
M7	0.8 mM	1:1
M8	1 mM	ID2Na
M9	2 mM	ID2Na
M10	3 mM	ID2Na
M11	5 mM	ID2Na
M12	1 mM	IDEDA2Cl
M13	2 mM	IDEDA2Cl
M14	3 mM	IDEDA2Cl
M15	5 mM	IDEDA2Cl
M16	0.8 mM	1:1

Todas las muestras se dejaban agitando durante 48 horas a 30 °C. Las imágenes TEM y/o SEM eran recolectadas transcurrido ese tiempo.

Para la muestra puramente catiónica M7, se han obtenido una mezcla de agregados esféricos y cilíndricos, mientras que cuando teníamos presencia de fuerza iónica, se produce la formación de hélices, M17. Estos resultados se visualizan en las imágenes de la Figura 4.30.

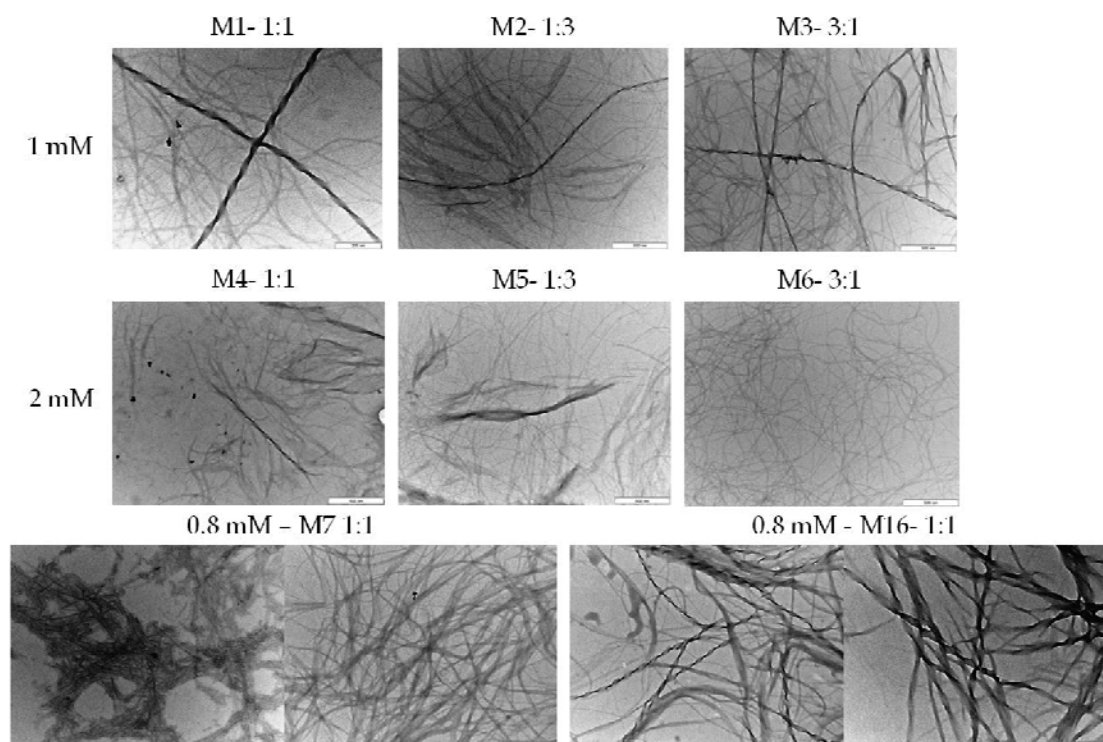


Fig. 4.30. Imágenes TEM para las mezclas catiónicas estudiadas para el IDH e IDEDA. Barras de referencia de 500nm, a excepción de la primera y última imagen barra de referencia es de 200 nm.

Las imágenes de las disoluciones de ID2Na muestran la existencia de agregados con cierta esfericidad, con la aparición de cristales precipitados al ir aumentando la concentración (Figura 4.28).

Las imágenes obtenidas a partir de las disoluciones IDEDA2Cl muestran, para la concentración más baja 1 mM, una mezcla de agregados esféricos y estructuras ramificadas típicas de los geles, que se van incrementando al ir incrementando la concentración de las muestras (Figura 4.31)

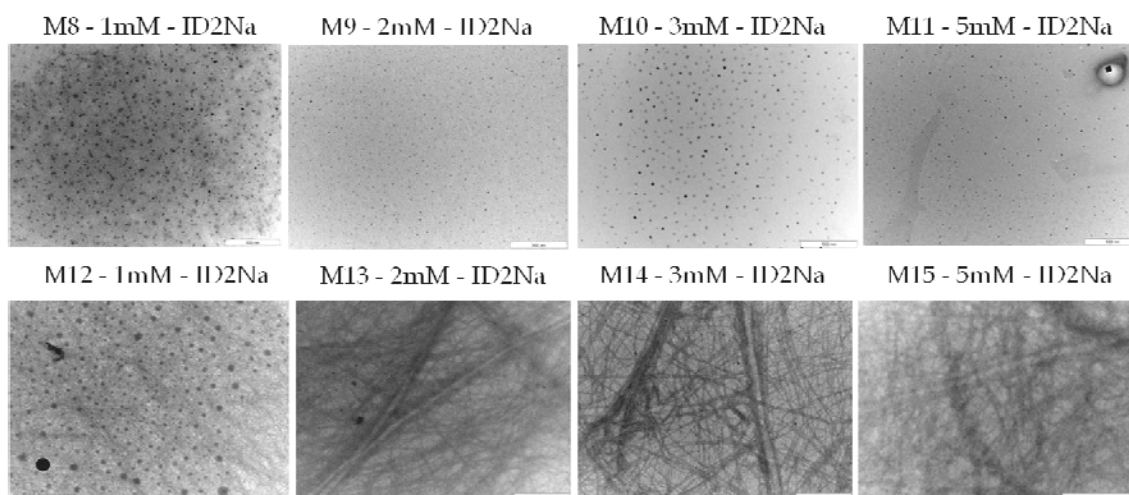


Fig. 4.31. Imágenes TEM para las distintas concentraciones de IDH e IDEDA estudiadas. Todas las barras de referencia de 500 nm a excepción de M12(1 μ m) y M15 (200nm).

El compuesto IDH fue posteriormente estudiado mediante SAXS en el Departamento de Química de la Universidad Sapienza, Roma. Los resultados han sido publicados en Langmuir⁶⁶. La Tabla 4.12 y la Figura 4.32. resumen el estudio realizado.

Tabla 4.12. Valores de los semiejes de los agregados micelares supuestos en la Figura 4.29, grado de ionización y número de agregación obtenidos de la optimización de los datos obtenidos mediante SAXS y SLS.

Elipsoide	$a(\text{Å})$	$b(\text{Å})$	α	N_{agreg}
Prolato	26.9	11.7	0.6	8.2
Oblato	15.7	13.3	0.5	6.5
Esfera	14.9		0.6	6.5

De las observaciones obtenidas destacamos que el surfactante catiónico se autoensambla en una red de fibras entrecruzadas con un radio de giro de 15 Å , dando lugar a hidrogeles cuya compactación dependerá del pH del medio. Al igual que en las imágenes TEM, se ha corroborado la existencia a bajas concentraciones de la coexistencia de fibras parcialmente ordenadas, típicas de geles, con presencia de superestructuras secundarias plegadas tipo hélices. También se destaca que la presencia de un componente electrostático en el autoensamblaje de las moléculas permite la formación de geles para muestras con concentraciones más diluidas.

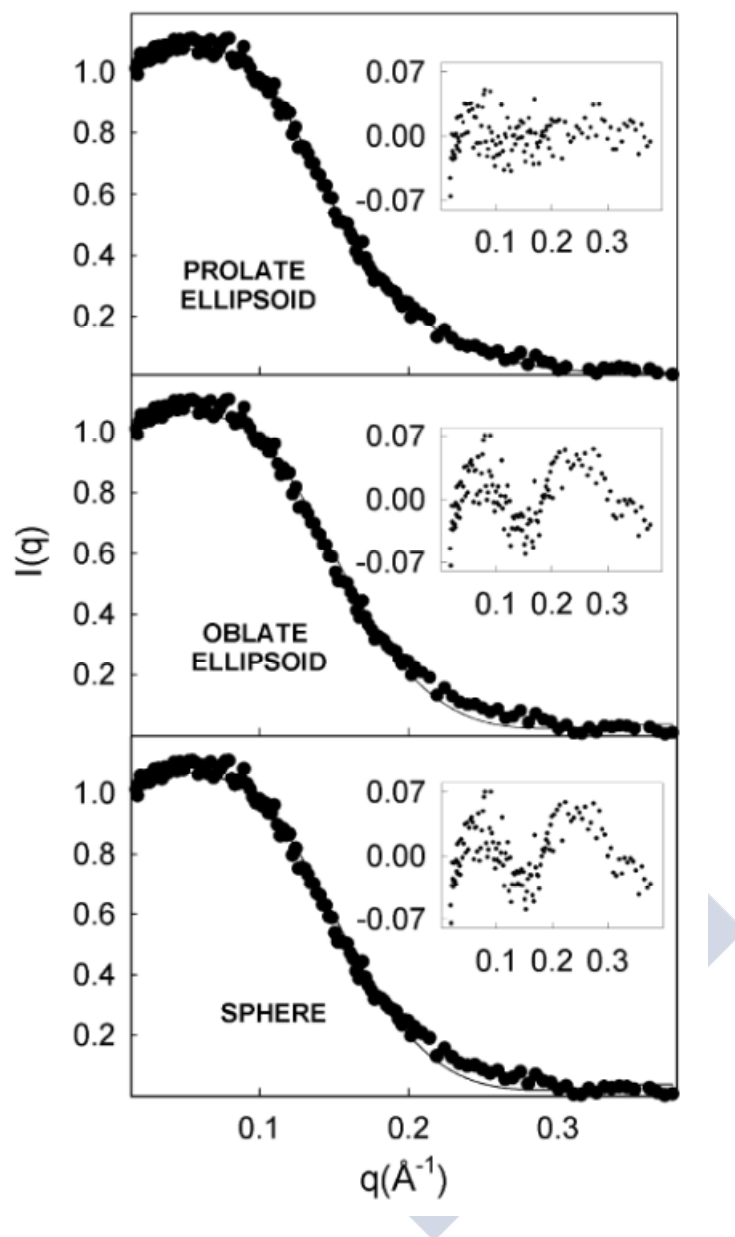


Fig. 4.32 Espectros SAXS experimentales de una disolución de IDH 0.07 M en regulador carbonato/bicarbonato de sodio 0.036 M a 25.0 °C. Para los ajustes lineales se ha supuesto la formación de micelas con las geometrías indicadas. En los recuadros se indican los residuos del ajuste.

4.5 COMENTARIOS ADICIONALES

Se han diseñado y sintetizado cuatro nuevos compuestos derivados de ácido cólico por la posición C3 con el fin de ser utilizados como agentes protectores y estabilizadores de nanopartículas metálicas. Tres de ellos se han probado con nanopartículas de Au, comprobando su eficacia como agentes estabilizantes, siguiendo su comportamiento mediante espectroscopía UV-VIS y microscopía TEM. Los resultados muestran que es posible obtener diferentes tamaños de nanopartículas de Au, variando las relaciones sal de Au, agente reductor y agente estabilizante. En algunos casos, se comprueba que la propia molécula protectora es capaz de reducir la sal de Au y formar nanopartículas previo a la adición de reductor. Estos nuevos compuestos podrían tener diferentes tipos de aplicaciones en campos de la nanotecnología y nanomedicina.

Se ha utilizado un diseño de experimentos para optimizar el tiempo de curado del material alcanzando una conversión máxima del sistema próxima al 100%.

Se ha realizado la síntesis de nanopartículas de oro, para encontrar la disolución que presentara el tamaño de nanopartícula más pequeño y mejor estabilidad frente al tiempo. Para ellos se han utilizado diferentes tipos de tioles como grupos protectores para evitar la agregación de las nanopartículas.

Se ha fabricado el nanocomposite mediante un proceso térmico de fusión que garantiza que las Nps queden intercaladas en la red estructural manteniendo las mismas características de la disolución original. Se ha realizado la cinética de curado de este tipo de materiales con y sin nanopartícula observando que la introducción de esto no modifica apreciablemente la temperatura de transición vítrea, pero si modifica los parámetros cinéticos.

También se observa que la presencia de nanopartículas en la red invierte el comportamiento natural de la resina, así la muestra curada convencionalmente con una Tg de 115°C. El efecto de la nanopartícula a pesar de producir una disminución en la Tg del sistema, parece que induce un ligero incremento en la conductividad iónica del mismo,.

Se han sintetizado tres nuevos compuestos derivados de ácido cólico por la posición 24 que presentan un buen comportamiento gelificante, con capacidad para la formación de mezclas catiónicas y con la posibilidad de futuras aplicaciones biomédicas.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- 1 García Jaca, J. & al, e. La nanotecnología en los plásticos. *Observatorio Industrial del Sector Químico* (2007).
- 2 Neeta Lala, S. P. L., S. D. Adyanthaya, and Murali Sastry. Phase Transfer of Aqueous Gold Colloidal Particles Capped with Inclusion Complexes of Cyclodextrin and Alkanethiol Molecules into Chloroform. *Langmuir* (1917).
- 3 Turkevich, J. Colloidal gold. Part I. Historical and preparative aspects, morphology and structure. *Gold Bulletin* 18, 86-91 (1985).
- 4 Turkevich, J. Colloidal gold. Part II. Color, coagulation, adhesion, alloying and catalytic properties. *Gold Bulletin* 18, 125-131 (1985).
- 5 Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nano-dots and Nano-rods. *J. Phys. Chem. B* 103, 8410-8426 (1999).
- 6 Schmidbaur, H. The aurophilicity phenomenon: a decade of experimental findings, theoretical concepts and emerging applications. *Gold Bulletin* 33, 3-10 (2000).
- 7 Shipway, A. N., Katz, E. & Willner, I. Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *ChemPhysChem* 1, 18-52 (2000).
- 8 Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 801-802 (1994).
- 9 Paulini, R., Frankamp, B. L. & Rotello, V. M. Effects of Branched Ligands on the Structure and Stability of Monolayers on Gold Nanoparticles. *Langmuir* 18, 2368-2373 (2002).
- 10 Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293-346 (2004).
- 11 Bhargava, S. K., Booth, J. M., Agrawal, S., Coloe, P. & Kar, G. Gold Nanoparticle Formation during Bromoaurate Reduction by Amino Acids. *Langmuir* 21, 5949-5956 (2005).
- 12 Jurvilliers, X., Schneider, R., Fort, Y., Walcarius, A. & Ghanbaja, J. Novel single-phase and gram-scale synthesis of thiol-uncapped stable colloidal gold nanoparticles. *J. Nanoscience Nanotechnology* 5, 282-287 (2005).
- 13 Bhat, S. & Maitra, U. Nanoparticle-Gel Hybrid Material Designed with Bile Acid Analogues. *Chem. Mat.* 18, 4224-4226 (2006).
- 14 Nojonen, V., Bhat, S., Sievanen, E. & Kolehmainen, E. Novel two-step synthesis of gold nanoparticles capped with bile acid conjugates. *Materials Science & Engineering, C* 28, 1144-1148 (2008).
- 15 Chakrabarty, A., Maitra, U. & Das, A. D. Metal cholate hydrogels: versatile supramolecular systems for nanoparticle embedded soft hybrid materials. *J. Mater. Chem.* 22, 18268-18274 (2012).
- 16 Pérez-Andres, M. *et al.* Bisursodeoxycholate(ethylenediamine)platinum(ii): a new autofluorescent compound. Cytotoxic activity and cell cycle analysis in ovarian and hematological cell lines. *Dalton Trans.*, 6159-6164 (2008).
- 17 Criado, J. J. *et al.* Intrinsically Fluorescent Cytotoxic Cisplatin Analogues as DNA Marker Molecules. *Bioconjugate Chem* 16, 275-282 (2005).
- 18 Pérez-Andres, M. *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of cisplatin analogue with an Ursodeoxycholate ligand. *Lett. Drug Design Discovery* 4, 341-345 (2007).
- 19 Chakrabarty, A. & Maitra, U. Organogels from Dimeric Bile Acid Esters: In Situ Formation of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 117, 8039-8046 (2013).

- 20 Sánchez-Cortes, S. SERS en coloides. *Óptica pura y Aplicada* 37 (2004).
- 21 Rao, C. N. R. & al, e. Physical and Chemical Properties of Nano-sized Metal Particles”, Metal Polymer Nanocomposites. *Physical and Chemical Properties of Nano-sized Metal Particles”, Metal Polymer Nanocomposites*, Ed. Nicolais L. y Carotenuto G. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (2005).
- 22 Liu, X., Atwater, M., Wang, J. & Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surfaces B* 58, 3-7 (2007).
- 23 Jover, A., Meijide, F., Mosquera, V. & Vázquez Tato, J. A step-by-step dilution-extraction method for laboratory experiments. *J. Chem. Educ.* 67, 530 (1990).
- 24 Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* 110, 7238-7248 (2006).
- 25 Miller, J. C. & Miller, J. N. Estadística para Química Analítica. *Estadística para Química Analítica*, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana (1993).
- 26 Chern, C. S. & Pholein, G. W. *Polym. Eng. Sci.* 27 782 (1987).
- 27 Sourour, S. & Kamal, M. R. Differential scanning calorimetry of epoxy cure: isothermal cure kinetics. *Thermochim. Acta* 14, 41-59 (1976).
- 28 Cole, K. C., Hechler, J. J. & Noel, D. A new approach to modeling the cure kinetics of epoxy/amine thermosetting resins. 2. Application to a typical system based on bis[4-(diglycidylamino)phenyl]methane and bis(4-aminophenyl) sulfone. *Macromolecules* 24, 3098-3110 (1991).
- 29 Khanna, U. & Chanda, M. Kinetics of anhydride curing of isophthalic diglycidyl ester using differential scanning calorimetry. *J. Appl. Polym. Sci.* 49, 319-329 (1993).
- 30 Núñez, L., Fraga, F., Núñez, M. R. & Villanueva, M. Effects of diffusion on the kinetic study and TTT cure diagram for an epoxy/diamine system. *J. Appl. Polym. Sci.* 70, 1931-1938 (1998).
- 31 Núñez, L., Fraga, F., Núñez, M. R., Castro, A. & Fraga, L. Effects of Diffusion on the Kinetic Study of the System BADGE n=0/m-Xylylenediamine. *J. Appl. Polym. Sci.* 74, 2997-3005 (1999).
- 32 Núñez, L., Fraga, F., Fraga, L. & Castro, A. Kinetic and thermodynamic studies of an epoxy system diglycidyl ether of bisphenol-A/1,2 diamine cyclohexane. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 635-641 (1997).
- 33 Brown, M. E. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry”, 1: Principles and Practice. Editor, *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry”, 1: Principles and Practice* Elsevier Science B.V. Amsterdam (1998).
- 34 Prime, R. B. Thermal Characterization of Polymeric Materials. *Thermal Characterization of Polymeric Materials* 2^a ed. Ed., E. A. Turi, Edit Academic Press, Inc. (1997).
- 35 Hunt, B. J. & James, M. I. Polymer Characterisation. *Polymer Characterisation* Ed. Blackie Academic and Profesional, London (1993).
- 36 TAINstruments. Universal Analysis: Operator’s Manual”. *Universal Analysis: Operator’s Manual”* (1999).
- 37 Senturia, S. D. & Sheppard, N. F. J. Dielectric Analysis of Thermoset Cure. *Adv. Polymer Sci.* 80, Springer- Verlag Berlin Heidelberg (1986).
- 38 Coln, M. C. W. & Senturia, S. D. The application of linear system theory to parametric microsensors. *Proc. Transducers* 85, 118 (1985).
- 39 Gómez-Barreiro, S. Estudio mediante análisis dieléctrico, dinamomecánico y termogravimétrico de los sistemas curados BADGE (n=0)/m-XDA y BADGE (n=0)/trans-1,2 DCH y monitorización del curado de dichos sistemas y el BADGE (n=0)/cis/trans-1,2 DCH. *Estudio mediante análisis dieléctrico, dinamomecánico y termogravimétrico de los sistemas curados BADGE (n=0)/m-XDA y BADGE (n=0)/trans-1,2*

- DCH y monitorización del curado de dichos sistemas y el BADGE ($n=0$)/cis/trans-1,2 DCH
Tesis Doctoral, USC (2004).
- 40 Alig, I. & Jenninger, W. Curing Kinetics of Phase Separating Epoxi Thermosets Studied
by Dielectric and Calorimetric Investigations: A Simple Model for the Complex
Dielectric Permittivity. *Curing Kinetics of Phase Separating Epoxi Thermosets Studied by
Dielectric and Calorimetric Investigations: A Simple Model for the Complex Dielectric
Permittivity* Deutsches Kunststoff-Institut, Germany (1998).
- 41 Pérez-Rodríguez, J. M. Estudio del curado de resinas lignonovolacas. Propiedades
termo-mecánicas de los productos curados. *Estudio del curado de resinas lignonovolacas.
Propiedades termo-mecánicas de los productos curados* Madrid (2005).
- 42 Cahn, R. W., Haasen, P. & Kramer, E. J. Materials Science and Technology. *Materials
Science and Technology* Vol. 12, Edwin L. Thomas - Weinheim, New York VCH (1993).
- 43 Yeh, S.-J., Yang, Y.-M. & Chang, C.-H. Cosolvent Effects on the Stability of Catanionic
Vesicles Formed from Ion-Pair Amphiphiles. *Langmuir* 21, 6179-6184 (2005).
- 44 Kronberg, B. Surfactant mixtures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2, 456-463
(1997).
- 45 Edlund, H., Sadaghiani, A. & Khan, A. Phase Behavior and Phase Structure for
Catanionic Surfactant Mixtures: Dodecyltrimethylammonium Chloride-Sodium
Nonanoate-Water System. *Langmuir* 13, 4953-4963 (1997).
- 46 Zemb, T., Dubois, M., Demé, B. & Gulik-Krzywicki, T. Self-Assembly of Flat Nanodiscs
in Salt-Free Catanionic Surfactant Solutions. *Science* 283, 816-819 (1999).
- 47 Hao, J. & Hoffmann, H. Self-assembled structures in excess and salt-free catanionic
surfactant solutions. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* 9, 279-293 (2004).
- 48 Jung, H. T., Coldren, B., Zasadzinski, J. A., Iampietro, D. J. & Kaler, E. W. The origins of
stability of spontaneous vesicles. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98, 1353-1357 (2001).
- 49 Dubois, M. D., Bruno; Gulik-Krzywicki, Thaddee; Dedieu, Jean-Claude; Vautrin, Claire;
Desert, Sylvan; Perez, Emile; Zemb, Thomas. Self-assembly of regular hollow
icosahedra in salt-free catanionic solutions. *Nature* 411, 672-675 (2001).
- 50 Blanzat, M., Massip, S., Speziale, V., Perez, E. & Rico-Lattes, I. First Example of Helices
and Tubules in Aqueous Solution of a New Fluorescent Catanionic Sugar Surfactant.
Langmuir 17, 3512-3514 (2001).
- 51 Wang, Y. *et al.* Catanionic surfactant films at the air-water interface. *Thin Solid Films* 515,
2031-2037 (2006).
- 52 O'Driscoll, B. M. D., Nickels, E. A. & Edler, K. J. Formation of robust, free-standing
nanostructured membranes from catanionic surfactant mixtures and hydrophilic
polymers. *Chem. Commun.*, 1068-1070 (2007).
- 53 Marques, E. F., Regev, O., Edlund, H. & Khan, A. Micelles, Dispersions, and Liquid
Crystals in the Catanionic Mixture Bile Salt-Double-Chained Surfactant. The Bile Salt-
Rich Area. *Langmuir* 16, 8255-8262 (2000).
- 54 Vautrin, C., Zemb, T., Schneider, M. & Tanaka, M. Balance of pH and Ionic Strength
Influences on Chain Melting Transition in Catanionic Vesicles. *J. Phys. Chem. B* 108,
7986-7991 (2004).
- 55 Tondre, C. & Caillet, C. Properties of the amphiphilic films in mixed cationic/anionic
vesicles: a comprehensive view from a literature analysis. *Adv. Colloid Interface Sci.* 93,
115-134 (2001).
- 56 Vincekovic, M., Jurasin, D., Tomasic, V., Bujan, M. & Filipovic-Vincekovic, N.
Interactions in aqueous mixtures of alkylammonium chlorides and sodium cholate. *J.
Dispersion Sci. Tech.* 27, 1099-1111 (2006).
- 57 Jiang, L., Wang, K., Deng, M. & Wang, Y. Bile Salt-Induced Vesicle-to-Micelle Transition
in Catanionic Surfactant Systems: Steric and Electrostatic Interactions. *Langmuir* 24,
4600-4606 (2008).

- 58 Tomasic, V. & Stefanic, Z. Cholic acid as host for long linear molecules: a series of co-crystals with n-alkylammonia. *CrystEngComm* 9, 1124-1128 (2007).
- 59 Liu, C. & Hao, J. Influence of Cholic Acid on Phase Transition, Rheological Behavior, and Microstructures of Salt-Free Catanionic Surfactant Mixtures *J. Phys. Chem. B* 114, 4477-4484. (2010).
- 60 Liu, C., Hao, J. & Wu, Z. Phase Behavior and Rheological Properties of Salt-Free Catanionic Surfactant Mixtures in the Presence of Bile Acids. *J. Phys. Chem. B* 114, 9795-9804 (2010).
- 61 Fernandez-Leyes, M. D., Messina, P. V. & Schulz, P. C. Bile salt structural effect on the thermodynamic properties of a cationic mixed adsorbed monolayer. *Colloid Polym. Sci.* 289, 179-191 (2011).
- 62 Bhattacharjee, J. *et al.* Structural evolution in cationic mixtures of cetylpyridinium chloride and sodium deoxycholate. *Soft Matter* 8, 10130-10140 (2012).
- 63 Manna, K., Chang, C.-H. & Panda, A. K. Physicochemical studies on the cationics of alkyltrimethylammonium bromides and bile salts in aqueous media. *Colloids Surfaces, A* 415, 10-21 (2012).
- 64 Anelli, P. L., De Haen, C., Lattuada, L., Morosini, P. & Uggeri, F. Bile acid conjugates, derivatives thereof with metal complexes and related uses. PIXXD2 WO 9532741 A1 19951207.
- 65 De Haen, C., Beltrami, A., Cappelletti, E., Lattuada, L. & Virtuani, M. Bile acids conjugates with metal ion chelates and the use thereof. WO 01/64708 A1.
- 66 di Gregorio, M. C. *et al.* Catanionic Gels Based on Cholic Acid Derivatives. *Langmuir* 29, 12342-12351 (2013).





5

CONCLUSIONES.

Tras un arduo y laborioso trabajo, debemos de pararnos a reflexionar y tratar de plasmar unos argumentos y afirmaciones generales que sinteticen en mayor o menor medida todo el trabajo hasta aquí desarrollado, estas conclusiones pueden ser más o menos relevantes, tener un mayor o menor impacto a nivel científico, tecnológico, industrial, académico, pero de lo que no cabe la menor duda, es que ha sido una etapa formativa muy enriquecedora desde todos los puntos de vista que pueden afectar a la vida de un ser humano.

Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos.

(Eduardo Galeano)



Se han obtenido 23 estructuras cristalinas con diferentes derivados del ácido cólico, AdCA (3), AdCH₂CA (7), NbCH₂CA (5) AdCH₂CH₂CA(4), AdCOOMe(1), AdSuccCOOMe(1), BocCysTrtCOOMe (1) y PyrCOOMe(1) (Ad=admantilo, Nb=norbornilo). De todos los sistemas obtenidos, sólo uno de ellos es monoclinico mientras que todos los restantes son ortorrómbicos. Este hecho los acerca más hacia el comportamiento de los ácidos biliares naturales más hidrófobos, como puede ser el ácido desoxicólico.

El empaquetamiento de la red cristalina se suele dar en bicapas con el interior hidrófilo y el exterior hidrófobo, cuando los huéspedes son agua, acetona, DMSO, 2-propanol o 2-butanol, aunque para el caso NbCH₂CA:2-propanol, 2-butanol y 2-pentanol se produce una inversión de la orientación de las unidades biliares (de *antiparalela* a *paralela*), obteniéndose los tres únicos casos de sistemas monoclinicos. Se evidencia claramente la existencia de sistemas dinámicos que puede transformarse en función del huésped alojado con pequeñas variaciones estructurales y de los sistemas de redes de hidrógeno. También se han obtenido una serie de estructuras cruzadas que coincidían con una variación del huésped alojado, caso de la acetofenona, o cuando el grupo hidrófobo incorporado está lo suficientemente separado del núcleo esteroideo. En el caso del AdCA todas las estructuras obtenidas fueron del tipo cruzado, tanto con la presencia de huéspedes como en ausencia de los mismos. El empaquetamiento de los ácidos biliares modificados mediante la incorporación de grupos hidrófobos en la posición C3, es altamente dependiente de la naturaleza del grupo incorporado.

Las estructuras se ven modificadas también por los enlaces de hidrógeno, habiéndose encontrado secuencias de tipo cíclico, helicoidal o la combinación de ambas,. La capacidad de formar diferentes redes de enlaces de hidrógeno les proporciona a estos compuestos una gran capacidad de inclusión.

La naturaleza del disolvente es un factor importante a la hora de producir cambios significativos en el ordenamiento estructural, dando origen a la formación de diferentes redes de enlaces de hidrógeno. Aunque los disolvente (acetona, DMSO, metanol, 2-propanol, 2-butanol...) poseen una geometría muy parecida, tienen un comportamiento y capacidad de formar enlaces de hidrógeno bastantes diferentes. Esto es debido a la capacidad de los alcoholes a poder actuar como donante y aceptor mientras que los otros casos, al ser disolventes dipolares apróticos, sólo pueden actuar como aceptores en los enlaces de hidrógeno. Esta característica produce que los huéspedes como la acetona y el DMSO, los cuales están unidos por solo un enlace de hidrógeno, posean una mayor movilidad de acomodación en la cavidad formada durante el proceso de cristalización del sustrato derivado de ácido biliar, a pesar de que la localización final esté relacionada con las interacciones hidrófobas. Sin embargo, cuando un huésped como el 2-propanol se une mediante dos enlaces de hidrógeno, la

movilidad del giro alrededor del enlace C-O se ve drásticamente reducida. Se concluye que en el primer caso, las interacciones ácido biliar-ácido biliar son las que dirigen la formación de la estructura cristalina, mientras que en el segundo caso, las interacciones ácido biliar-huésped se hacen más importantes y son las que dirigen la formación de la estructura cristalina.

Cobra especial relevancia la capacidad de algunos compuestos aquí sintetizados para la enantiodiferenciación de la molécula huésped. Así el AdCH₂CA resuelve en el enantiómero S del 2-butanol cuando se obtiene el cristal en este disolvente y el NbCH₂CA resuelve el R del 2-pentanol. Por su parte la molécula de AdCA no resuelve el 2-butanol ni el 2-pentanol. Estos hechos refrendan que es posible diseñar derivados de ácidos biliares que resuelvan específicamente un enantiómero de un disolvente racémico.

La orientación del átomo de carbono C24 del grupo carboxílico de la cadena lateral está mayoritariamente orientada hacia la cara α de la molécula. Los valores de la distancia entre los átomos de carbono C24 y C17 (en el que está anclada la cadena lateral) se agrupan bien en torno al valor medio de 4.47 ± 0.09 Å, que significa que la cadena está parcialmente plegada, o bien en torno a 5.03 ± 0.04 Å que conlleva que la cadena está completamente estirada.

En definitiva, la inserción de grupos hidrófobos en la estructura química de los ácidos biliares naturales, lo cual modifica su balance hidrófilo hidrófobo, da origen a especies con nuevas propiedades de inclusión con aplicaciones evidentes como su utilización a la hora de resolver racematos.

El AdCH₂CA es capaz de formar organogeles en diferentes compuestos como acetofenona y clorobenceno, mientras que el NbCH₂CA, amplía esta capacidad al anisol y forma esferulitas de gel en dioxano. Con la excepción del el AdSucCA, que se comporta como un buen agente gelificante en agua, ninguno de ellos forma hidrogeles en las concentraciones de estudio. Este comportamiento se debe a la incorporación de un enlace amida adicional entre el grupo adamantilo y el otro grupo amida que lo une al núcleo del esteroide. Sin embargo, la incorporación de un grupo metileno adicional, que separa los dos grupos amida, hace perder esta capacidad gelificante, en gran medida, por lo que no influye tanto el tamaño del grupo hidrofóbico terminal en esta propiedad, como la limitación de los grados de libertad de dicho grupo.

En disolución acuosa, la naturaleza del grupo hidrófobo incorporado y/o su distancia con respecto al núcleo esteroideo condicionan el valor de la concentración de agregación crítica, *cac*, así como el tamaño de los agregados y la naturaleza de estos últimos. Las condiciones experimentales en las que se realiza el experimento (fuerza iónica, temperatura...) son también variables que inciden de un modo importante sobre

los parámetros mencionados. Así, existe una capacidad clara de estabilizar agregados de mayor tamaño al ir aumentando la fuerza iónica del medio. Una mayor separación del grupo hidrófobo del núcleo esteroideo, lo que se traduce en una mayor movilidad, genera una disminución en el valor de la *cac*.

El AdSucCA, tiene capacidad de formar cristales líquidos, y mediante la variación de la fuerza iónica del medio, es posible invertir la luz polarizada absorbida por la muestra variando ésta de dextrógira a levógira y viceversa.

Se han diseñado y sintetizado cuatro nuevos compuestos derivados de ácido cólico por la posición C3 con el fin de ser utilizados como agentes protectores y estabilizadores de nanopartículas metálicas. Tres de ellos se han probado con nanopartículas de Au, comprobando su eficacia como agentes estabilizantes. Los resultados muestran que es posible obtener diferentes tamaños de nanopartículas de Au, variando las relaciones sal de Au, agente reductor y agente estabilizante. En algunos casos, se comprueba que la propia molécula protectora es capaz de reducir la sal de Au y formar nanopartículas previo a la adición de reductor.

Se han fabricado materiales nanocompuestos basados en resinas epoxi y nanopartículas de Au optimizando el proceso de curado y manteniendo propiedades de la resina de partida y modificando parámetros cinéticos del sistema. Previamente, se ha utilizado un diseño de experimentos para optimizar el tiempo de curado del material alcanzando una conversión máxima del sistema próxima al 100%. Asimismo, se han utilizado diferentes tioles como grupos protectores para evitar la agregación de las nanopartículas. Para que las Nps queden intercaladas en la red estructural manteniendo las mismas características de la disolución original el nanocomposite fue obtenido mediante un proceso térmico de fusión. La cinética de curado de este tipo de materiales con y sin nanopartícula muestra que tal introducción no modifica apreciablemente la temperatura de transición vítrea, pero si modifica los parámetros cinéticos. La nanopartícula induce un ligero incremento en la conductividad iónica del mismo y una disminución en la Tg del sistema.

Se han sintetizado tres nuevos compuestos derivados de ácido cólico por la posición 24 que presentan un buen comportamiento gelificante, con capacidad para la formación de mezclas catiónicas.



6

APÉNDICE A

En este apéndice trataremos la descripción de las rutas sintéticas y la elucidación estructural de los productos sintetizados, para cuyo fin se han empleado fundamentalmente las técnicas de IR, resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (^1H) y carbono (^{13}C), espectrometría de masas y análisis elemental. En ocasiones se ha caracterizado el producto en forma de ácida, en otras en forma de sal sódica, y en otras en forma de éster metílico (que corresponde al paso inmediatamente anterior al de la forma ácida en la secuencia sintética) dependiendo en cada caso de la naturaleza y el comportamiento de los productos que hemos sintetizado.

Conócete, acéptate, supérate.

(S. Agustín)



APÉNDICE A
 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Para la síntesis de los compuestos presentados en este trabajo es necesario recurrir a una serie de reacciones y procedimientos sintéticos para la funcionalización de ácidos biliares, la protección y desprotección de grupos funcionales, la síntesis de sintones para posteriores reacciones, la hidrólisis básica de grupos éster y reacciones de neutralización con ácido clorhídrico, entre otras, para la obtención de nuevos derivados de ácidos o sales biliares.

Todos los compuestos sintetizados requieren la formación de enlaces amida, los cuales pueden generarse a partir de la unión de ácidos carboxílicos con grupos amina, con la consiguiente eliminación de agua a temperaturas superiores a 200°C, lo que va en detrimento de la integridad de los sustratos. Para evitarlo, se recurre a una activación del ácido carboxílico que consiste en convertir su grupo -OH en un buen grupo saliente antes de hacerlo reaccionar con la amina (Figura A.1). Para la realización de este proceso se usan agentes acoplantes que actúan como reactivos independientes para generar anhídridos, cloruros de ácido, ésteres activos, etc... En nuestro caso, hemos usado DEPC y el sistema formado por DIC/HOBt (Figura A.2).

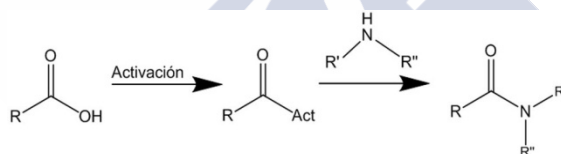


Figura A.1 - Esquema simplificado de la activación de los ácidos carboxílicos para la formación de enlaces amida.

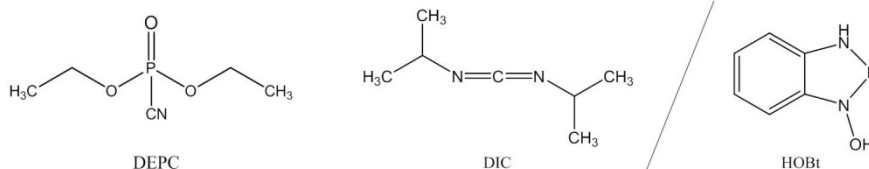


Figura A.2 - Agentes acoplantes usados en la presente Tesis para la generación de enlaces amida.

Otro método empleado es el basado en la utilización de cloruros de ácido como reactivos para la reacción con la amina de interés, ya que estos cloruros pueden adquirirse comercialmente en algún caso o ser sintetizados a partir de cloruro de tionilo. En general estas reacciones son sencillas y de alto rendimiento debido a la alta reactividad de los cloruros de acilo involucrados.

En todos los casos para la purificación de los reactivos seguimos los tratamientos descritos por Armarego¹. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas pre-revestidas en sílica gel 60 F₂₅₄ de la casa Merck. Para las purificaciones por cromatografía en columna se usó sílica gel 60 de la casa Panreac (40-63 μm).

A.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE 3 β AMINODERIVADOS DE ÁCIDO CÓLICO.

Primeramente procederemos a la explicación de la obtención del 3 β -aminocolato de metilo, ya que supone el punto de partida de la mayoría de los compuestos derivados de ácido cólico sintetizados a lo largo de la presente Tesis doctoral.(Figura A.3)

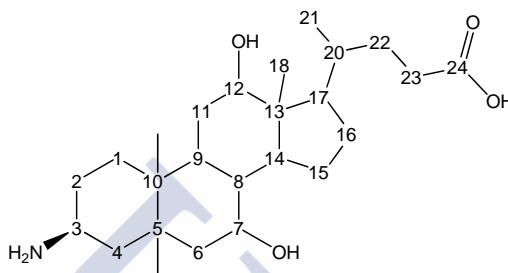


Figura A.3 - Numeración del Ácido 3 β -Aminocólico.

El método usado ha sido el descrito por Anelli y col.² con una pequeña variación durante el proceso de purificación. La incorporación del grupo amino se realiza en dos procesos *one pot* (reacción de Mitsunobu-Stäudinger). El primero conocido como reacción de Mitsunobu consta de tres etapas:

- 1- Activación de la trifenilfosfina mediante la formación de un aducto zwitteriónico.
- 2- Activación del alcohol, vía un dial quiloxifosforano.
- 3- Desplazamiento tipo S_N2 que genera la azida.

La azida es reducida posteriormente por la adición de una mayor cantidad de trifenilfosfina y agua (reacción de Stäudinger)³. La adición de trifenilfosfina promueve la formación de un intermedio de tipo iminofosforano que se hidroliza en presencia de ácidos, o bien con un exceso de agua, generando óxido de trifenilfosfina y la amina de interés. (Figura A.4)

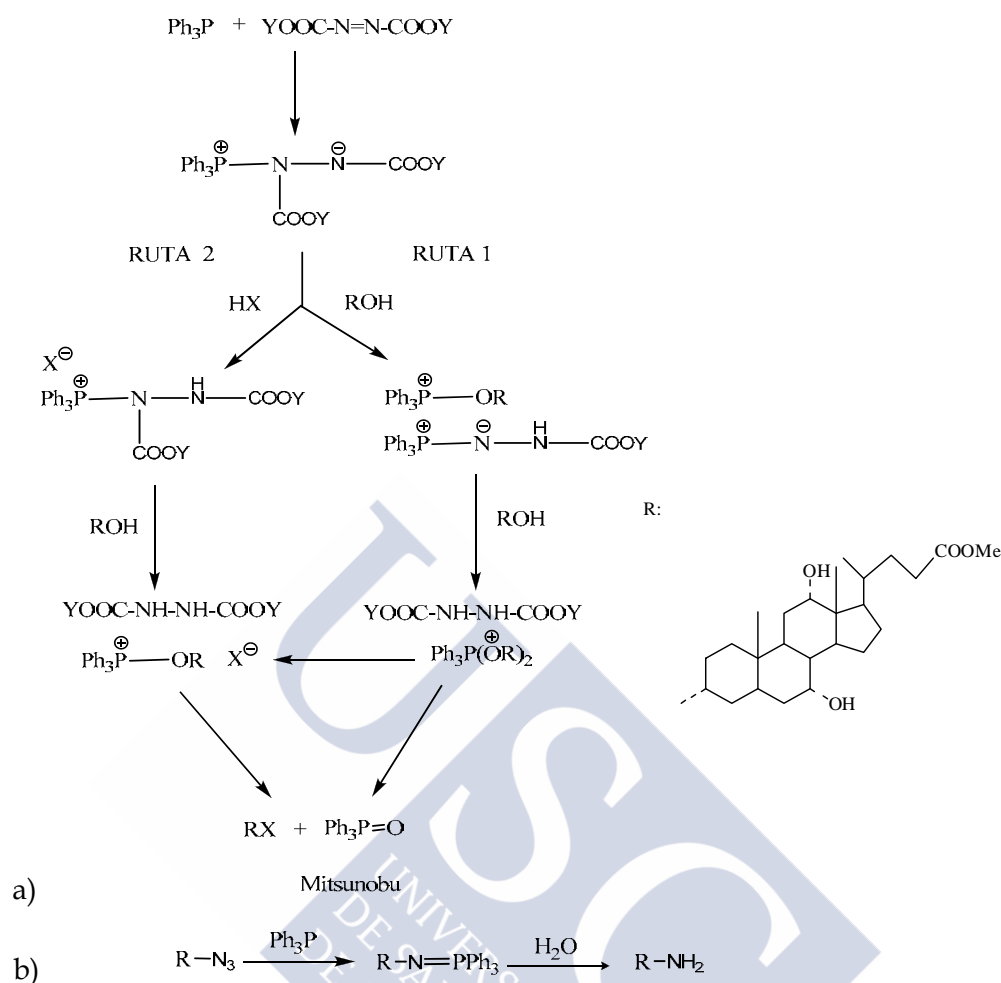


Figura A.4 - a) Mecanismo de una reacción de Mitsunobu y b) principales paso en el mecanismo de una reducción de Stäudinger.

Paso 1: protección del ácido terminal mediante formación del éster:

El primer paso de la secuencia sintética es la esterificación del ácido carboxílico y vendrá encaminado a la protección del grupo terminal del ácido cólico, mediante la formación de un éster metílico. Con ello evitaremos que se produzcan posibles reacciones laterales. El ácido cólico se disuelve en MeOH. Con un exceso de este favorecemos que el equilibrio de reacción se desplace hacia la derecha, usando medio ácido para catalizarla, llevando a cabo el proceso de esterificación del ácido y la obtención así del colato de metilo (Figura A.5).

Descripción del método: En un balón de 250 mL se agregan 0,067 mol (27,38 g) de ácido cólico, 125 mL de metanol y 1 mL de HCl concentrado. La mezcla se calienta a reflujo por espacio de una hora y después se enfría a temperatura ambiente. Luego se coloca en el matraz de fondo redondo en el congelador durante una noche. Al día siguiente, se filtran los cristales o precipitado del producto y se dejan secar durante 30

minutos al aire. Por último, se dejan por espacio de 8 horas en una estufa a vacío a la temperatura de 60°C. El producto se utiliza sin purificaciones adicionales para el resto de la secuencia. Rendimiento: 90-95%. Rf=0.36 en una mezcla de acetato de etilo:metanol 10:1 como eluyente. En los espectros de ¹H RMN se observa la aparición de una señal a δ ≈ 3.60 ppm correspondiente a los protones de OCH₃. En los espectros de ¹³C RMN también se observa la aparición de una nueva señal a δ ≈ 51 ppm correspondientes a este mismo grupo.

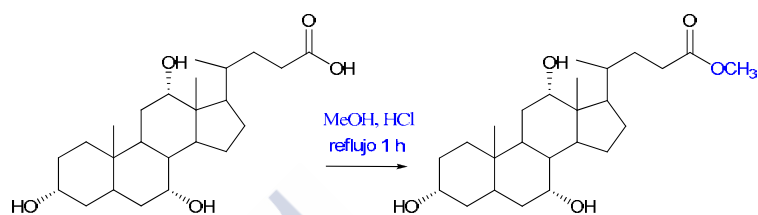


Figura A.5 - Protección del ácido terminal mediante esterificación

Paso 2: síntesis de los 3β aminoderivados:

En un segundo paso (Figura A.6) procederemos a la transformación del grupo hidroxilo de la posición 3 del núcleo esteroideo, en un grupo amino secundario con inversión de orientación del grupo funcional, ya que la orientación del grupo hidroxilo es α, mientras que en el caso de la amina la orientación es β. De este modo obtenemos el [3β,5α,7α,12α]-3-(amino)-7,12-dihidroxicolan-24-oato de metilo que abreviadamente denominaremos 3β-aminocolato de metilo.



Fig. A.6 - Preparación del 3β-aminocolato de metilo siendo, DIAD, diisopropil azodicarboxilato, para la activación del grupo hidroxilo; DPPA, difenilfosforilazida; THF, tetrahidrofurano.

Descripción del método: En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 1 L, provisto de agitador, embudo de adición de presión compensada y atmósfera de argón, se prepara una disolución de 21 g del colato de metilo en 500 mL de THF seco. Se añaden 13 g de Ph₃P y 10 mL de DIAD. Posteriormente se prepara en el embudo una disolución de 11 mL de DPPA en 50 mL de THF. Esta disolución se añade lentamente durante 30 minutos. Dejando posteriormente la mezcla en agitación durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se adicionan 13 g de Ph₃P y otros 10 mL de DIAD. Se agita durante 4 horas más y finalmente se adicionan otros 13 g de Ph₃P y 30 mL de agua, con el fin de lograr la reducción del grupo amino. Se deja la reacción en agitación durante 4 días. Para la separación del crudo de reacción se prepara una cabeza de

columna mediante la adsorción de la mezcla de reacción en suficiente gel de sílice, eliminando todo el THF en el rotavapor y dejando que se seque la cabeza hasta que quede un sólido suelto y fino, lo que indica que el producto está seco y adsorbido de manera adecuada sobre el gel de sílice. Se llenan dos columnas de 50×4,2 cm con gel de sílice hasta unos 41 cm aproximadamente, empacándolas con una mezcla 1:1 de acetato de etilo:metanol. La cabeza se distribuye en las dos columnas, debido a la gran cantidad de producto sintetizado. Se extrae alrededor de un 1L de este disolvente y luego se cambia la polaridad a una mezcla 95:5 metanol:trietilamina. Para seguir las reacciones, se usa esta última mezcla cromatográfica y como revelador ácido fosfomolibdico.

El producto final se obtuvo con rendimiento que varía entre el 45-55% del 3β aminocolato de metilo.

Caracterización del 3β aminocolato de metilo.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 3.96 (m, H₁₂); 3.85 (m, H₇); 3.66 (s, OCH₃); 3.19 (m, H₃); 2.25-1.00 (m, esqueleto esteroide); 0.99 (d, H₂₁, J=5.87 Hz); 0.94 (s, H₁₉); 0.68 (s, H₁₈).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ /ppm): 174.55, (C=O); 73.05 (C₁₂); 68.45 (C₇); 51.55 (OCH₃); 47.23-23.34 (C₁-C₆; C₈-C₁₁; C₁₃-C₁₇; C₂₀; C₂₂; C₂₃); 23.16 (C₁₉); 17.38 (C₂₁); 12.53 (C₁₈).

A.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS AdCH₂CA, Nb CH₂CA, AdC₂H₄CA, AdSuccCA, AdGlutCA y BocCys(Trt)COMe.

El método para realizar los acoplamientos de las moléculas seleccionadas, ácido 1-adamantanoacético y ácido 2-Norbornanoacético, se llevó a cabo a través de la formación del cloruro de ácido⁴⁻⁶, en el caso del ácido 1-adamantanopropanoico, ácido (N-adamantan-1-il) - succinámico y (N-adamantan-1-il) - Glutarámico con el 3β-aminocolato. El acoplamiento se realizó mediante DEPC según Willemen *et al.*⁷⁻⁹. Por último el acoplamiento del Boc-Cys(Trt)-OH se realizó mediante DIC/HOBt.

La secuencia seguida para la síntesis de estos compuestos consiste en la reacción del grupo amino de la sal biliar esterificada en la posición 24 con la molécula que deseamos acoplar según sea el caso, para la formación de un enlace amida. Posteriormente se procede a la hidrólisis del grupo éster de la cadena lateral de la sal biliar para, por último, formar la sal sódica. Figura A.7.

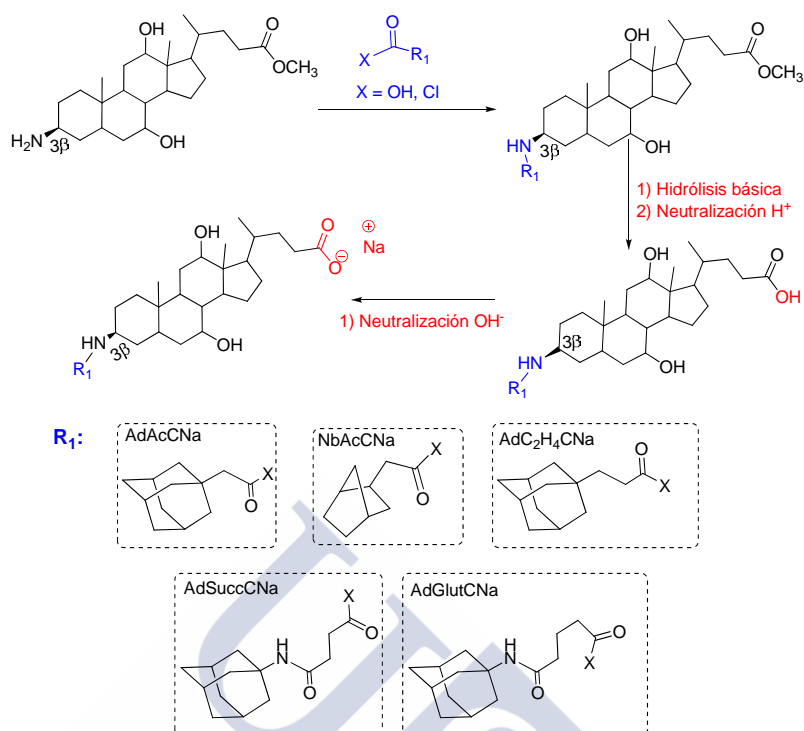


Fig. A.7 - Ruta sintética empleada para la obtención de los derivados de ácido cólico descritos.

A.1.1. Síntesis del compuesto: [3β, 5β, 7α, 12α]-3(adamantano-1-acetil)-amino-7-12-dihidroxicolan -24-oico (AdCH₂CA).

Para la síntesis del AdCH₂CA, en un balón de 25mL, se adicionan 0,59 g de ácido 1-adamantanoacético y 2 mL de cloruro de tionilo, con una trampa de CaCl₂ y un serpentín, manteniendo la mezcla a reflujo durante 2 h para la formación del cloruro de ácido correspondiente. Posteriormente el crudo de reacción es concentrado a vacío en el rotavapor para eliminar los componentes volátiles de reacción. En el siguiente paso de la reacción, se acopla el cloruro de ácido obtenido con el 3β-aminocolato de metilo, mediante una reacción de amidación. Para ello, en un balón seco de 50 mL y bajo atmósfera de N₂ se disuelven 1,5 g de amino colato en 20 mL de cloroformo y 2 mL de trietilamina (TEA). La mezcla se enfría en un baño de hielo con sal a una temperatura de entre -10 a -15 °C y se adiciona, gota a gota, con fuerte agitación, la disolución del cloruro de ácido obtenido del paso anterior en cloroformo. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, y pasado ese tiempo se realiza una placa cromatográfica del crudo eluyendo con una mezcla 20:1 acetato de etilo:metanol. El producto sintetizado tiene un R_f aproximado de 0.55. Una vez vista la evolución de la reacción se pasa a la evaporación del crudo mediante el rotavapor y la preparación de la cabeza para una columna de sílica gel empacándola y extrayendo el

producto con una mezcla 20:1 acetato de etilo:metanol. Posteriormente, éste es concentrado en el rotavapor y secado durante 12 h en estufa a vacío. El rendimiento resultante es del 40%, recuperándose de la columna el 3 β -aminocolato de metilo que no ha reaccionado arrastrado con una mezcla 95:5 metanol:TEA.

Para la obtención del producto final debemos de hidrolizar el ester de metilo, y para ello se ponen 1,8 g del producto protegido a reflujo con 25 mL de KOH 1M en H₂O o MeOH durante 1 h para asegurarse de que la desprotección es completa. A continuación se evapora el metanol y se suspende el producto en unos 400 mL de agua destilada, neutralizando la sal potásica con HCl_(c) hasta llevar la disolución a pH ácido, apareciendo una suspensión que se filtra y lava con abundante agua para arrastrar toda la sal que pueda haber quedado retenida hasta pH neutro. El producto obtenido se seca a 70 °C con P₂O₅ durante 12 h, se muele el producto seco y se deja a secar otras dos horas más. Para esta etapa el rendimiento es del 90%.

Cuando se desea trabajar con la sal sódica del AdCH₂CA, se disuelve el ácido con una cantidad estequiométrica de NaOH en agua, para producir la posterior precipitación de la sal formada con acetona. El precipitado formado se filtra y se realiza un proceso similar de secado al llevado a cabo con el ácido. Los restos del filtrado pueden volver a acidificarse con HCl_(c) para recuperar el producto en forma ácida.

Caracterización del ester metílico, AdCH₂COMe:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ /ppm): 7.38 (d NH-C₂₆=O); 3.55 (s OCH₃); 2.43-1 (núcleo esteroide y adamantano); 0.89 (d H₂₁); 0.84 (s H₁₉); 0.57 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 174.51 (O-C₂₄=O), 170.06 (NH-C₂₆=O), 71.72 (C₁₂), 66.98 (C₇), 51.86 (OCH₃), 23.53 (C₁₉), 17.59 (C₂₁), 12.99 (C₁₈).

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 598.55, [M+Na]⁺: 622.5, [M+K]⁺: 636.55; teórico M: 597.44, [M+Na]⁺: 620.43, [M+K]⁺: 636.40.

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1550-1650 vibraciones de deformación NH, 1375-1470 vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

Caracterización de la forma ácida AdCH₂CA:

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 584.40, [M+Na]⁺: 606.40, [M+K]⁺: 622.38; teórico M: 583.42, [M+Na]⁺: 606.41, [M+K]⁺: 622.39.

p.f. = 210 °C (es superior al del ácido litocólico, 184-6 °C, y al del ácido cólico, 198 °C).{{3621 Small,D.M. 1971}}

Caracterización de la sal sódica, AdCH₂CNa:

Análisis elemental (calculado para la fórmula C₃₆H₅₆NNaO₅·H₂O): C, 69.31; H, 9.37; N, 2.25; teórico C, 68.85; H, 9.61; N, 1.94

A.1.2. Síntesis del compuesto: [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(norborno-2-acetil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oico (NbCH₂CA).

Al igual que en el caso anterior (AdCH₂CA) fue sintetizado mediante la reacción de adición-eliminación entre el cloruro del ácido norbornano-2-acético y el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico.

Seguimos el mismo procedimiento que el descrito para el compuesto anterior observando ahora que el producto sintetizado tiene un R_f aproximado de 0.4. La purificación se llevó a cabo mediante columna cromatográfica de gel de sílice en una mezcla 20:1 acetato de etilo:metanol, resultado un sólido blanco en un rendimiento aproximado del 40%. Se procede de igual manera para la obtención del ácido y la sal correspondiente, con un rendimiento para esta última etapa de un 81%.

Debemos de mencionar que el compuesto obtenido es una mezcla de varias especies debido a que partimos de una mezcla de diastereoisómeros de ácido 2-norbornoacético, hecho que se pudo comprobar con los cristales obtenidos en los diferentes disolventes. Figura A.8.

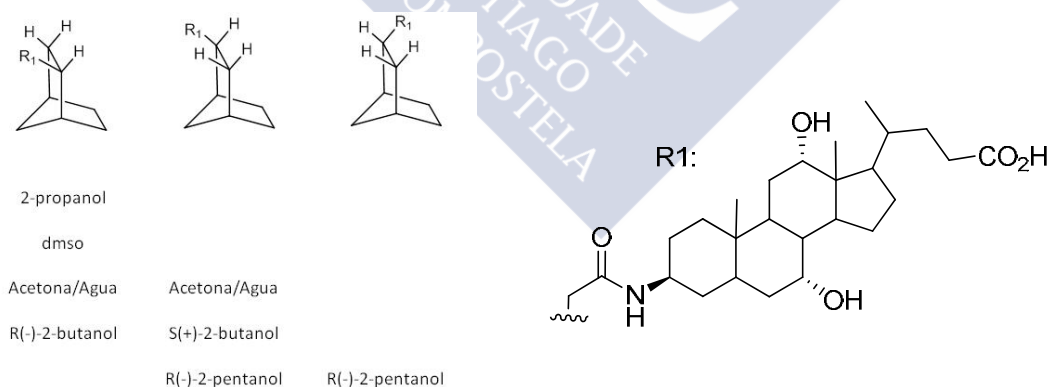


Fig. A.8 - 3 especies de diferentes de NbCH₂CA encontrados y los disolventes en los que fueron resueltos.

Caracterización del éster metílico del NbCH₂CA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 7.39 (d NH-C=O); 3.56 (s OCH₃); 2.43-1 (núcleo esteroide y norbornano); 0.90 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.57 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 174.45 (-O-C₂₄=O), 171.48 (NH-C₂₆=O), 71.77 (C₁₂), 67.02 (C₇), 51.80 (O-CH₃), 23.51 (C₁₉), 17.63 (C₂₁), 13.00 (C₁₈).

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): (Se incluyen los espectros correspondientes al éster de metilo) 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1500-1650 vibraciones de deformación NH, 1350-1500 vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

Caracterización del NbCH₂CA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ /ppm): 7.40 (d NH-C=O); 2.3-1 (núcleo esteroide y norbornano); 0.91 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.58 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 175.67 (HO-C₂₄=O), 171.56 (NH-C₂₆=O), 71.73 (C₁₂), 66.98 (C₇), 23.55 (C₁₉), 17.62 (C₂₁), 12.98 (C₁₈).

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z):M: 543.4, [M+Na]⁺: 566.4, [M+K]⁺: 582.5; teórico M: 543.8, [M+Na]⁺: 566.8, [M+K]⁺: 582.9.

Caracterización de la sal sódica del NbCH₂CA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ /ppm): 7.37 (d NH-C=O); 2.3-1 (núcleo esteroide y norbornano); 0.89 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.57 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 178.34 (-O-C₂₄=O), 171.51 (NH-C₂₆=O), 71.92 (C₁₂), 67.09 (C₇), 23.49 (C₁₉), 18.09 (C₂₁), 13.13 (C₁₈).

Análisis elemental (calculado para la fórmula C₃₃H₅₂NNaO₅.5H₂O): C, 60.23; H, 9.99; N, 2.11; teórico C, 60.44; H, 9.53; N, 2.14

p.f. = 188 °C (ligeramente superior al del ácido litocólico, 184-6 °C, e inferior al del ácido cólico, 198 °C)¹⁰.

A.1.3. Síntesis del compuesto: Ácido [3 β , 5 α , 7 α , 12 α]-3[3-((adamantano-1-il)-carbamoil-propil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-ocio, (AdSuccCA).

El compuesto fue sintetizado, como se describe a continuación, mediante la activación del ácido con dietil cianofosfonato (DEPC) y la posterior reacción de adición-eliminación entre el ácido 3-[(adamantano-1-il)-carbamoil]-propanoico activado y el éster de metilo del ácido 3- β -amino-cólico⁷⁻⁹.

Se disuelven 0,5 g de anhídrido succínico en 5 mL de DMF seca y se mezclan con 0,7 g de 1-adamantanoamina disuelta en 10 mL de DMF seca en un balón de 50 mL

perfectamente seco y con atmósfera de N₂, evitando de esta forma la hidrólisis del anhídrido. La reacción se enfría con un baño de hielo-agua y se añaden lentamente 2 mL de TEA en continua agitación. Una vez adicionada, se deja la reacción con agitación y atmósfera inerte a temperatura ambiente durante 16 horas. Una vez se ha completado la reacción se concentra y se redisuelve en metanol dejando que el ácido sintetizado cristalice en el frigorífico.

Una vez que se ha sintetizado el ácido a utilizar, se realiza el acoplamiento al 3β-amino colato de metilo mediante la activación del ácido con DEPC. Para ello en un balón de 50 mL con un agitador magnético, se pesan 1,96 g de 3β-amino colato de metilo y luego se añaden 1,17 g del ácido sintetizado en el paso anterior. A esta mezcla se añaden 35 mL de DMF seca bajo atmósfera inerte con N₂ y se agita con el fin de lograr una perfecta solubilización de los reactivos de partida.

Se enfría la mezcla de reacción a 0 °C en un baño de hielo-agua y se le añaden 0,83 mL de DEPC, después se adicionan gota a gota 3,5 mL de TEA durante 10 min. Una vez finalizada la adición se deja la mezcla en agitación a 0 °C durante 45 min, para posteriormente dejarla a temperatura ambiente durante 24 h. Por último, se evapora a presión reducida la DMF y la TEA y se extrae el producto deseado mediante una columna de sílica gel utilizando una mezcla de elución de 9:1 acetato de etilo:metanol. El rendimiento obtenido fue del 44%. El producto posee un R_f aproximado de 0,4 en una placa de capa fina utilizando la misma elución que la empleada en la columna cromatográfica.

De ser necesario, al igual que ocurría con los dos esteroides anteriores se puede realizar la desprotección del grupo carboxílico para generar el correspondiente ácido (AdSuccCA) y la transformación de este en la sal sódica correspondiente. El rendimiento global es del 39%.

Caracterización del AdSuccCOOMe:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 7.73 (d NH-C₂₆=O); 7.15 (d NH-C₂₉=O); 3.56 (s OCH₃); 2.43-1 (núcleo esteroide y adamantano); 0.90 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.58 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 174.47 (-O-C₂₄=O), 171.60 (NH-C₂₆=O), 171.58 (NH-C₂₉=O), 71.78 (C₁₂), 67.02 (C₇), 51.81 (O-CH₃), 23.41 (C₁₉), 17.64 (C₂₁), 13.00 (C₁₈).

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1590-1650 vibraciones de deformación NH, 1375-1470 vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 655.3, [M+Na]⁺: 677.4, [M+K]⁺: 693.3; teórico M: 654.9, [M+Na]⁺: 677.9, [M+K]⁺: 694.

Caracterización del AdSuccCA:

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): [M+Na]⁺: 663.5; teórico [M+Na]⁺: 663.5.

Caracterización de la sal sódica del AdSuccCOONa:

Análisis elemental (calculado para la fórmula C₃₃H₅₂NNaO₅·5H₂O): C, 60.62; H, 9.24; N, 3.72; teórico C, 60.60; H, 9.24; N, 3.72

A.1.4. Síntesis del compuesto: Ácido [3β, 5β, 7α, 12α]-3(adamantano-1-propil)-amino-7-12-dihidroxicolan -24-oico, (AdC₂H₄CA).

El compuesto fue sintetizado siguiendo el mismo procedimiento que el compuesto descrito en el apartado A.1.3 sin la necesidad de la síntesis del ácido, ya que en este caso el ácido que se acopla ya es comercial. El rendimiento global de la reacción es del 37%.

Caracterización de la forma ácida AdC₂H₄CA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 7.40 (d NH-C=O); 2.3-1 (núcleo esteroide y adamantano); 0.92 (d H₂₁); 0.88 (s H₁₉); 0.62 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 176.25 (HO-C₂₄=O), 174.04 (NH-C₂₆=O), 71.80(C₁₂), 67.02 (C₇), 22.05 (C₁₉), 15.62 (C₂₁), 11.18 (C₁₈).

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z):M: 598.5, [M+Na]⁺: 620.4, [M+K]⁺: 636.4; teórico M: 597.44, [M+Na]⁺: 620.44, [M+K]⁺: 636.44.

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1590-1650 vibraciones de deformación NH, 1375-1470 vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

A.1.5. Síntesis del compuesto: Ácido [3β, 5α, 7α, 12α]-3[3-((adamantano-1-il)-carbamoil-butyl)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de metilo (AdGlutCA).

La síntesis de este compuesto es idéntica a la seguida para el compuesto A.1.4, preparando primeramente el ácido mediante la reacción del 1-adamantanoamina con el anhídrido glutárico, para el posterior acoplamiento del ácido obtenido y el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico. El rendimiento global es del 44%.

Caracterización del AdGluCOOMe:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 7.50 (d NH-C₂₆=O); 7.12 (d NH-C₃₀=O); 3.55 (s OCH₃); 2.47-1 (núcleo esteroide y adamantano); 0.90 (d H₂₁); 0.84 (s H₁₉); 0.57 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 174.48 (-O-C₂₄=O), 171.99 (NH-C₂₆=O), 171.97 (NH-C₃₀=O), 71.77 (C₁₂), 67.02 (C₇), 51.82 (O-CH₃), 23.44 (C₁₉), 17.62 (C₂₁), 12.98 (C₁₈).

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 669.3, [M+Na]⁺: 693.4, [M+K]⁺: 708.8; teórico M: 668.5, [M+Na]⁺: 691.5, [M+K]⁺: 707.5.

Caracterización del AdSuccCA:

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 655.0, [M+Na]⁺: 677.1, [M+K]⁺: 693.0; teórico M: 654.5, [M+Na]⁺: 677.5, [M+K]⁺: 693.5.

Caracterización de la sal sódica del AdSuccCOONa:

Análisis elemental (calculado para la fórmula C₃₉H₆₁N₂NaO₆·3H₂O): C, 64.29; H, 9.63; N, 3.78; teórico C, 64.08; H, 9.24; N, 3.83, p.f = 194.32 °C.

A.1.6. Síntesis del compuesto: [3β, 5α, 7α, 12α]- 3 [(2-N-tert-butoxicarbonil-3-S-tritil-propil) -amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de metilo (BocCys(Trt)COOMe).

El compuesto fue sintetizado mediante la reacción entre la N-(tert-butoxicarbonil)-S-tritil-L-cisteína (BOC-Cys(Trt)-OH) previamente activada con diisopropilcarbodiimida (DIC)¹¹ seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico, figura A.9. Las líneas generales de todo el proceso se describen a continuación.

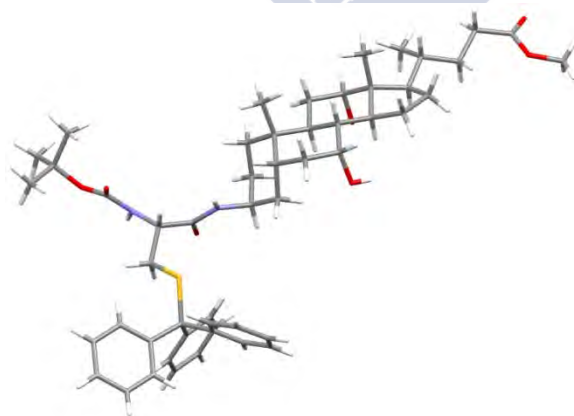


Fig. A.9 - Molécula Boc-Cys(Trt)-COMe.

En un balón de 50 mL con un agitador magnético y atmósfera de nitrógeno, se añaden 1.16 g de Boc-Cys(Trt)-OH en 10 ml de DMF seca y se adicionan gota a gota

sobre la amina 0,47 mL de DIC y 0.4 g de HOBt disueltos en otros 5 ml de DMF seca, y se agita durante unos 60 min para permitir una perfecta activación del ácido. A continuación se adicionan gota a gota 1 g de 3β-amino colato de metilo disuelto en 5 mL de DMF seca y se deja la mezcla 24 h en agitación.

Por último, se evaporara a presión reducida la DMF para luego extraer el producto deseado mediante una columna de sílica gel utilizando una mezcla de elución de 8:2 acetato de etilo:hexano, obteniéndose un rendimiento global del 60%. El producto posee un Rf aproximado de 0,55 en una placa de capa fina utilizando la misma elución que la empleada en la columna cromatográfica. Con la misma metodología que la seguida y expuesta anteriormente, el producto en forma de éster puede hidrolizarse para generar el correspondiente ácido (BocCys(Trt)CA), y este ser neutralizado para obtener la sal sódica.

Caracterización del BocCys(Trt)COOMe:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 7.40-7.28 (d NH-C₂₆=O, d NH-C₂₉ y fenilos); 3.57 (s OCH₃); 2.43-1 (núcleo esteroide); 1.36 (s, tert-butilo); 0.92 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.59 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 173.64 (-O-C₂₄=O); 169.00 (NH-C₂₆=O); 144.14 (NH-C₂₉=O); 128.88, 127.83, 126.55 (C_{Ar}); 70.93 (C₁₂), 66.13 (C₇), 51.00 (O-CH₃), 27.97 (C_{31,32,33}), 22.66 (C₁₉), 16.79 (C₂₁), 12.16 (C₁₈).

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1630 vibración Ar-, 1550-1625 vibraciones ArC-C, 1590-1650 vibraciones de deformación NH, 1375-1470 vibraciones de deformación simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 1240-1260 vibraciones de deformación -C(CH₃)₃, 950-1100 vibraciones de tensión C-O grupos C-OH.

Masas (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z [M+Na]⁺: 889.3, [M+K]⁺: 905.4; teórico M:866.5, [M+Na]⁺: 889.5, [M+K]⁺: 905.5

Nota: Este compuesto no se ha probado con las NPs de Au debido a que ha quedado la parte de las desprotección del grupo amino y tiol sin finalizar.

A.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS CON GRUPOS TIOLES. Dímero BisMer-AEDT-BisCA, TioGlyCA y MerProCA.

A.2.1. Síntesis del dímero bis(mercatioetilamina)bis(colatosódico) de AEDT, BisMer-AEDT-BisCA.

El compuesto fue sintetizado previa preparación del anhídrido de AEDT, en un primer paso, para luego la reacción con la cisteamina para la formación de un enlace amida y la formación del dímero de AEDT con los grupos tioles. El compuesto final fue sintetizado mediante la reacción entre este dímero de AEDT previamente activado con DEPC, seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3- β -amino-cólico. Las líneas generales de todo el proceso se describen a continuación.

En una primera etapa se ha preparado el anhídrido de AEDT, mediante el empleo de anhídrido acético (Panreac, 98%) y AEDT (Panreac), se hace reaccionar en un matraz de fondo redondo de 100 mL, 18.2 g de AEDT, 24 mL de anhídrido acético y 31 mL de piridina (al 99%) a 70°C, a reflujo durante 24 h con trampa de CaCl₂. Una vez ha finalizado la reacción se filtra el producto obtenido y se lava con anhídrido acético y éter etílico. El rendimiento de la reacción es del 95%. Anhídrido acético p.f. teórico 170°C, p.f. medido 170°C.

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ /ppm): 3.69 (s CH₂); 2.66 (s CH₂).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 166.34 (-O-C=O); 53.01 (CH₂); 51.95 (CH₂).

En un segundo paso de reacción, hacemos reaccionar en un matraz de fondo redondo de 50 ml, 5g de anhídrido de AEDT con 3.32g de mercaptoamina en n-metilpirrolidona, 20ml empleado como disolvente, se realiza en atmósfera inerte con nitrógeno y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 4 h. Una vez transcurrido este tiempo se ha producido la apertura del anhídrido y la formación del enlace amida, el crudo de reacción se hace gotear sobre acetona en agitación para que el producto precipite en forma de polvo blanco, se filtra rápidamente y se seca el producto obtenido a vacío durante 48h, obteniéndose el puente deseado con un rendimiento del 73%.

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ /ppm): 8.07 (m NH), 3.36 (m CH₂); 3.22 (s CH₂); 3.21 (s CH₂); 2.71 (m CH₂); 2.53 (s CH₂).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ /ppm): 173.18 (HO-C=O); 171.20 (NH-C=O); 58.29 (CH₂); 56.08 (CH₂); 53.10 (CH₂); 42.49 (CH₂); 24.19 (CH₂).

El tercer paso consiste en la reacción entre el puente preparado anteriormente previamente activada con DEPC, seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3- β -amino-cólico. Las líneas generales de todo el proceso se describen a continuación.

En un balón de 50 mL con un agitador magnético y atmósfera inerte de nitrógeno, se añaden 0,96 g de puente preparado en el paso anterior en 10 mL de N-metil

pirolidona (seca) y se enfría a 0°C, se añaden 0.85 mL de DEPC y 4.25 mL de TEA durante 10 min. A continuación se adicionan gota a gota 2 g de 3β-amino colato de metilo disuelto en 6.5 mL de N-metil pirrolidona (seca), al principio el aspecto es turbio, por lo que se puede calentar ligeramente hasta que los productos se disuelven completamente, dejando la mezcla 24 h en agitación a temperatura ambiente.

Se precipita el producto obtenido sobre aprox. 1 L de Agua destilada, formándose un precipitado blanco muy fino que se filtra en una placa 4, secando el producto a vacío a temperatura ambiente. La purificación se realiza en una columna cromatográfica como ya mencionamos en los productos anteriores con una mezcla de elución MeOH:TEA 95:5.

El producto puede ser recristalizado en MeOH/H₂O, para alcanzar una mayor pureza, pero no se han conseguido obtener cristales para la resolución por difracción de R-X.

¹H RMN of the methyl ester of BisMer-AEDT-BisCA (DMSO, 300 MHz, δ/ppm):
 8.20 (t, NH-C=O); 7.77 (d, NH-C=O); 3.31 (s, OCH₃); 3.56-2.47 (s, CH₂ - bridge protons)
 2.43-1 (steroid nucleus protons); 0.91 (d, H₂₁); 0.84 (s, H₁₉); 0.57 (s, H₁₈).

¹³C RMN of the methyl ester of BisMer-AEDT-BisCA (DMSO; 75 MHz, δ/ppm):
 174.50 (-O-C₂₄=O), 171.37 (NH-C=O), 170.11 (NH-C=O), 71.78 (C₁₂), 67.01 (C₇), 51.83 (OCH₃), 23.40 (C₁₉), 17.63 (C₂₁), 12.98 (C₁₈).

MALDI-TOF, SDHB matrix, m/z: M: 12.4, [M+Na]⁺: 1215.8, [M+2K]⁺: 1299.3; teórico M: 1216.75, [M+2K]⁺: 1294.75, se observa que existe un 12% de dímero de la moléculas sintetizada con M: 2431.0, indicativo de la existencia de un pequeño porcentaje de moléculas unidas mediante un puente disulfuro.

El último paso sería al igual que sucedía con todos los anteriores productos sintetizados, desproteger el grupo carboxílico, mediante la hidrólisis básica y neutralización ácida, para pasar a la formación de la posterior sal sódica. Para ello 1 g de dímero se hace reaccionar con 1,56g de KOH en 25 mL de MeOH en un matraz de fondo redondo, a reflujo durante 6 horas. Durante la reacción aparece un precipitado que filtramos y el líquido con cierta coloración amarilla lo echamos sobre H₂O con pH ácido (con HCl). La sal la obtenemos mediante la neutralización básica con NaOH.

MALDI-TOF of the BisMer-AEDT-BisCA, SDHB matrix, m/z: M: 1189.70; teórico M: 1188.72, se observa que existe un 12% de dímero de la moléculas sintetizada con M: 2476.2, indicativo de la existencia de un pequeño porcentaje de moléculas unidas mediante un puente disulfuro.

Si queremos reducir los posibles puentes disulfuros formados, la sal o el ácido del dímero lo tratamos con Zn, para ello 181 mg de compuesto disuelto en 10 mL de MeOH/THF, se le añaden 20 mg de Zn en polvo y 2,5 mL de HCl 10%, se mantiene en agitación durante 4h, luego se filtra para separa el polvo de Zn y se lava con MeOH, este se concentra en el rotavapor y se disuelve en la mínima cantidad de agua para luego precipitarlo de nuevo en acetona y así recuperar la sal o ácido con un mayor grado de pureza. La sal la obtenemos mediante la neutralización básica con NaOH. El rendimiento obtenido fue del 32%. Figura A.10

¹H RMN of BisMer-AEDT-BisCA (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 8.21 (t, NH-C=O); 7.77 (d, NH-C=O); 3.76-2.47 (s, CH₂ - protones del puente) 2.43-1 (protones del núcleo esteroide); 0.89 (d, H₂₁); 0.84 (s, H₁₉); 0.57 (s, H₁₈).

MALDI-TOF of the BisMer-AEDT-BisCA, SDHB matrix, m/z: M: 1187.6; teóricoM: 1188.72, se observa la desaparición del dímero.

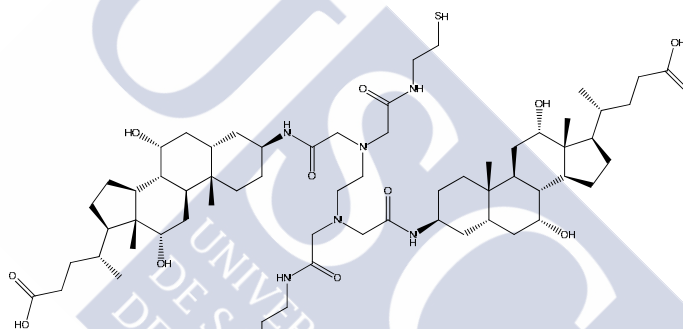


Fig. A.10 - Molécula BisMer-AEDT-BisCA.

A.2.2. Síntesis del [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(tioglicoil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de sodio, TioGlyCA.

El compuesto fue sintetizado mediante la reacción entre el ácido tioglicólico previamente activado con diisopropilcarbodiimida (DIC)¹¹ seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico. Las líneas generales de todo el proceso se describen a continuación. Figura A.11

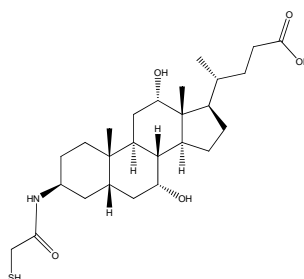


Fig. A.11 - Molécula TioGlyCA.

En un matraz de fondo redondo de 50 ml se adicionan 0.94 mL de DIC y 0.81 g de HOBt en 5 mL de DMF seca en agitación sobre 0.35 ml de ácido tioglicólico disueltos en 10 mL de DMF seca, en continua agitación y en atmósfera inerte de N₂ se deja activando durante 60 min, pasado este tiempo se adiciona 2 g del éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico disueltos en 5 mL de DMF seca, se deja 24h en agitación. El crudo de reacción se precipita con H₂O/HCl y se filtra, secando a vacío a temperatura ambiente. La reacción puede seguirse mediante EtOH:CHCl₃ 10%. Para la purificación del compuesto se realiza una columna cromatográfica Acetato de Etilo:Metanol 4:6, siendo el R_f del compuesto de 0.48. La desprotección del éster de metilo se realiza siguiendo el mismo sistema ya descrito anteriormente. Al igual que sucedía con el compuesto anterior, podemos eliminar los puentes disulfuros formados mediante el empleo de Zn. Así a 0.5 g de compuesto en 35 mL THF/MeOH le añadiremos 35 mg de Zn y 3.5 mL de HCl(10%) manteniéndolos en agitación durante 4 horas, tras los cuales recuperaremos el producto obtenido mediante filtración. El rendimiento obtenido fue del 42%.

Caracterización del TioGlyCOMe:

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ/ppm): (Se incluyen los espectros correspondientes al éster de metílico por la posición 24: 6.97 (d NH-C=O); 4.11 (m H₃); 3.98 (m H₁₂); 3.86 (m H₇); 3.66 (s OCH₃); 2.8-1 (núcleo esteroide); 0.99 (d H₂₁); 0.96 (s H₁₉); 0.70 (s H₁₈).

¹³C RMN (CDCl₃; 75 MHz, δ/ppm): 173.58 (-O-C₂₄=O), 167.07 (NH-C₂₆=O), 71.85 (C₁₂), 67.21 (C₇), 50.39 (O-CH₃), 22.3 (C₁₉), 16.32 (C₂₁), 11.52 (C₁₈).

Análisis elemental: (calculado para la fórmula C₂₇H₄₅NO₅S.H₂O): C, 63.31; H, 9.05; N, 2.86; S, 6.24; teórico C, 63.13; H, 9.22; N, 2.73; S, 9.22.

Caracterización del TioGlyCA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): (Se incluyen los espectros correspondientes al ácido) 7.40 (d NH-C=O); 2.3-1 (núcleo esteroide); 0.91 (d H₂₁); 0.85 (s H₁₉); 0.58 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 175.67 (HO-C₂₄=O), 171.56 (NH-C₂₆=O), 71.73 (C₁₂), 66.98 (C₇), 23.55 (C₁₉), 17.62 (C₂₁), 12.98 (C₁₈).

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z):M: 543.4, [M+Na]⁺: 566.4, [M+K]⁺: 582.5; teórico M: 543.8, [M+Na]⁺: 566.8, [M+K]⁺: 582.9.

A.2.3. Síntesis del dímero [3β, 5α, 7α, 12α]-3[(mercaptopropanoil)-amino]-7-12-dihidroxicolan-24-oato de sodio, MerProCA.

El compuesto fue sintetizado mediante la reacción entre el ácido mercaptopropanoico previamente activado con diisopropilcarbodiimida (DIC)¹¹ seguida de la reacción de sustitución-eliminación con el éster de metilo del ácido 3-β-amino-cólico. Las líneas generales de todo el proceso se describen a continuación. Figura A.11

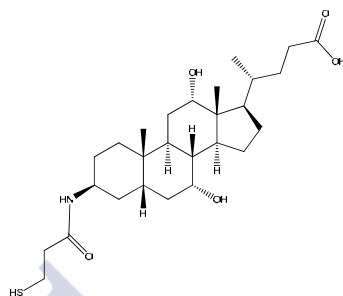


Fig. A.11 - Molécula MerProCA.

La secuencia sintética es la misma que la del compuesto anterior, empleando ahora 0.436ml de ácido mercaptopropiónico. El rendimiento obtenido fue del 40%.

Caracterización del MerProCOMe:

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ/ppm): (Se incluyen los espectros correspondientes al éster de metílico por la posición 24: 7.26 (d NH-C=O); 4.14 (m H₃); 3.98 (m H₁₂); 3.85 (m H₇); 3.66 (s OCH₃); 2.8-1 (núcleo esteroide); 0.98 (d H₂₁); 0.95 (s H₁₉); 0.70 (s H₁₈).

¹³C RMN (CDCl₃; 75 MHz, δ/ppm): 174.86 (-O-C₂₄=O), 170.7 (NH-C₂₆=O), 73.15 (C₁₂), 68.43 (C₇), 51.62 (O-CH₃), 23.37 (C₁₉), 17.55 (C₂₁), 12.76 (C₁₈).

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z):[M+Na]⁺: 529.5, [M+K]⁺: 549.0; teórico M: 509.32, [M+Na]⁺: 532.32, [M+K]⁺: 548.32.

Caracterización del MerProCA:

¹H RMN (DMSO, 300 MHz, δ/ppm): 6.71 (d NH-C=O); 3.97 (m H₃); 3.83 (m H₁₂); 3.71 (m H₇); 2.3-1 (núcleo esteroide); 0.93 (d H₂₁); 0.88 (s H₁₉); 0.62 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO; 75 MHz, δ/ppm): 174.35 (HO-C₂₄=O), 171.70 (NH-C₂₆=O), 72.56 (C₁₂), 67.84 (C₇), 23.37 (C₁₉), 17.52 (C₂₁), 12.75 (C₁₈).

A.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS POR LA POSICIÓN 24. ID, IDH, IDEDA E IDEDA.

A.2.1. Síntesis del ID.

La síntesis de este compuesto ya ha sido descrita con anterioridad en otros trabajos del grupo ya que ha sido empleada como unidad estructural en el ensamblaje de dendrímeros y otros derivados de sales biliares. Figura A.12.

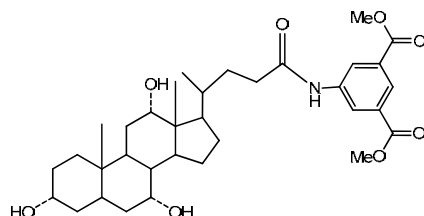


Fig. A.12 - Molécula ID, molécula de partida para la síntesis del resto de moléculas.

A.2.2. Síntesis del IDH.

El ID se obtiene de la simple hidrólisis básica y neutralización ácida de los ésteres de metilo, como ya habíamos descrito en los apartados anteriores para el resto de moléculas anteriores cuando desprotegíamos el ácido carboxílico de la posición 24. Figura A.13. Rendimiento obtenido del 90%.

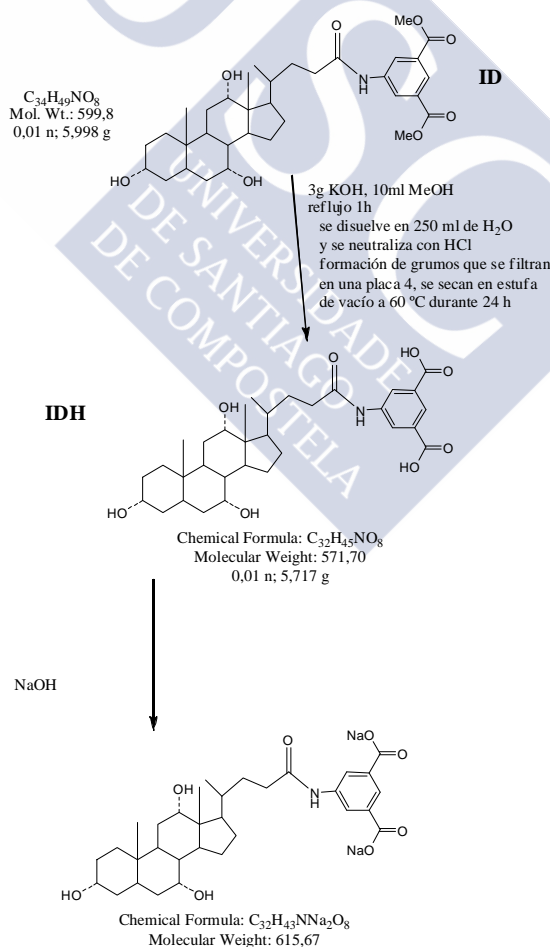


Fig. A.13 - Molécula IDH, molécula empleada para las mezclas catiónicas.

¹H RMN (DMSO, CDCl₃; 300 MHz, δ/ppm): 9.69 (s NH-C₂₄=O); 8.38 (s H_{Af}); 8.22 (s H_{Af}); 4-3.2 (m H₃, m H₇, m H₁₂), 2.5-1 (núcleo esteroide); 0.95 (d H₂₁); 0.78 (s H₁₉); 0.58 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO, CDCl₃; 75 MHz, δ/ppm): 173.04 (HO-C₂₉=O); 167.55 (NH-C₂₄=O); 140.03 C₂₆; 132.03 (C₂₈); 125.64 (C₃₀); 124.76 (C₂₇); 72.66 (C₁₂), 71.62 (C₃), 67.89 (C₇), 46.97, 46.60 C, 42.00, 41.95, 40.03, 39.93, 35.71, 35.63, 35.15, 34.97 C, 34.22, 31.84, 30.79, 29.74, 28.74, 27.76, 26.71, 23.41, 22.86 (C₁₉), 17.69 (C₂₁), 12.83 (C₁₈).

DEPT¹³⁵ RMN (DMSO, CDCl₃; 75 MHz, δ/ppm): 125.64 CH; 124.76CH, 72.67 CH, 71.62 CH, 67.89 CH, 46.97 CH, 42.00 CH, 41.95 CH, 40.03 CH₂, 39.93 CH, 35.71 CH₂, 35.63 CH, 35.15 CH₂, 34.22 CH₂, 31.84 CH₂, 30.79 CH₂, 29.74 CH₂, 28.74 CH₂, 27.76 CH₂, 26.71 CH, 23.41 CH₂, 22.86 CH₃, 17.69 CH₃, 12.83 CH₃.

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/cm⁻¹): (Se incluyen los espectros correspondientes al éster de metilo) 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH₂, CH₃, 1700 vibraciones de tensión grupos C=O, 1590-1650 vibraciones de deformación NH, 1375-1470 vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): [M-3OH]: 519.13, [M-2OH]: 536.77, [M+Na]⁺: 594.47, [M+K]⁺: 610.43; teórico [M-3OH]: 519.30, [M-2OH]: 537.31, [M+Na]⁺: 594.30, [M+K]⁺: 610.28.

Análisis elemental: (calculado para la fórmula C₃₂H₄₅NO₈·2H₂O): C, 63.46; H, 8.00; N, 2.29; teórico C, 63.24; H, 8.13; N, 2.30

A.2.3. Síntesis del IDEDA.

Al igual que para la síntesis de la molécula anterior, para la síntesis del IDEDA, se parte de ID que se hace reaccionar con etilendiamina, para dar lugar a la molécula deseada. Figura A.14.

Así se mezclan en un matraz de fondo redondo 1 g de ID en 10 mL de etilendiamina mediante agitación fuerte durante dos horas, la reacción se sigue mediante placa cromatográfica Metanol:Acetato de Etilo en relación 9:1, observando la transformación del éster y la formación del enlace amida, ya que el ID tiene un rf de 0.5 y el IDEDA rf de 0. Al finalizar la reacción se evapora la etilendiamina en el rotavapor, adicionando en varias veces diclorometano para eliminar el exceso de diamina. El sólido hidroscópico se disuelve en una cantidad mínima de MeOH y se precipita con acetato de etilo. El producto se purifica finalmente en una columna cromatográfica pasando una disolución 1:1 acetato de etilo:Metanol y posteriormente una disolución 95:5 de trietilamina:metanol, para arrastrar el IDEDA. El producto final obtenido se

concentra en el rotavapor, se redisuelve en MeOH y se precipita en dietil éter. Rendimiento obtenido: 80%.

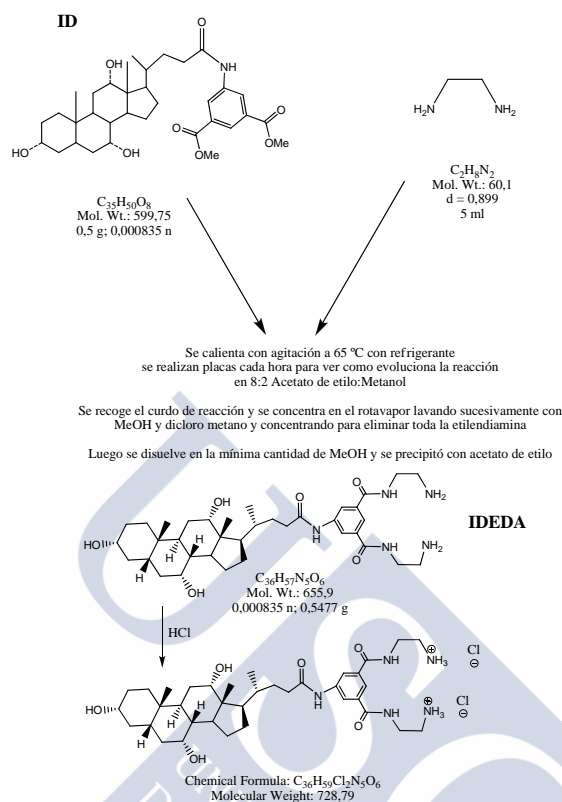


Fig. A.14 – Molécula IDEDA, molécula empleada para las mezclas catiónicas.

1H RMN (DMSO, $CDCl_3$; 300 MHz, δ/ppm): 9.94 (s NH- $C_{24}=O$); 8.66 (t NH- $C_{29}=O$); 8.41 (s H_{Ar}); 8.24 (s H_{Ar}); 4.69 (sa -OH); 4-3.2 (m H_3 , m H_7 , m H_{12}); 3.56 (t H_{31}); 3.01 (t H_{32}) 2.5-1 (núcleo esteroide); 2.05 (s - NH_2); 0.96 (d H_{21}); 0.79 (s H_{19}); 0.58 (s H_{18}).

^{13}C RMN (DMSO, $CDCl_3$; 75 MHz, δ/ppm): 172.89 (-NH- $C_{24}=O$); 167.08 (NH- $C_{29}=O$); 140.33 C_{26} ; 135.00 (C_{28}); 121.96 (C_{27}); 121.00 (C_{34}); 79.20 C, 72.16 (C_{12}), 71.38 (C_3), 67.36 (C_7), 46.81, 46.53 C, 42.14, 42.04, 40.23, 39.83 C, 39.15, 35.88, 35.76, 35.41, 35.03 C, 34.16, 31.98, 30.97, 29.03, 27.90, 26.85, 23.45, 23.07 (C_{19}), 17.74 (C_{21}), 12.90 (C_{18}).

DEPT 135 RMN (DMSO, $CDCl_3$; 75 MHz, δ/ppm): 121.96 CH; 121.00 CH; 72.15 CH, 71.38 CH, 67.35 CH, 46.80 CH, 42.15 CH, 42.14 CH, 42.04 CH, 40.23 CH_2 , 40.16 CH_2 , 39.13 CH_2 , 35.88 CH_2 , 35.76 CH, 35.41 CH_2 , 34.15 CH_2 , 31.98 CH_2 , 30.96 CH_2 , 29.02 CH_2 , 27.89 CH_2 , 26.85 CH, 23.44 CH_2 , 23.07 CH_3 , 17.74 CH_3 , 12.90 CH_3 .

Espectroscopía IR (Golden-Gate, posición de la banda/ cm^{-1}): (Se incluyen los espectros correspondientes al ácido) 3600-3200 vibraciones de tensión OH y NH, 2800-3000 vibraciones de tensión de CH, CH_2 , CH_3 , 1639 vibraciones de tensión grupos $C=O$, 1590-1650 vibraciones de deformación NH y tensión simétrica $N-C=O$, 1375-1470

vibraciones de deformación: simétricas y asimétricas para el CH₃ y balanceo CH₂, 950-1100 tensión C-O grupos C-OH.

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 656.46, [M+Na]⁺: 678.50, [M+K]⁺: 694.48; teórico M: 655.43, [M+Na]⁺: 678.42, [M+K]⁺: 694.39. Se ha formado un 11.4% de dímero tras la cristalización en MeOH:acetato de etilo el dímero pasa a 2.4%.

A.2.4. Síntesis del IDEDAC.

La síntesis de esta molécula será una continuación de la secuencia sintética desarrollada para la molécula anterior, así que partiendo de 1g de IDEDA lo disolvemos en 400 mg de piridina en un matraz de fondo redondo, con atmósfera inerte de nitrógeno y en baño de hielo a 0°C, añadimos gota a gota 0.16 mL de anhídrido acético, manteniendo la agitación durante 2 h más a temperatura ambiente. La solución es concentrada y purificada mediante columna cromatográfica con mezcla de dilución diclorometano/metanol 85:15, para la obtención de un producto de más pureza el producto se cristaliza en iPrOH/Et₂O 85:15. El rendimiento de la reacción es de un 81%. Figura A.15

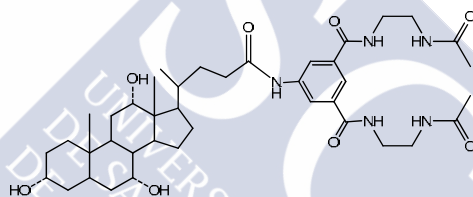


Fig. A.15 - Estructura de la molécula sintetizada IDEDAC.

¹H RMN (DMSO, CDCl₃; 300 MHz, δ/ppm): 10.06 (s NH-C₂₄=O); 8.42 (t NH-C₃₄=O); 7.89 (t NH-C₂₉=O); 8.13 (s H_{Ar}); 7.87 (s H_{Ar}); 4.2-3 (m H₃, m H₇, m H₁₂, t H₃₁, t H₃₂) 2.5-1 (núcleo esteroide); 2.05 (s -NH₂); 0.97 (d H₂₁); 0.80 (s H₁₉); 0.59 (s H₁₈).

¹³C RMN (DMSO, CDCl₃; 75 MHz, δ/ppm): 173.52 (-NH-C₂₄=O); 172.81 (NH-C₃₄=O); 166.88 (NH-C₂₉=O); 140.13 C₂₆; 136.08 (C₂₈); 121.39 (C₂₇); 120.92 (C₃₉); 71.77 (C₁₂), 71.17 (C₃), 66.99 (C₇), 23.03 (C₁₉), 17.70 (C₂₁), 13.07 (C₁₈).

Masas: (MALDI-TOF, matriz SDHB, m/z): M: 744.35, [M+Na]⁺: 762.40, [M+K]⁺: 778.33; teórico M: 739.45, [M+Na]⁺: 762.45, [M+K]⁺: 778.45.

Las moléculas PyrCOOMe, AdCA y AdCOOMe han sido sintetizadas en trabajos previos del grupo. En la presente tesis han sido empleadas para el estudio de cristalización de las mismas y para su posible comparación con el resto de moléculas aquí desarrolladas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Perrin, D. & Armarego, W. *Purification in laboratory Chemicals*. Pergamon Press 2nd ed. (1985).
- 2 Anelli, P. L., Lattuada, L. & Uggeri, F. One-pot Mitsunobu-Staudinger preparation of 3-aminocholan-24-oic acid esters from 3-hydroxycholan-24-oic acid esters. *Synth. Commun.* 28, 109-117 (1998).
- 3 Koehn, M. & Breinbauer, R. The Staudinger ligation - A gift to chemical biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 3106-3116 (2004).
- 4 Gouin, S. & Zhu, X. X. Fluorescence and NMR Studies of the Effect of a Bile Acid Dimer on the Micellization of Bile Salts. *Langmuir* 14, 4025-4029 (1998).
- 5 Gouin, S. & Zhu, X. X. Synthesis of 3a- 3b-dimers from selected bile acids. *Steroids* 61, 664-669 (1996).
- 6 Kluger, R., Lock-O'Brien, J. & Teytelboym, A. Connecting Proteins by Design. Cross-Linked Bis-Hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6780-6785 (1999).
- 7 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. N-Cholyl amino acid alkyl esters - a novel class of organogelators. *Eur. J. Org. Chem.*, 2329-2335 (2001).
- 8 Willemen, H. M., Vermonden, T., Marcelis, A. T. M. & Sudholter, E. J. R. Alkyl Derivatives of Cholic Acid as Organogelators: One-Component and Two-Component Gels. *Langmuir* 18, 7102-7106 (2002).
- 9 Anelli, P. L. *et al.* L-Glutamic acid and L-lysine as useful building blocks for the preparation of bifunctional DTPA-like ligands. *Bioconjugate Chem.* 10, 137-140 (1999).
- 10 Small, D. M. The Physical Chemistry of Cholanic Acids. in *The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism*; Nair, P. P., Kritchevski, D., Eds.; Plenum Press: New York. Chapter 8, 249-356 (1971).
- 11 Soto Tellini, V. H. Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares, Tesis Doctoral* (2006).

