



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Síntesis y caracterización de anfifilos catiónicos basados en
bipiridinio con resposta a estímulos**

**Síntese e caracterización de anfifilos catiónicos baseados en
bipiridinio con resposta a estímulos**

**Synthesis and characterization of stimuli-responsive bipyridinium-
based cationic amphiphiles**

Lucía Galdo Blasco

Curso: 2022 - 2023. Convocatoria: Julio

Director/a 1: Carlos Peinador Veira
Director/a 2: Arturo Blanco Gómez

AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo a mis tutores Arturo Blanco Gómez y Carlos Peinador Veira por permitirme trabajar en este proyecto, por su guía, sus explicaciones y su esfuerzo corrigiendo este tfg.

Gracias también al resto del grupo de investigación Natalia, Mauro y en especial Alex por todo el tiempo que me dedicasteis en el laboratorio, vuestra ayuda y consejos.

Agradezco a mis compañeros de clase por tanta compañía y risas en la universidad, sobre todo gracias por aguantarme y de nada por ser aguantados Arlinn, Nerea, Alicia, Andrea Carolina (sin ti no habría comas en este tfg) y Vicky.

ÍNDICE

RESUMEN	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Introducción a la Química Supramolecular.....	13
1.2. Anfifilos y respuesta a estímulos	13
1.3. Antecedentes	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Procedimientos generales.....	21
3.1.1. Síntesis.....	21
3.1.2. Caracterización estructural	21
3.2. Síntesis y caracterización estructural de los precursores	22
3.2.1. Síntesis de las sales de piridinio (P1 y P2)	22
3.2.2. Caracterización estructural de los precursores P1 y P2	23
3.3. Síntesis y caracterización de los anfifilos Ac₁₆ y Ac₆	23
3.4. Caracterización de las propiedades ácido-base	29
3.4.1. Caracterización ácido-base en medio orgánico mediante RMN ¹ H.....	29
3.4.2. Caracterización ácido-base en medio acuoso.	30
3.5. Estudio de la agregación del Ac₁₆ en medio acuoso.....	33
4. EXPERIMENTAL.....	37
4.1. Reactivos, equipos.....	37
4.2. Síntesis del anfifilo Ac₆	38
4.2.1. Síntesis del precursor P3 :.....	38
4.2.2. Síntesis del precursor P1 :.....	38
4.2.3. Síntesis del Ac₆ por condensación de los precursores P1 y P3 :	39
4.3. Síntesis del anfifilo Ac₁₆	40
4.3.1. Síntesis del precursor P2 :.....	40
4.3.2. Condensación de los precursores P2 y P3 a Ac₁₆	41
4.4. Purificación por HPLC y metátesis.....	42
4.4.1. Purificación del producto por HPLC.....	42

4.4.2. Cambio de contraión a Cl.....	43
4.5. Estudios ácido-base.....	44
4.5.1. Cálculo del pKa por UV VIS y potenciometría.....	44
4.5.2. Cálculo de ϵ	46
4.5.3. DLS en medio ácido y básico.....	46
5. CONCLUSIONES.....	49
CONCLUSIÓN.....	50
CONCLUSIONS.....	51
ANEXOS.....	53

RESUMEN

El vermellógeno es una sal catiónica de piridinio derivada del viológeno, donde las unidades piridínicas se unen mediante un enlace hidrazona. Lo cual permite que el compuesto responda al pH, debido a la acidez del NH, y evitar los problemas de citotoxicidad de la respuesta redox del viológeno. Se sintetizaron dos derivados del vermellógeno, uno de cadena larga y otro de cadena corta. Para ello se siguió la misma metodología en ambos casos, a partir de reactivos comerciales, mediante reacciones S_N2 y S_NAr , se obtuvieron primero los dos precursores necesarios. Después, a través de una reacción de síntesis de hidrazonas, se obtuvo el producto final, siendo purificado por HPLC o metátesis. A continuación, se caracterizaron estructuralmente con las técnicas espectroscópicas habituales, RMN ^{13}C y 1H monodimensional y bidimensional, en su forma protonada y desprotonada en medio orgánico. Después, se realizaron estudios en medio acuoso, donde se determinó el pK_a por potenciometría y UV-VIS obteniendo valores similares a los ya reportados para el vermellógeno. Se observó tendencia a la agregación en el derivado de cadena larga, pudiendo determinar la concentración de agregación crítica (cac) mediante DLS. En medio básico se obtuvo la cac a concentraciones menores que en medio ácido, comprobando así su dependencia con el pH.

Palabras clave

Química supramolecular, anfifilos catiónicos, derivados del bipyridinio, viológeno, vermellógeno, respuesta a pH, agregados supramoleculares, hidrazona.

RESUMO

O vermellóxico é unha sal catiónica de piridinio, derivada do violóxico, onde as unidades piridínicas únense mediante un enlace hidrazona. O cal permite que o composto responda ao pH, debido a acidez do NH, e evite os problemas de citotoxicidade da resposta redox do violóxico. Sintetizáronse dous derivados do vermellóxico, un de cadea longa e outro de cadea curta. Para iso, seguiu-se a mesma metodoloxía en ambos os dous casos, a partir de reactivos comerciais, mediante reaccións S_N2 e S_NAr, obtivéronse primeiro os dous precursores necesarios. Despois, a través de una reacción de síntese de hidrazonas, obtívose o produto final, sendo purificado por HPLC o metátesis. A continuación, caracterizáronse estruturalmente coas técnicas habituais, RMN ¹³C y ¹H monodimensional e bidimensional, na súa forma protonada e desprotonada en medio orgánico. Despois, realizáronse estudos en medio acuoso, onde se determinou o pKa por potenciometría e UV-VIS, obtendo valores similares aos xa reportados para o vermellóxico. Observouse tendencia á agregación no derivado de cadea longa, podendo determinar a concentración de agregación crítica (cac) mediante DLS. En medio básico obtívose a cac a concentracións menores que en medio ácido, comprobando así a súa dependencia co pH.

Palabras clave

Química supramolecular, anfífilos catiónicos, derivados do biperidinio, violóxico. Vermellóxico, resposta a pH, agregados supramoleculares, hidrazona.

ABSTRACT

The red thread is a pyridinium based cationic salt, derived from the viologen, in which the pyridinic unities are linked through a hydrazone bond. This result in the pH responsiveness of the compound, due to the NH acidity, and avoids the cytotoxicity problems of the redox response of the the viologen. Two derivatives of the red thread were synthesized, one with a longer chain and another with a shorter chain. To that end the same methodology was followed in both cases, starting from commercial reactives, through S_N2 and S_NAr reactions, two precursor compounds were obtained. Finally, by a hydrazone synthesis reaction, the final product was obtained, then purified by HPLC or metathesis. Next, the products were structurally characterized using the usual spectroscopic techniques, RMN ¹³C and ¹H monodimensional and bidimensional, in their protonated and deprotonated form in organic medium. Then studies in aqueous medium were realized, in which the pKa was determined by potentiometry and UV-VIS, obtaining similar values to those already reported for the read thread. A tendency to aggregation was observed in the long chain derivative, in which the critical aggregation concentration (cac) could be determined by DLS. In basic medium the cac was obtained in lower concentrations than in acidic medium, thus proving the pH dependency.

Key words

Supramolecular chemistry, cationic amphiphiles, bipyridium derivates, viologen, red thread, pH responsiveness, supramolecular aggregates, hydrazone.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

SDS	Dodecilsulfato de sodio
ARN _m	Ácido ribonucleico mensajero
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
S _N 2	Sustitución nucleófila bimolecular
Redox	Reducción-oxidación
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ccf	Cromatografía en capa fina
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy</i>
HR-ESI-MS	<i>High Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectroscopy</i>
m/z	Relación masa/carga
S _N Ar	Sustitución nucleófila Aromática
TFA	Ácido trifluoroacético
TBACl	Cloruro de tributilamonio
mM	Milimolar
μM	Micromolar
DLS	<i>Dinamic light scattering</i>
TEM	Microscopio de transmisión electrónica
cac	Concentración de agregación crítica
g	Gramo
mg	Miligramo
ml	Mililitro
μL	Microlitro
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius

ϵ

Coeficiente de absorptividad molar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la Química Supramolecular

La Química Supramolecular es una rama relativamente reciente, ya que sus avances comenzaron en la década de 1960 con los éteres corona de Charles Pedersen. Destacan como investigadores de este campo los ganadores del Premio Nobel de Química de 1987, siendo el mismo Pedersen, Lehn y Cram. Sus trabajos sirvieron como base y referente para el futuro de este campo, que actualmente se extiende por numerosas disciplinas científicas, desde la propia química hasta en aplicaciones tecnológicas y la ciencia de materiales.¹

Ha sido definida, por el mismo Lehn, como “la química más allá de la molécula”, por lo tanto, resalta la diferencia entre la química molecular y la supramolecular. La primera está regida por enlaces covalentes, mientras que en la segunda son vitales las interacciones intermoleculares, siendo muy variables según las características de las moléculas que pueden dar lugar a interacciones electrostáticas, enlace de H, efecto hidrofóbico o fuerzas de Van der Waals, entre otras. Estas, como es sabido, consiguen una fuerza de unión mucho menor que las covalentes, por lo que suelen ser más dinámicamente flexibles, no obstante, puede producirse un número muy elevado de interacciones que, en suma, consigan un sistema más estable. Las interacciones moleculares permiten la síntesis de estructuras complejas, difíciles de obtener mediante la química clásica, ya que permiten organizar especies precursoras aprovechando su direccionalidad.^{2,3}

1.2. Anfifilos y respuesta a estímulos

Los anfifilos (que también pueden ser referidos como tensioactivos o surfactantes) son moléculas formadas por una región hidrofílica y otra hidrofóbica, unidas de forma covalente en el caso de los anfifilos clásicos. La parte apolar suele ser una cadena hidrocarbonada, mientras que la polar es más variable. La parte polar, puede ser una región sin carga, debido a grupos funcionales hidroxilo o éter o, en cambio una región iónica. En este caso, dependiendo de la carga, pueden separarse en anfifilos catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos. Los catiónicos presentan una carga positiva en grupos como los amonio con haluros como contraiones; los aniónicos suelen ser carboxilatos, sulfatos o fosfatos con grupos amonio o metales alcalinos de contraión, y los zwitteriónicos contienen ambos tipos. Por lo tanto, en función del pH del medio y del pKa de los grupos, pueden actuar como anfifilos catiónicos o aniónicos.⁴

Las distintas combinaciones de estas partes en la molécula condicionan su solubilidad en el medio y su comportamiento, siendo la más común una cabeza polar con una o más colas hidrofóbicas. En medios polares como el agua este tipo de moléculas tiende a agregarse debido al efecto hidrofóbico (aunque hay más interacciones implicadas), que consiste en fuertes interacciones entre moléculas del disolvente que resultan en la agregación de las moléculas con regiones apolares, de forma que se evite el contacto de estas con el medio. A mayores, estas regiones podrán interactuar al agregarse mediante enlaces de H, fuerzas de Van der Waals,

¹ Dodziuk, H. *Introduction to Supramolecular Chemistry*; Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.

² Lehn, J.-M. *Toward Complex Matter: Supramolecular Chemistry and Self-Organization*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (8), 4763–4768.

³ Steed, J. W. *Supramolecular Chemistry*; Chichester, UK: Wiley, 2009.

⁴ Lombardo, D.; Kiselev, M. A.; Magazù, S.; Calandra, P. *Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches*. *Adv. Condens. Matter Phys.* **2015**, *2015*, e151683.

interacciones electrostáticas o interacciones π - π , volviéndose más estable.³ De esta forma, la parte polar hidrófila tiende a maximizar las interacciones y la apolar a minimizarlas, dando lugar a estructuras supramoleculares. Las más estables, y por lo tanto más comunes, son las micelas (normales e inversas), las vesículas, las monocapas y las bicapas. En función de su topología y de las condiciones externas del medio, como temperatura, pH y fuerza iónica, el anfifilo dará lugar a distintas estructuras, condicionando sus aplicaciones. Unos de los anfifilos más conocidos son los surfactantes, debido a sus usos como parte de detergentes y productos de limpieza. El SDS (un anfifilo aniónico), agrega formando micelas permitiendo encapsular moléculas apolares dentro. También cabe destacar la importancia biológica de los anfifilos, siendo muy conocidos los fosfolípidos ya que, al agregar como bicapas, forman las membranas biológicas.^{5,6}

Teniendo en cuenta que muchas de las estructuras formadas por los anfifilos son capaces de contener moléculas ajenas en su interior, se ha orientado su uso hacia el campo de la biotecnología y la medicina⁶ puesto que, pueden ser utilizados como nanoportadores para el transporte de fármacos y participar en sistemas de nano-dispositivos.⁷ Un ejemplo reciente es el uso de transportadores de la vacuna de ARN_m contra el COVID-19, donde se encapsuló el ARN utilizando nanopartículas lipídicas.⁸ El uso de nanoportadores presenta importantes mejoras en el transporte de fármacos, permitiendo aumentar la biodisponibilidad protegiendo la molécula de la degradación. No obstante, utilizando moléculas anfifílicas tradicionales no se puede controlar la liberación de la molécula transportada. Por eso, se desarrollaron, y se continúan investigando, nanoportadores inteligentes que permitan una mayor selectividad en el transporte y liberación. Todas las técnicas se centran en controlar la agregación sintetizando compuestos con respuesta a estímulos, de forma que provoque el ensamblaje y desensamblaje de los agregados en condiciones concretas. Estos anfifilos con respuesta a estímulos se basan en las estructuras de los tradicionales, pero incorporando una unidad responsable de la respuesta.⁹

Se utilizan, entre otras posibilidades, estructuras con superficies con respuesta a estímulos, que forman enlaces reversibles con moléculas objetivo, además se ha conseguido controlar la agregación por fotoisomería del anfifilo, que modifica su estructura y con ello su ensamblaje. También por cambio de pH, en el que al desprotonar el compuesto cambia la carga neta y sus interacciones con el entorno.^{10,11} Un ejemplo clásico es la fotoisomerización del azobenceno, donde cambia entre una estructura *cis* y *trans* al ser irradiado con luz del espectro visible o del UV (**Figura 1**). El método se basa en la complementariedad del *trans*-azobenceno y la α -ciclodextrina, ya que, solo el *trans* tiene la estructura adecuada para ser incluido dentro de la cavidad de la α -ciclodextrina, aunque ambos isómeros agregan para formar vesículas. De forma que, en presencia de esta ciclodextrina, se puede controlar la formación (con el *cis*-azobenceno, ya que no se incluye en la cavidad y puede agregar) y el desensamblaje de las vesículas (con el

⁵ Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. Self-Assembly at All Scales. *Science* **2002**, 295 (5564), 2418–2421.

⁶ Mendes, A. C.; Baran, E. T.; Reis, R. L.; Azevedo, H. S. Self-Assembly in Nature: Using the Principles of Nature to Create Complex Nanobiomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2013**, 5 (6), 582–612.

⁷ Zhang, X.; Wang, C. Supramolecular Amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (1), 94–101.

⁸ Srinivas, R.; Samanta, S.; Chaudhuri, A. Cationic Amphiphiles: Promising Carriers of Genetic Materials in Gene Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (12), 3326–3338.

⁹ Wang, C.; Wang, Z.; Zhang, X. Amphiphilic Building Blocks for Self-Assembly: From Amphiphiles to Supra-Amphiphiles. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45 (4), 608–618.

¹⁰ Zhang, X.; Wang, C. Supramolecular Amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (1), 94–101.

¹¹ Viricel, W.; Mbarek, A.; Leblond Chain, J. Switchable Lipids: Conformational Change for Fast PH-Triggered Cytoplasmic Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, 54.

isómero trans que, debido al efecto hidrofóbico y las fuerzas de Van der Waals, interacciona con la ciclodextrina y tenderá a desagregarse).¹²



Figura 1: Inclusión del trans-azobenceno en la α -ciclodextrina desestabilizando el agregado (izquierda). Cambio conformacional de la molécula al ser irradiada (derecha).¹²

Otro ejemplo, de respuesta al pH, se puede ver en el desarrollo de lípidos interconvertibles. Estos compuestos agregan para formar liposomas, por lo que se orienta en aplicaciones biológicas como el transporte de fármacos con liberación controlada. Estos lípidos (**Figura 2**) presentan una piridina en su estructura, de forma que si está desprotonada la molécula es neutra y agrega. Al protonarse se carga positivamente, por lo cual tiende a interactuar con los sustituyentes con mayor densidad de carga, deformando para ello la estructura y rompiendo la agregación.¹¹

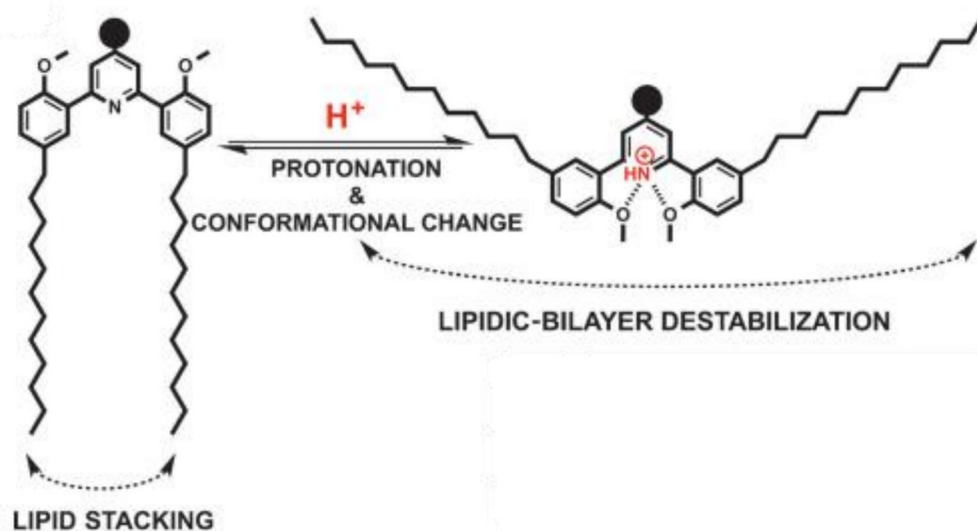


Figura 2: Representación del cambio conformacional de la molécula al protonarse debido a las interacciones intramoleculares.¹¹

1.3. Antecedentes

Dentro de los compuestos con respuesta a estímulos se encuentran los viológenos, derivados del 4,4'-bipiridinio, una familia de compuestos conocida por su respuesta redox, con usos en máquinas moleculares, baterías orgánicas, dispositivos electrocrómicos e interruptores moleculares (**Figura 3**). Los viológenos se presentan como moléculas catiónicas con un potencial redox razonablemente bajo, además de 3 estados estables y capacidad para revertir esos estados. Se ha buscado aprovechar la diferencia de interacciones electrostáticas que existe entre estos estados, siendo un ejemplo el estudio de sus interacciones con el cucurbit[n]uril, con el que mantiene interacciones ion-dipolo solo en su estado catiónico. En función de esas interacciones variaría la agregación del compuesto. Cabe resaltar que presentan aplicaciones

¹² Yu, G.; Jie, K.; Huang, F. Supramolecular Amphiphiles Based on Host-Guest Molecular Recognition Motifs. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7240–7303.

tecnológicas, que se siguen estudiando, pero está limitado en aplicaciones biológicas¹³ porque forma radicales libres muy estables, que en el organismo pueden formar superóxidos y causar estrés oxidativo, resultando citotóxicos.¹⁴

Por lo tanto, se buscó sintetizar un análogo no citotóxico que mantuviese capacidad de respuesta a estímulos, para poder estudiar sus aplicaciones en el campo biológico. Con ese objetivo se desarrollaron los vermellógenos, en los que se enlazan los anillos de piridinio a través de un enlace hidrazona. Tras estudiar estos compuestos, se comprobó que no presentaban citotoxicidad y, aunque no tenían un comportamiento redox reversible, mostraban una fuerte respuesta al pH que permitiría una potencial aplicación en sistemas de transporte de fármacos (**Figura 3**).¹⁵

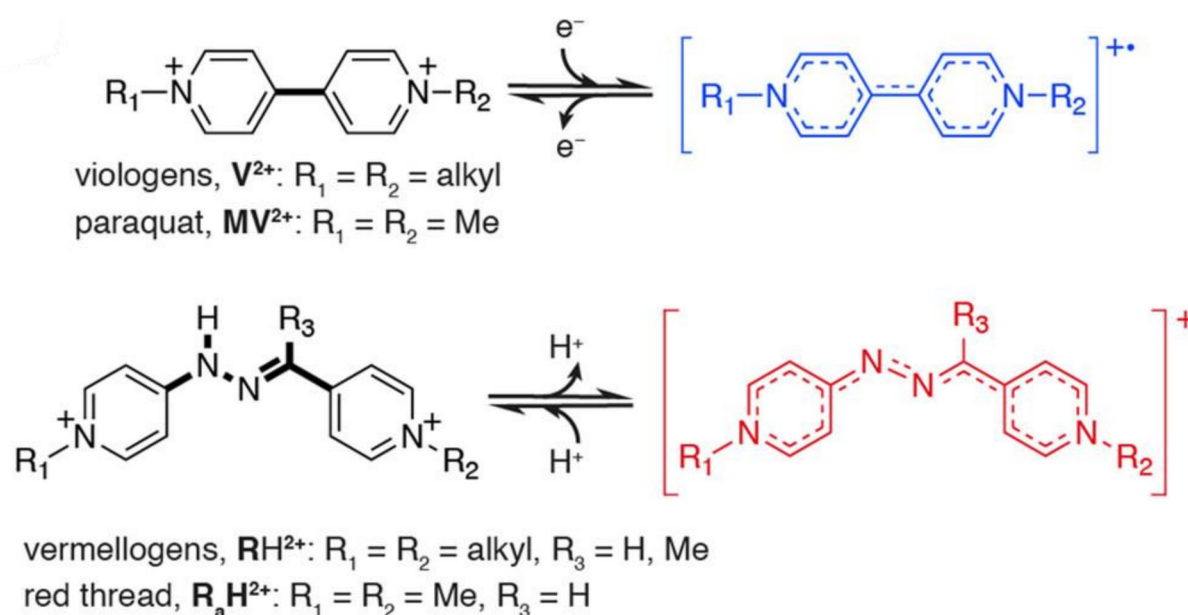


Figura 3: Estructura de los viológenos y su comportamiento redox (superior) frente a la de los vermellógenos y comportamiento ácido-base (inferior).¹⁵

Los vermellógenos son sales catiónicas de carga 2^+ , con una síntesis sencilla y con posibilidad de sustitución asimétrica, que pueden responder al pH. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos dos factores se ha decidido desarrollar moléculas anfífilas derivadas del vermellógeno. Como se ve en la **Figura 3**, puede desprotonarse y deslocalizar la carga a través del doble enlace y los anillos, quedando con carga neta 1^+ . Esto modificaría sus interacciones con el medio, ya que al disminuir su componente polar, disminuye su solubilidad y con ello aumentaría su tendencia a agregar en medio acuoso. Debido a la potencial diferencia en la agregación entre su forma protonada y desprotonada, en su posible uso como nanoportador en medio acuoso podría controlarse el desensamblaje y liberación al medio del material portado.

¹³ Striepe, L.; Baumgartner, T. Viologens and Their Application as Functional Materials. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (67), 16924–16940.

¹⁴ Ross, J. H.; Krieger, R. I. Toxicity of 1,1'-Alkyl-4,4'-Bipyridylium Salts in the Rat. *Drug Chem. Toxicol.* **1979**, *2* (3), 207–222.

¹⁵ Barravecchia, L.; Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Skackauskaite, R.; Vila, A.; Rey-Rico, A.; Peinador, C.; García, M. D. "Vermellógenos" and the Development of CB[8]-Based Supramolecular Switches Using PH-Responsive and Non-Toxic Viologen Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (41), 19127–19136.

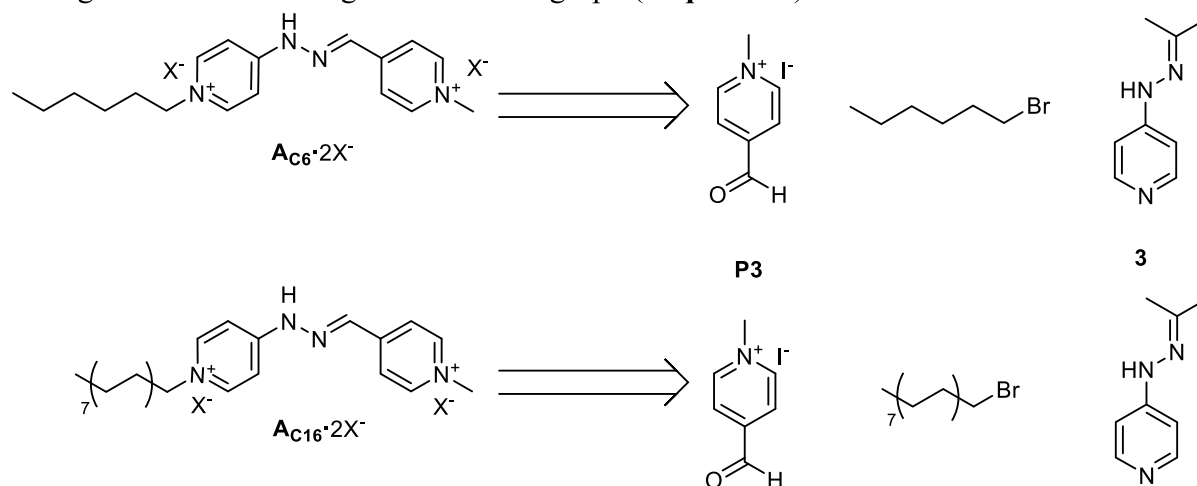
Teniendo esto en cuenta, se decidió sintetizar dos nuevos anfifilos derivados del vermellógeno, estudiar sus propiedades ácido-base y su agregación.

2. OBJETIVOS

Según lo mencionado anteriormente, en base a la capacidad de respuesta al pH de los vermellógenos se propone sintetizar dos derivados anfifílicos, buscando el control de su agregación en medio acuoso mediante el pH.

Los objetivos específicos del siguiente trabajo de fin de grado consisten en:

1. Sintetizar un derivado del vermellógeno de cadena larga y uno de cadena corta siguiendo la metodología sintética del grupo (**Esquema 1**).



Esquema 1: Estructuras de los anfifilos objetivo (Ac_6 y Ac_{16}) y su retrosíntesis.

2. Caracterizar estructuralmente ambos derivados mediante las técnicas habituales.
3. Estudiar las propiedades ácido-base mediante distintas técnicas, caracterizando las especies desprotonadas y determinando el pK_a .
4. Estudiar la agregación en medio ácido y básico.

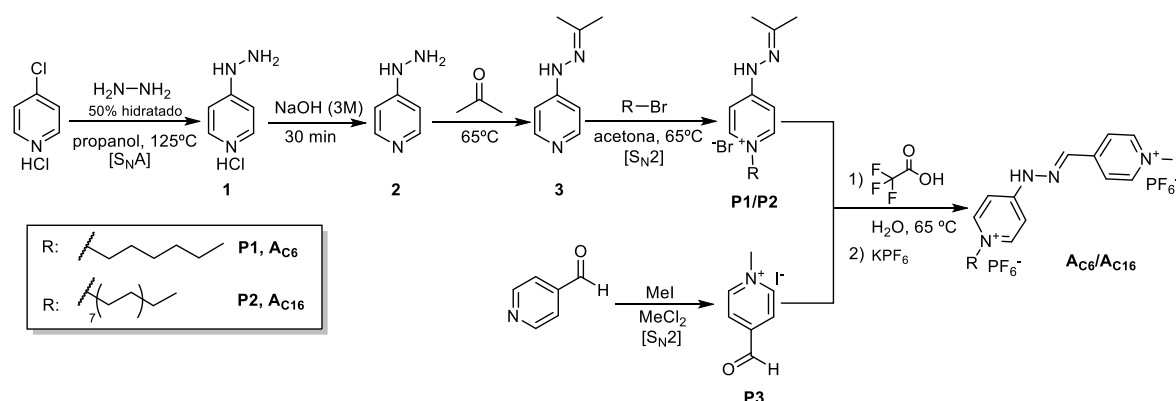
Este proyecto se llevó a cabo en el grupo de investigación SUPREN, que desarrolla la actividad en el Centro Interdisciplinario de Química y Biología, basándose en su investigación previa sobre la síntesis de derivados no tóxicos del viológeno. Por lo tanto, se seguirá su metodología experimental.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Procedimientos generales

3.1.1. Síntesis

La síntesis de vermellógenos y sus derivados utilizada en este trabajo fue desarrollada y descrita por el grupo de investigación en el pasado.¹⁵ Consiste en la obtención de los precursores (*building blocks*) mediante reacciones sencillas y de altos rendimientos, con la alquilación por S_N2 de los fragmentos de piridina. Finalmente, se lleva a cabo la síntesis de hidrazonas con **P1/P2** y **P3** en medio acuoso, y se obtiene el producto por precipitación (**Esquema 2**).



Esquema 2. Esquema sintético para la obtención de los anfifilos.

Para estudiar las diferencias en su comportamiento y agregación se sintetizaron dos anfifilos, variando únicamente el grupo **R** del **P1/P2**, de forma que se obtuvo uno alquilado con una cadena de 6 carbonos (**Ac₆**) y otro con una cadena de 16 carbonos (**Ac₁₆**).

3.1.2. Caracterización estructural

- Espectroscopía RMN

Para su determinación estructural se estudiaron los espectros (¹H y ¹³C) de RMN tanto monodimensionales como bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC).

En primer lugar, se interpretó el espectro de RMN ¹H estudiando el desplazamiento, la integración y la multiplicidad de las señales. A continuación, se asignaron los carbonos mediante el espectro de ¹³C y el DEPT, permitiendo este último distinguir entre los carbonos cuaternarios, los CH₂ y los CH/CH₃.

Para confirmar la información obtenida, así como para distinguir entre señales muy parecidas e identificar otras, se recurrió a los espectros bidimensionales. Comenzando por el COSY (*Correlation Spectroscopy*) se observaron las correlaciones entre H, permitiendo conocer cuales están acoplados entre sí a distancias de entre 2-3 enlaces. Por lo tanto, se conoce la ubicación en la molécula de señales de H no asignadas si se observa acoplamiento con señales sí conocidas. El HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*) correlaciona señales de H directamente con las de C, es decir, permite conocer los H unidos a cada C. Finalmente, el HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy*)

correlaciona las señales de H con C separados entre 2-3 enlaces, por lo que se utiliza para confirmar asignaciones tanto de ^1H como de ^{13}C e identificar C cuaternarios.

- Espectrometría de masas

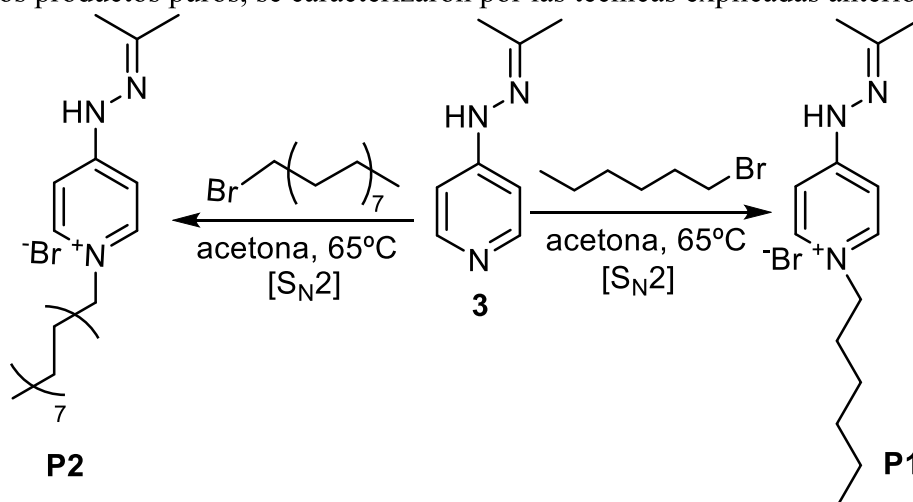
La determinación se complementa mediante la espectroscopia de masas con ionización por electro spray (HR-ESI-MS), buscando únicamente identificar los picos más probables del compuesto para confirmar su presencia.

3.2. Síntesis y caracterización estructural de los precursores¹⁶

Como se puede ver en el esquema sintético (**Esquema 2**), los precursores **P1-P3** pueden sintetizarse a partir de reactivos comerciales comunes mediante reacciones sencillas. Primero se sintetizan los precursores **P1/P2** que aporta las cadenas de diferente longitud según el anfifilo. Después solo es necesaria una condensación con **P3** para obtener el producto final. A continuación, se discuten los pasos seguidos en la síntesis y su determinación estructural.

3.2.1. Síntesis de las sales de piridinio (**P1** y **P2**)

Los precursores **P1/P2** se sintetizaron a partir del compuesto **3** y el correspondiente bromuro alquílico (1-bromohexano o 1-bromohexadecano respectivamente), siendo este un reactivo comercial añadido ligeramente en exceso, a través de una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ en acetona (**Esquema 3**). Cabe destacar que **3** presenta dos nitrógenos nucleófilos, el N de la piridina y el N terminal de la hidracina. Este último se protege al hacer reaccionar el compuesto **2** en acetona para conseguir alquilar el N piridínico. La reacción se monitoriza mediante RMN ^1H , donde se observa el producto con ciertas impurezas. Para purificarlo, se hace una extracción con hexano. Se obtienen **P1** y **P2** con rendimientos del 53 y 44%, respectivamente. Una vez obtenidos los productos puros, se caracterizaron por las técnicas explicadas anteriormente.



Esquema 3. Síntesis de los precursores **P1** y **P2** a partir del reactivo **3**.

¹⁶ La síntesis de **P3** ya ha sido estudiada y reportada anteriormente, consiste en una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ entre los reactivos comerciales 4-formilpiridina y MeI, en CH_2Cl_2 . El producto precipita al formarse y se filtra, rendimiento 88%.

Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; L. Barriada, J.; Melle-Franco, M.; Peinador, C.; D. García, M. Thinking Outside the “Blue Box”: From Molecular to Supramolecular PH-Responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (46), 10680–10686.

3.2.2. Caracterización estructural de los precursores **P1** y **P2**

La caracterización es muy similar para los dos compuestos, ya que únicamente difieren en la longitud de la cadena alifática. Todas las asignaciones se llevaron a cabo con la ayuda de los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (**Figura A 1-Figura A 7**). Como se ve en la **Figura 4**, ambos presentan el mismo número de señales en ^1H RMN con desplazamientos químicos muy similares. Se pueden observar las señales de la región aromática y del NH (**H_h**, **H_g** y **H_k**) a desplazamiento de 7,25-8 ppm y 10,50 ppm. Las señales alifáticas se presentan en la región de 0,5 a 2,25 ppm, correspondientes a la protección y a la cadena, destacando **H_f** (t, 2H) a 4,00 ppm. Esta señal confirma la alquilación del compuesto ya que, por la integración y el desplazamiento, se asigna como el **CH₂** unido al **N⁺** de la piridina, que retira carga dando lugar a una señal más desapantallada.

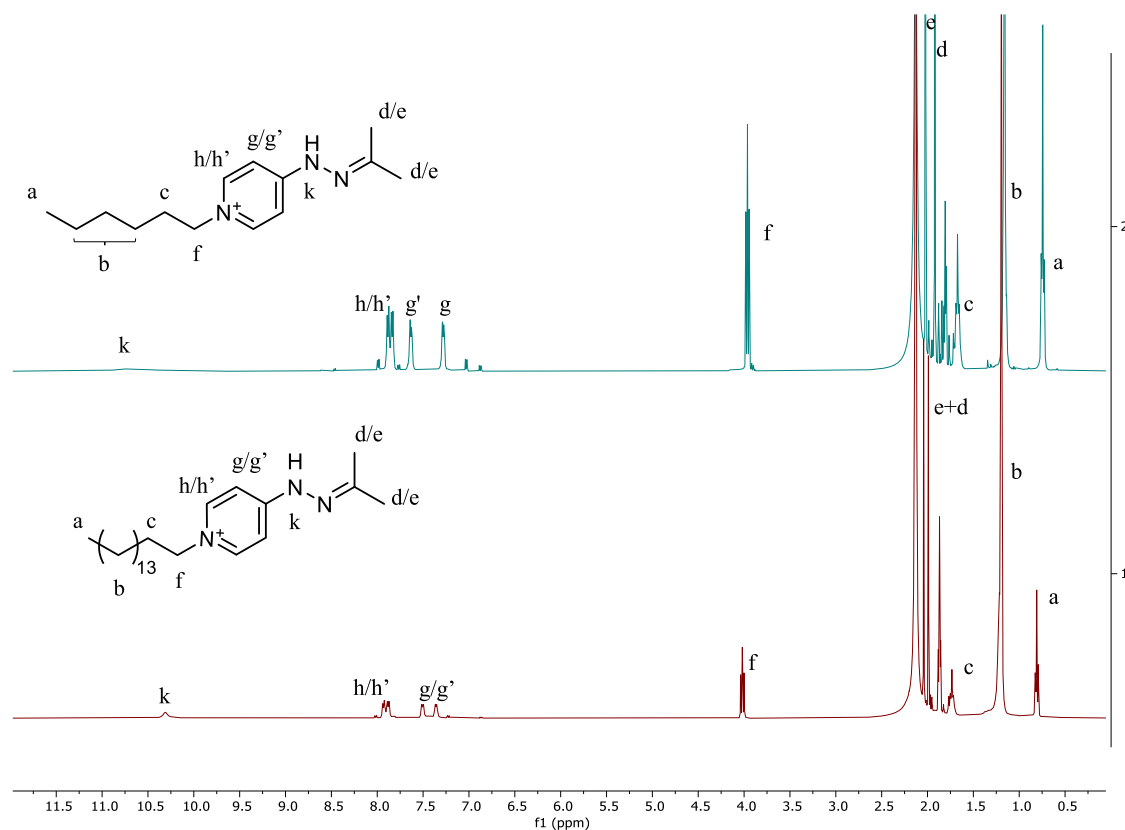
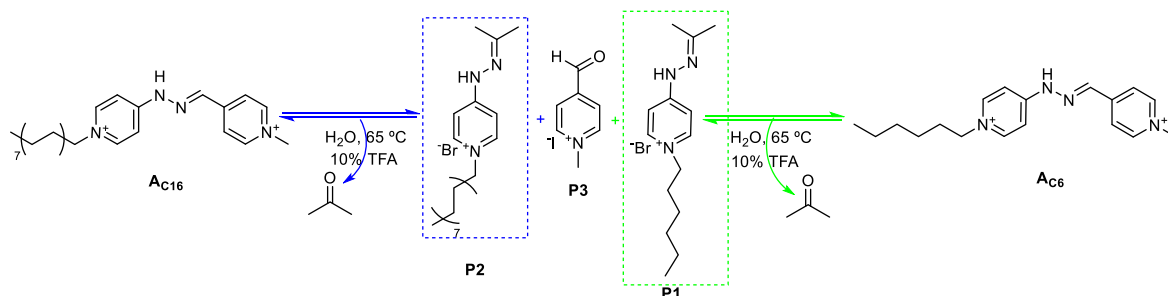


Figura 4: Espectro ^1H RMN (500 MHz, CD_3CN) del **P1** (en gris) y del **P2** (en rojo), ambos protegidos como hidrazonas.

3.3. Síntesis y caracterización de los anfifilos **Ac₁₆** y **Ac₆**

La síntesis de los compuestos **Ac₁₆/Ac₆** se llevó a cabo a través de la formación de un enlace hidrazona entre los precursores **P1**, **P2** y **P3** en agua con catálisis ácida debida al TFA. La solubilidad de las sales de piridinio depende del contraión, de forma que con aniones pequeños y poco polarizables como el Br^- será soluble en medio acuoso, mientras que con aniones voluminosos y más polarizables como el PF_6^- será soluble en medio orgánico. Dado que la reacción se lleva a cabo con Br^- como contraión, tanto los reactivos como los productos serán solubles en agua.

En la reacción se rompe y se forma el enlace hidrazona en el equilibrio indicado en el **Esquema 4**, dado que **Ac₆** y **Ac₁₆** son más estables que los precursores, de forma que este equilibrio se encuentra muy desplazado hacia los productos.



*Esquema 4. Reacción de síntesis de hidrazonas con los precursores **P1** y **P2** con **P3** en medio acuoso, para dar los anfifilos **Ac₆** y **Ac₁₆**.*

Se puede aislar el producto precipitándolo directamente en el medio de reacción añadiendo KPF_6 que induce la precipitación como sal de hexafluorofosfato.

Una vez formado el producto se procede a purificarlo y aislarlo, para ello se utilizan dos métodos. En primer lugar, se purificó el crudo de reacción mediante HPLC preparativo en fase reversa, teniendo en cuenta que la sal de piridinio está cargada y no se eluiría en fase normal. De esta forma, se obtiene como una sal de TFA, que presenta una solubilidad limitada en agua, por lo que se añade HCl para protonar el TFA y cambia el contraion a Cl^- . Finalmente, se separa la sal de cloruro mediante liofilización, ya que el TFA se elimina junto con el disolvente. El segundo método consiste en la metátesis de iones para provocar la precipitación selectiva del producto. La sal de TFA es soluble en medio orgánico, al contrario que la de Cl^- , por lo que si se añade TBACl se puede intercambiar el contraion y obtener el producto precipitado en el medio.

Una vez obtenido el producto puro se procede a caracterizarlo estructuralmente. La caracterización de los anfifilos se realizó en CD_3CN a concentración 2,5 mM, debido a sus problemas de solubilidad en medio acuoso, utilizando las técnicas de RMN ^{13}C y ^1H , mono y bidimensional, así como la espectroscopía de masas. Para la descripción de la caracterización estructural se tomará el **Ac₁₆**, ya que las diferencias estructurales entre los dos anfifilos son mínimas, variando solo la longitud de la cadena alifática.

Se comienza la caracterización por el RMN ^1H monodimensional (**Figura 5**), intentando asignar las señales tras ver su integración y su desplazamiento. Se observa que las señales entre 0,5 y 4 ppm pertenecen a la región alifática de la molécula, mientras que entre 7 y 9 ppm se encuentra la región aromática y del enlace hidrazona. En primer lugar, se identifica claramente la señal **Hk**, un singlete integrando por 1H a 14,17 ppm, como el **NH**. En base a la integración se asignan las señales de la región alifática, destacando **He** y **Hd**, de desplazamientos muy cercanos (4,13 y 4,09 ppm, respectivamente). Dado que son las más desapantalladas, se corresponden con el **CH₃** (**He**) y el **CH₂** (**Hd**) unidos al nitrógeno cargado positivamente.

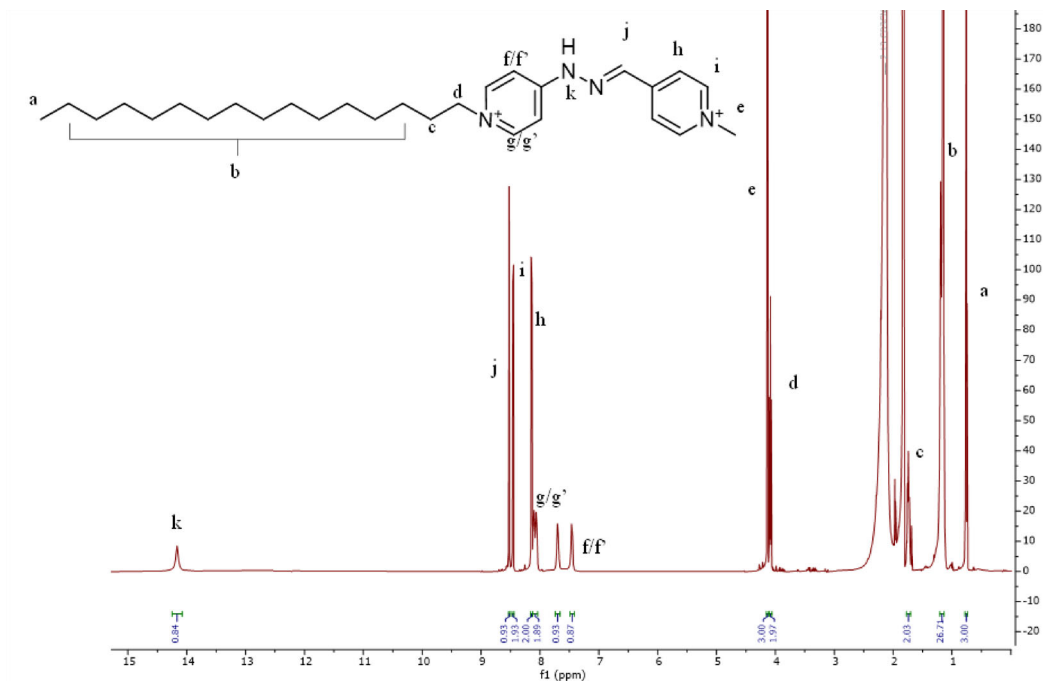


Figura 5: Espectro RMN ^1H del Ac_{16} (500 MHz, CD_3CN) con la asignación final de las señales en la molécula.

Estas asignaciones se confirman mediante el COSY (**Figura 6**), donde todas las señales de la cadena interactúan con el H contiguo, viendo que la señal **a** acopla con **b**, la señal **b** con **a** y **c**, y finalmente la **c** con **b** y **d**.

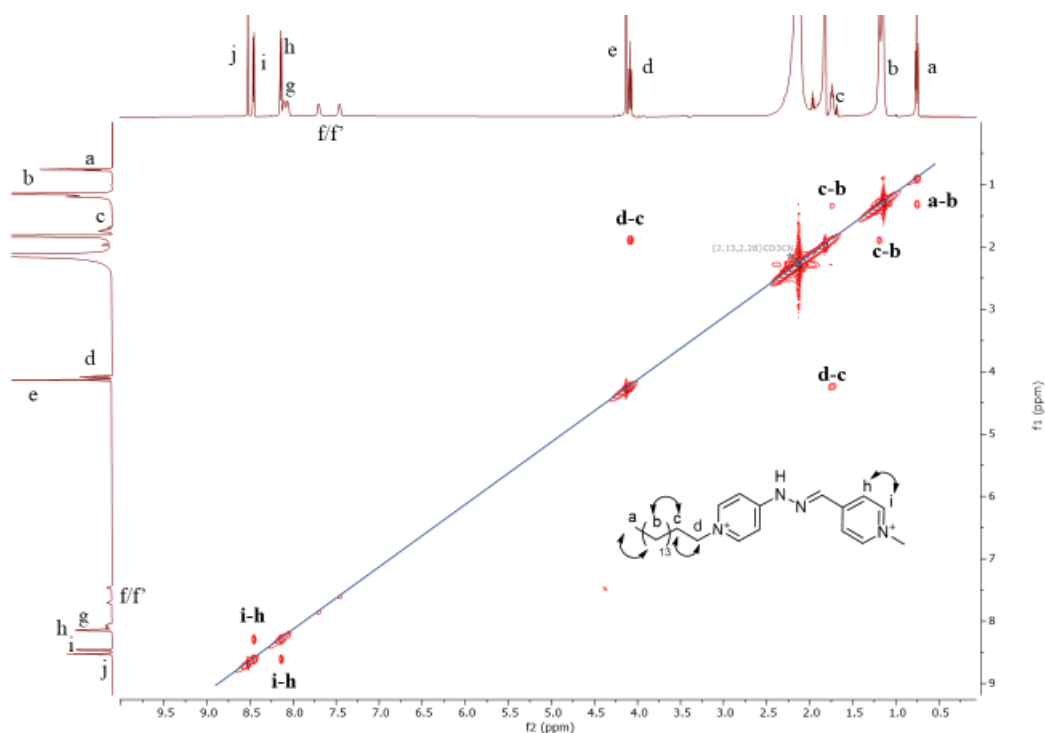
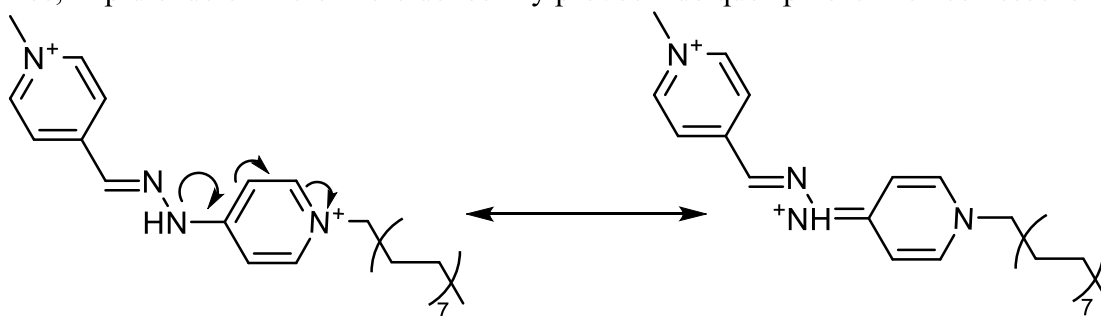


Figura 6: Espectro ^1H - ^1H COSY (500 MHz, CD_3CN) del Ac_{16} , mostrando la relación entre H a 2-3 enlaces.

A continuación, se estudian las señales en la zona alquénica y aromática. Viendo la estructura del compuesto, se podrían esperar 4 dobletes, debido a que las piridinas son

simétricas. No obstante, se obtienen 2 dobletes integrando por 2H (**h** e **i**) junto con 4 señales de baja intensidad, dos singletes anchos que integran 1H cada uno (**f** y **f'**) y un doblete (**g**) de 2H. Dado que se puede ver la señal (**j**) como un singlete integrando por 1H, se puede asignar al H imínico. Esta es una señal característica en los vermellógenos, indicativa de que se ha producido la reacción de condensación y se ha obtenido el producto con un enlace hidrazona. Tras asignar **j**, se sabe que el resto de las señales, de **f-i**, tienen que corresponder a los H $_{\alpha}$ y H $_{\beta}$ de las dos piridinas. Mediante el COSY, se ve que el **H_h** se relaciona con el **H_i**, por lo que, pertenecen a la misma piridina y se identifican **H_f** y **H_g** para la otra. Se ve que **f** y **g** no muestran la equivalencia esperada, un efecto ya investigado durante el desarrollo de los vermellógenos,¹⁵ que permite relacionar las señales con la piridilhidrazona. Como se ve en el **Esquema 5**, el NH cede carga al anillo aromático, que puede deslocalizarla y aumenta el carácter de doble enlace entre el C_{piridina} y el N. Esto restringe la rotación en torno a ese enlace, impidiendo el intercambio de los H y provocando que aparezcan en coalescencia.



Esquema 5: Movimiento de cargas en el compuesto AC_{16} que dan lugar a una forma resonante con la rotación $HN-C_{piridina}$ impedida.

Debido a la dificultad para distinguir las señales entre sí, es necesario basarse en los espectros HSQC y HMBC, y para ello primero se deben asignar las señales de RMN ^{13}C . Se estudia este espectro (**Figura 7**) y su respectivo DEPT, por el cual se sabe que las señales **A**, **C**, **E**, **F**, **G**, **H** e **I** corresponden a CH/CH₃, y las **B** y **D**, serán CH₂, mientras que, **J** y **K**, no están unidos a H. Se observa que hay un número menor de señales que átomos de carbono del compuesto, lo que indica que habrá C equivalentes, siendo probablemente de las piridinas y los del centro de la cadena alifática. En primer lugar, con los datos del DEPT, se asignan los C correspondientes a la cadena alifática, que se corresponden a las señales más apantalladas. Sabiendo que el metilo unido al N⁺ estará más desapantallado que el terminal de la cadena, se asigna el primero como **C_C** y el segundo como **C_A**. En cuanto al resto de señales **B** y **D**, se asignan en el orden de desplazamiento, siendo claramente **D**, la más desplazada, el CH₂ de la cadena unido al nitrógeno piridínico. Las señales restantes se deben asignar, por lo tanto, en la fracción aromática e imínica. Debido al DEPT y al desplazamiento se conoce que **J** y **K** corresponden a C cuaternarios. Tanto estas señales como el resto de esta fracción son difíciles de asignar solo por el desplazamiento, siendo necesario recurrir más tarde al espectro de HMBC para distinguirlas.

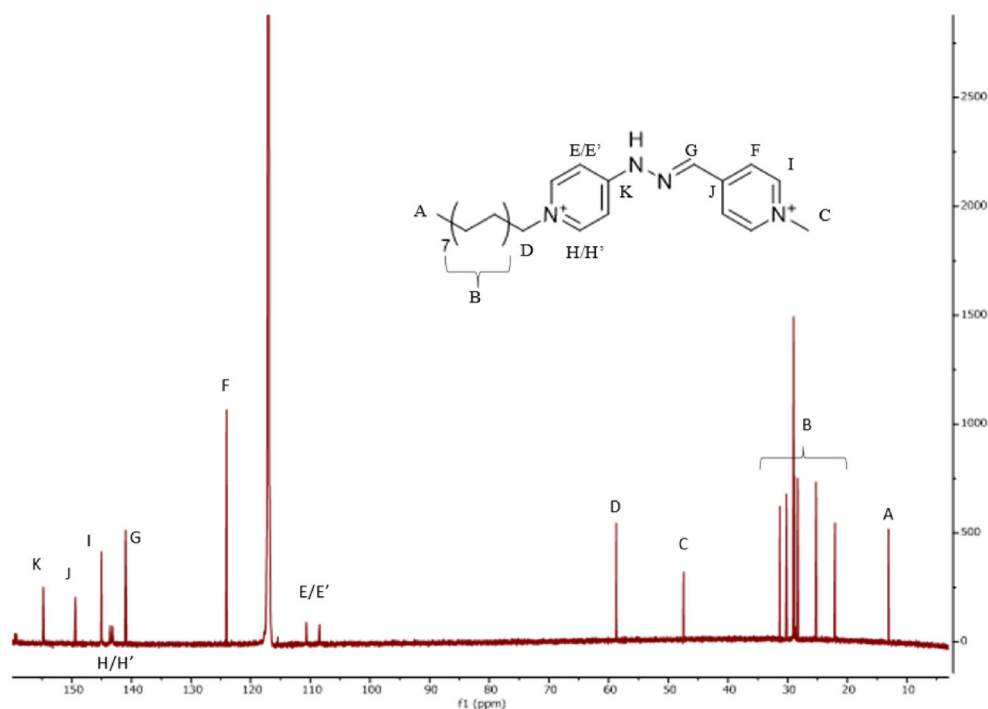


Figura 7: Espectro RMN^{13}C del AC_{16} (500 MHz, CD_3CN), mostrando las asignaciones finales de las señales.

Mediante el espectro de HSQC (**Figura 8**) se relacionan las señales de H con los C correspondientes, de forma que se pueden confirmar las asignaciones de la cadena alifática y el metilo. A mayores, se identifica el C_G , al relacionarlo con el protón imínico H_j . También permite relacionar el resto de los carbonos con los H correspondientes, de manera que se conoce que el C_F está unido a los H_h , los C_I están unidos al H_i , y los C_E/C_H a los H_f/H_g respectivamente (destacando que presentan la misma rotación impedida).

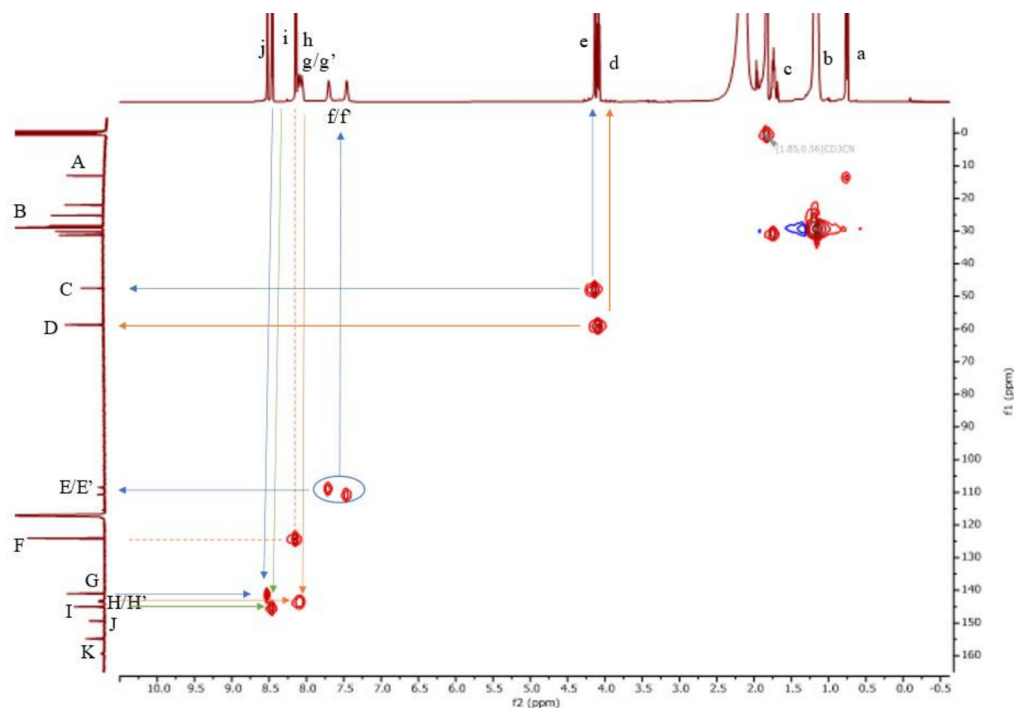


Figura 8: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC (500 MHz, CD_3CN) del AC_{16} marcando las señales más importantes para la identificación.

Finalmente, con el espectro de HMBC (**Figura 9**) se pueden distinguir los carbonos cuaternarios y los piridínicos. Se observa que el **H_e** se correlaciona con el **C_I**, por lo tanto, este último está unido a **H_i**, y se identifica como los α de la piridina metilada. Debido a la relación vista antes en el COSY entre **H_i** y **H_h**, se pueden identificar los **H_h** como los β . A continuación, al relacionarse con **H_d**, se asigna **C_H** y **H_g** como los α de la otra piridina, quedando identificados claramente **H_f** y **C_E** como los β . Después, se identifica **C_J** como el carbono cuaternario de la piridina metilada, ya que se relaciona con el protón imínico **H_j**. Por lo tanto, el **C_K** será el cuaternario de la otra piridina.

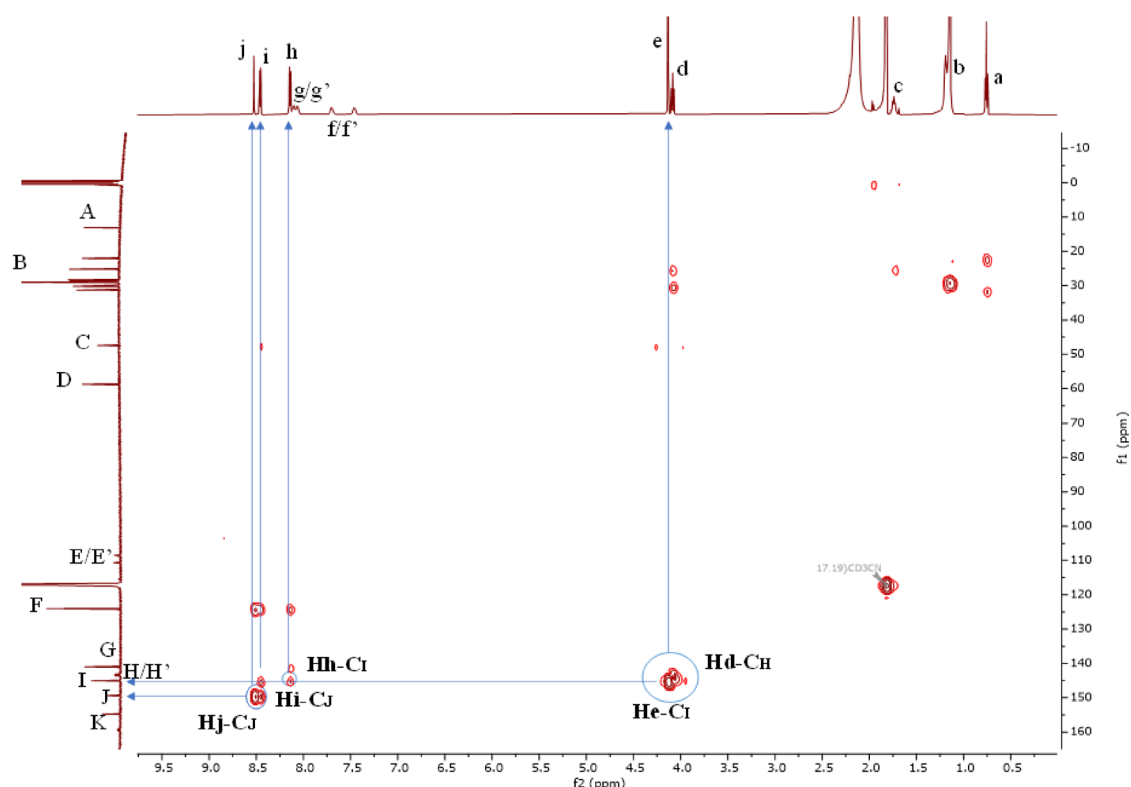


Figura 9: Espectro ^1H - ^{13}C HMBC (500 MHz, CD_3CN) del AC_{16} . Se resaltan las señales importantes para identificar los H_α y H_β piridínicos, así como los carbonos cuaternarios.

Para completar la caracterización del compuesto como $\text{AC}_{16}\cdot 2\text{TFA}$ se obtuvo su espectro de HR-ESI-MS (**Figura 10**). Se pudo reconocer fácilmente la señal de mayor intensidad y su asociada coincidiendo la masa exacta como la correspondiente al compuesto desprotonado: $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_4^+$, de m/z teórica 437,3639 y experimental 437,364. Además, puede verse otra señal correspondiente al compuesto protonado como $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_4^{2+}$ de m/z teórica 219,1856 y experimental 219,185. Por lo tanto, se ha podido confirmar por todas las técnicas la obtención del compuesto.

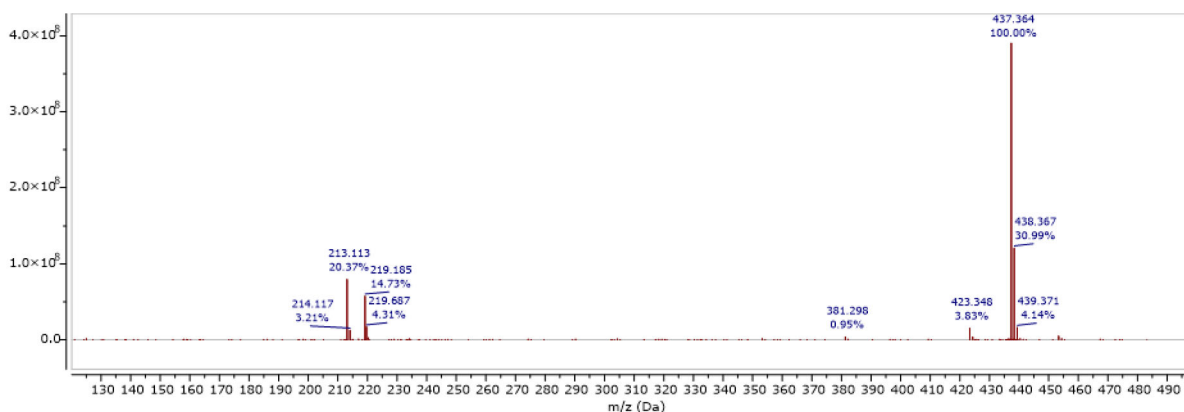


Figura 10: Espectro HR-ESI-MS del $Ac_{16}\cdot 2TFA$.

La caracterización para el otro anfifilo, Ac_6 , sería muy similar, puesto que varía únicamente la longitud de la cadena alquilada. Por lo tanto, se observarían menos señales de RMN 1H y ^{13}C en la región alifática (Figura A 8-Figura A 18).

3.4. Caracterización de las propiedades ácido-base

A continuación, se estudiará la respuesta al cambio de pH de los anfifilos. Compuestos como el vermellógeno y sus derivados tienen una respuesta al cambio de pH del medio, ya que conlleva la desprotonación del NH de la hidrazona, cuyo pK_a está en valores en torno a 9,¹⁵ lo cual provoca un cambio en la carga neta de 2^+ a 1^+ . El paso a la forma básica puede observarse a simple vista, dado que la disolución cambia de color de amarillo a rojo. Como se explicará más adelante, en la determinación de sus propiedades ácido-base, esto se debe a que el anfifilo absorbe a longitudes de onda distintas.

Se comienza caracterizando el compuesto en su forma protonada y desprotonada de forma comparativa, mediante RMN ^{13}C y 1H mono y bidimensional en medio orgánico, para después calcular el pK_a en medio acuoso en el que se realizarán los estudios de agregación, mediante espectroscopia UV-VIS y potenciometría.

3.4.1. Caracterización ácido-base en medio orgánico mediante RMN 1H

En primer lugar, se caracterizó estructuralmente el compuesto $Ac_{16}\cdot 2TFA$ protonado y desprotonado para poder comparar ambas formas. Se realizó en medio orgánico, con CD_3CN como disolvente, dada la agregación a muy bajas concentraciones en medio acuoso. En esta sección se explicará solo el $Ac_{16}\cdot 2TFA$, aunque el $Ac_6\cdot 2TFA$ se estudió utilizando las mismas técnicas (Figura A 8-Figura A 18).

Se caracterizó el anfifilo $Ac_{16}\cdot 2TFA$ a una concentración 2,5 mM, obteniendo el espectro explicado anteriormente. Dado que el estudio se realizó en medio orgánico no se pudo ver la característica deuteración del NH (H_k), que ocurre en D_2O , debida a la acidez del protón. La caracterización del compuesto desprotonado se realizó en CD_3CN , añadiendo dos equivalentes de Et_3N por mol de anfifilo.

Por lo tanto, se comienza confirmando que el compuesto está desprotonado, pues no se observa la señal NH de la hidrazona (Figura 11, espectro inferior en rojo). Esto conlleva un aumento en la densidad de carga de la molécula, que se deslocaliza a través de los anillos y el doble enlace, dando lugar a un mayor apantallamiento de las señales, de forma que

aparecerán a menores desplazamientos químicos que en medio ácido. En la región alifática se ve que H_e (s, 3H) y H_a (t, 2H) pasan de un desplazamiento de 4,13 a 3,96 y 4,09 a 3,75 ppm respectivamente, observando que H_a aparece más apantallada al estar más cerca del N^- . En la región aromática, la mayor diferencia de desplazamiento está en la señal imínica, que del compuesto protonado al desprotonado pasa de 8,52 a 8,02 ppm, quedando entre las señales de los α y β de la piridina metilada, siendo en ambos casos dos dobletes integrando por 2H. Destaca que, al desprotonar, en la piridilhidrazona las señales de los H_α aparecen con muy baja intensidad, mientras que los β muestran una mucho mayor y pasan a aparecer como un doblete, aparentemente sin verse afectado por la rotación impedida. Por lo tanto, la mayor deslocalización de la carga afecta en mayor medida a los H_α .

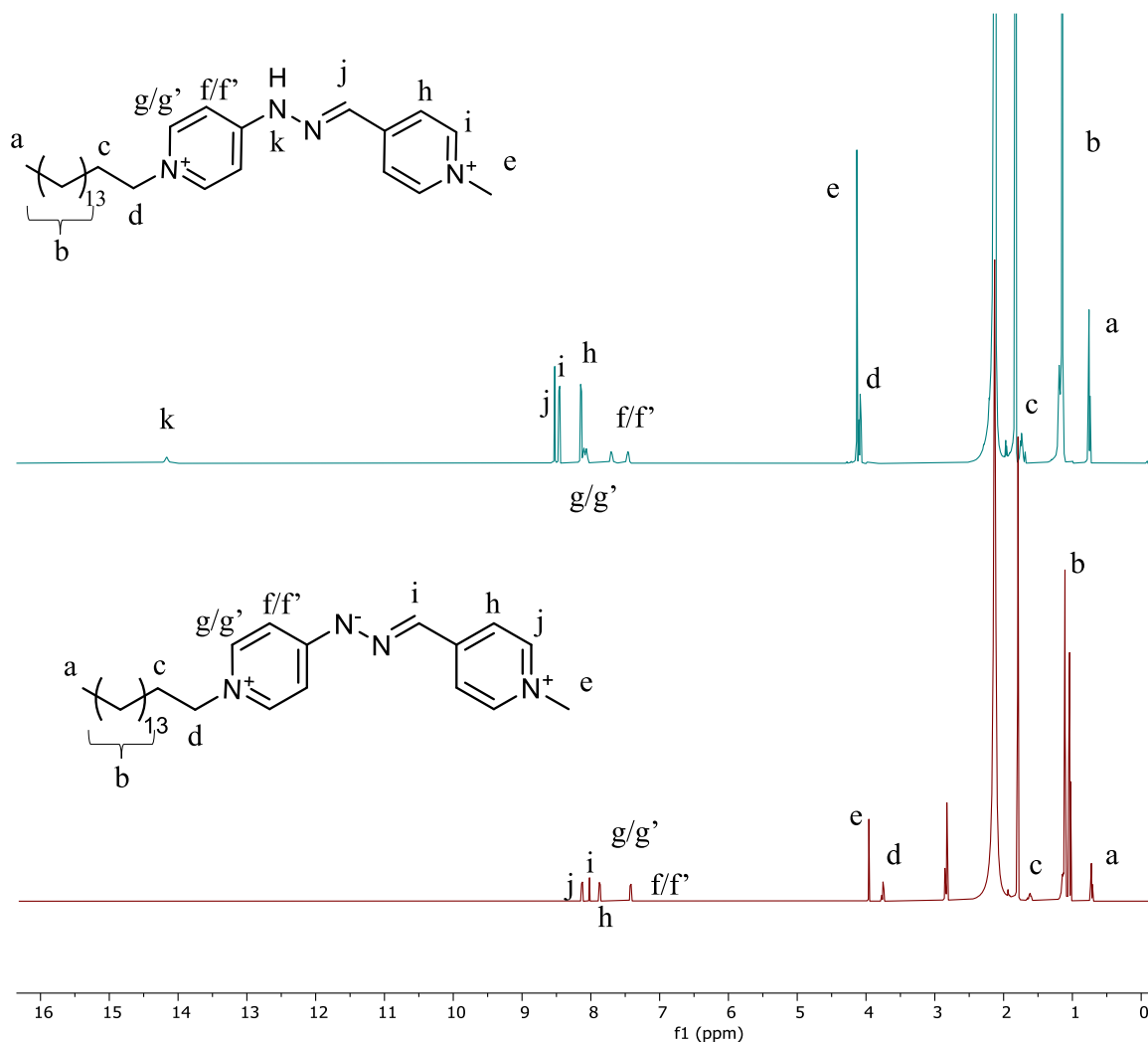


Figura 11: Espectro ¹H RMN ((500 MHz, CD₃CN) del Ac₁₆, azul protonado y rojo desprotonado con 2 equivalentes de Et₃N.

3.4.2. Caracterización ácido-base en medio acuoso.

Para evaluar su respuesta al pH, se continuó con el estudio de las propiedades ácido-base, determinando el pK_a, en medio acuoso. Para poder determinarlo mediante espectroscopía UV-VIS, primero es necesario comprobar que mantiene la linealidad en el intervalo de concentraciones de estudio, mientras la absorbancia sea menor de 1, para lo cual se utiliza la Ley de Lambert-Beer, que permite además calcular el ϵ del compuesto. Se realizó la

experiencia variando el pH del medio para estudiar el compuesto en sus formas ácida y básica. Se estudió para ambos anfifilos, viendo que el Ac_{16} pierde la linealidad a bajas concentraciones y presenta baja solubilidad en agua. Ante tal observación, se decide utilizar el compuesto más soluble, $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{Cl}$, para la determinación. Sabiendo que el Ac_{16} se trata de un compuesto muy parecido, manteniendo la unidad estructural dependiente del pH igual, las propiedades ácido-base se estiman muy similares. Dado que las desviaciones del Ac_{16} se asocian a la agregación, se verán en el siguiente apartado (3.5.) en el estudio de la agregación.

El experimento se realizó con el compuesto $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{Cl}$, midiendo su absorbancia según varía la concentración en distintos medios, ácido (a pH 6,01 tamponado con un buffer fosfato 20 mM) y básico (a pH 11,83 tamponado con un buffer fosfato 20 mM). Se observa que en medio ácido la disolución presenta un color amarillo y en medio básico se vuelve roja, por lo que al desprotonarse cambia la banda de absorción, es decir, las dos formas del compuesto absorben en diferentes longitudes de onda. Por lo tanto, se puede confirmar que el compuesto en el medio básico se encuentra desprotonado, ya que su máximo de absorción se encuentra a 468 nm en contraste con el máximo a medio ácido, a 371 nm. Los coeficientes de absorptividad molar conseguidos, $46\,951\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 468 nm y $41\,168\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 371 nm, se deben a las bandas de transiciones $\pi\text{-}\pi^*$. Estas longitudes de onda y estos valores se corresponden con las reportadas para el vermellógeno y derivados.¹³

Tras estudiar el cumplimiento de Lambert-Beer en el rango de concentraciones de estudio se calculó el pKa mediante espectroscopia UV-VIS a distintos pH. El cálculo se realizó modificando el pH del medio con buffers fosfato 20 mM, trabajando con una concentración 20 μM del $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{TFA}$. Se obtuvo el espectro (Figura 12), donde se observa un punto isobéptico claramente marcado.

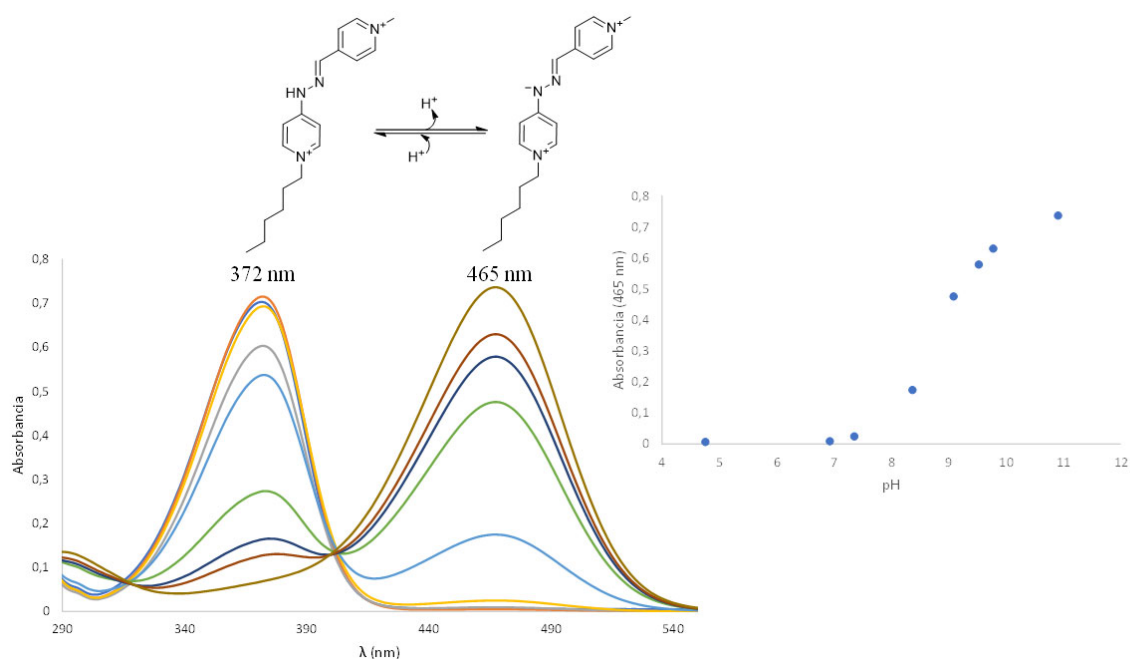


Figura 12: Superior) Equilibrio entre la especie protonada y desprotonada del $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{Cl}$. Inferior) Espectro UV-VIS del $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{Cl}$ a distintos pH (en un rango entre 4,78-10,91). Derecha) Absorción a 465 nm del $\text{Ac}_6 \cdot 2\text{Cl}$ frente al pH.

Con los datos de la absorbancia máxima de la banda ácida y básica a los distintos pH se puede calcular el pK_a mediante la representación del pH frente al siguiente \log_{10} :

$$\log \frac{(A - A_{\text{ácido}})}{(A_{\text{básico}} - A)}$$

$A_{\text{básico}}$: absorbancia máxima en el medio de pH más básico

$A_{\text{ác}}$: absorbancia máxima en el medio de pH más ácido

A: absorbancia a cada pH

Se consigue la recta:

$$pH = \log \frac{(A - A_{\text{ácido}})}{(A_{\text{básico}} - A)} + pK_a$$

Por lo que la ordenada en el origen se corresponde con el pK_a , obteniendo por lo tanto un valor de 8,95. (Valores experimentales en la **Tabla 4**)

El método alternativo para el cálculo del pK_a consistió en una potenciometría, que se realizó añadiendo una disolución acuosa de KOH 50 mM sobre una disolución 10 mM de $A_{C_6} \cdot 2Cl$. Sabiendo que el pK_a es igual al pH cuando hay el mismo porcentaje de especie protonada y desprotonada, este se obtiene como el punto medio del pH antes y después del salto, indicado como una flecha verde en la **Figura 13**, dando 8,5.

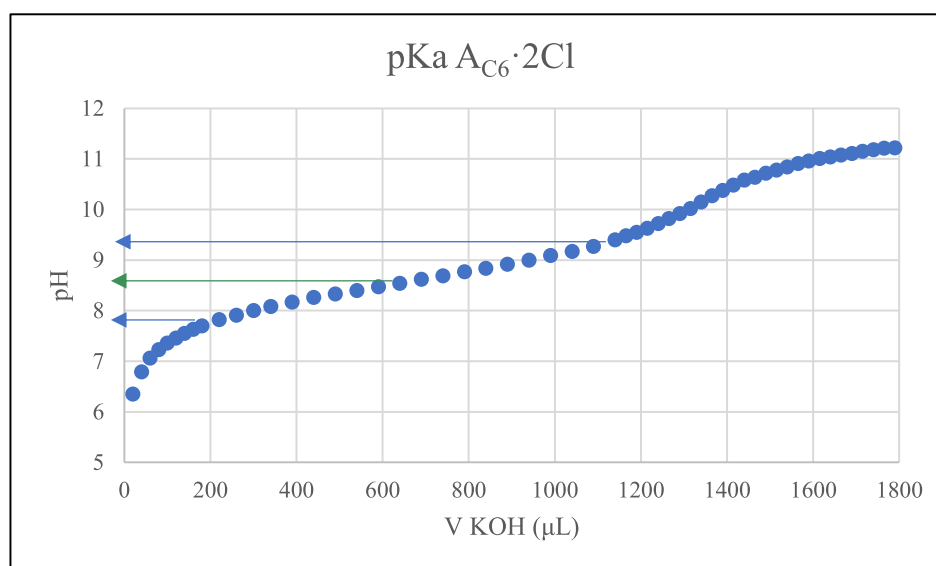


Figura 13: Potenciometría del $A_{C_6} \cdot 2Cl$, representando el pH frente al volumen de KOH añadido. Se marcan con flechas azules los límites del salto de pH y con una flecha verde el pKa.

Los valores obtenidos (**Tabla 1**) se comparan entre sí y con los reportados para el vermellógeno, es decir, con sustituyentes alifáticos CH_3 .¹³ Se comprueba que el pK_a conseguido por los dos métodos es muy parecido, con una ligera diferencia que puede deberse a desviaciones experimentales e inexactitud del método. Al compararlo con el pK_a de otros derivados se ve que no es significativamente distinto, siendo razonable la variación debido a las diferencias estructurales.

	Espectroscopia UV-VIS A_{C_6}	Potenciometría A_{C_6}	Derivado del vermellógeno (Ra=Me)
pK_a	9,0	8,5	9,0

Tabla 1. Valores de pK_a del $A_{C_6} \cdot 2Cl$ obtenidos por UV-VIS y potenciometría comparados con un derivado del vermellógeno (Ra).

3.5. Estudio de la agregación del $A_{C_{16}}$ en medio acuoso

Durante la caracterización de las propiedades ácido-base en medio acuoso, se vieron claras diferencias de solubilidad entre $A_{C_6}/A_{C_{16}}$. El $A_{C_{16}}$ mostró a simple vista la capacidad de agregar a concentraciones por debajo de $20 \mu M$, mientras que en su análogo no se observó agregación alguna incluso a concentraciones por encima de 10 mM . Por ello, se decide estudiar la agregación en agua del anfifilo $A_{C_{16}}$. Los dos anfifilos obtenidos son estructuralmente muy parecidos, pues su única diferencia radica en la longitud de la cadena alifática alquilada a una piridina. Este fragmento constituye la parte hidrofóbica del anfifilo, por lo que su longitud puede condicionar su agregación.

Como se mencionó anteriormente, en los estudios ácido-base se observaron desviaciones de la ley de Lambert-Beer relacionadas con la agregación del compuesto, por lo tanto, esta se puede estudiar mediante UV-VIS. Para comprobar la linealidad en el rango de concentraciones de trabajo se realizaron varios experimentos con $A_{C_{16}} \cdot 2Cl$ en medio tamponado con buffer fosfato/carbonato 20 mM , Como se ve en la **Figura 14**, al representar la absorbancia del máximo frente a la concentración hay un punto de inflexión en la linealidad que se corresponde con la cac. Los datos se pueden agrupar en dos tendencias lineales, así que la cac se puede determinar calculando su punto de corte.

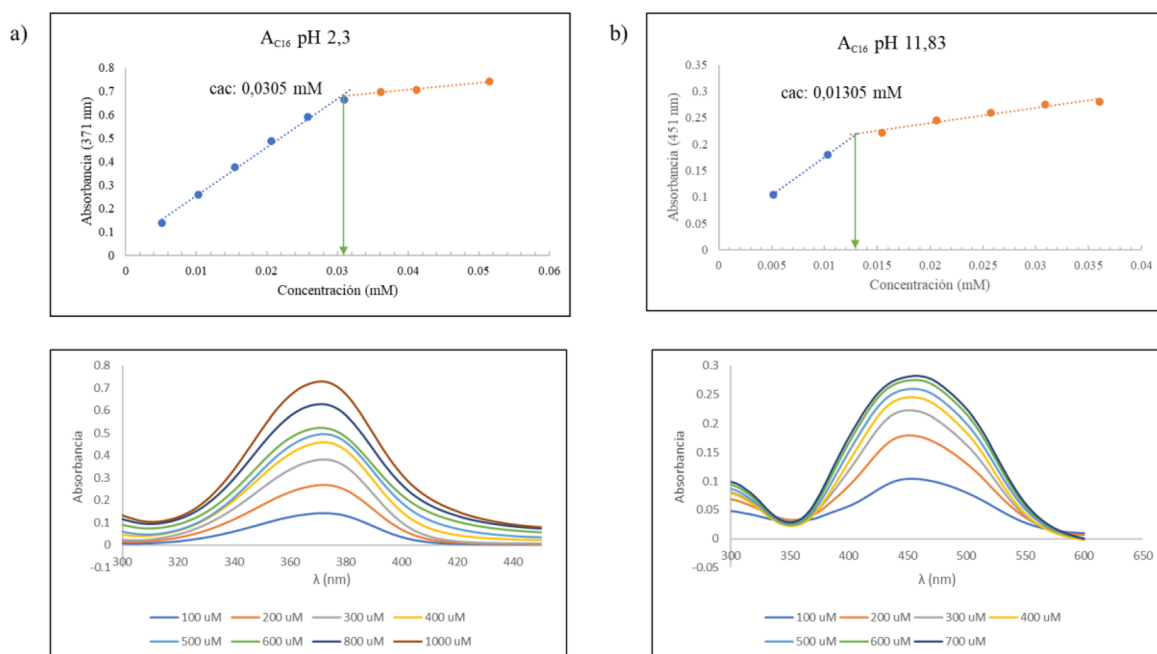


Figura 14: a) Medidas UV-VIS a pH 2,3 del $A_{C_{16}} \cdot 2Cl$ a λ :371 nm (superior). Espectro UV-VIS a distintas concentraciones a pH 2,3 (inferior). b) Medidas UV-VIS a pH 11,83 del $A_{C_{16}} \cdot 2Cl$ a λ :451 nm (superior). Espectro UV-VIS a distintas concentraciones a pH 2,3 (inferior). En ambos pH se indica con una flecha el punto de corte que marca la cac.

Se comprueba que la cac varía con el medio, siendo 0,0305 mM a pH 2,3 y 0,0131 mM a pH 11,83. Se observa que a pH básico el anfifilo forma agregados a menor concentración, y según baja el pH aumenta la concentración. En cada pH habrá una diferencia estructural referente a la carga del compuesto, ya que en medio básico se encuentra desprotonado como Ac_{16}^+ , y a pH 2,3, se encuentra protonado como Ac_{16}^{2+} . Se hicieron medidas también a pH 6,01 viendo que absorbía tanto en la zona básica como en la ácida, por lo que se puede esperar que en torno a ese pH haya mezcla de la especie protonada y desprotonada.

Después se trató de determinar la cac mediante conductimetría, trabajando con $Ac_{16}\cdot 2Cl$ y diluyendo desde concentraciones de 50 μM en buffer fosfato 20 mM, a pH 3. Se comprobó que la conductividad de la disolución del buffer no permite ver las diferencias debidas a la variación de concentración del compuesto. Como el buffer mantiene constantes los valores de la conductividad y es necesario para evitar variaciones en el comportamiento del anfifilo, esta técnica no puede ser utilizada y se recurre a otra.

A continuación, se estudió de forma cuantitativa la agregación mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Se realizaron 2 experimentos, uno en medio ácido a pH 3 y otro en medio básico a pH 11,69, para poder comprobar las diferencias en la agregación. Se trabajó con disoluciones de $Ac_{16}\cdot 2Cl$ (entre 50-0,001 μM) en buffer fosfato 20 mM, filtradas y a temperatura ambiente, maximizando la incidencia del láser con la de mayor concentración. La técnica de DLS suele utilizarse para determinar el tamaño y la forma de los agregados, pero debido a que es muy sensible a la presencia de pequeñas cantidades de agregación también puede servir para calcular la cac.¹⁷ Dado que la dispersión de la luz se correlaciona con el tamaño de las partículas en disolución, se pueden diferenciar los agregados de sus monómeros, mostrando un cambio en la tendencia de los datos a partir de la cac. Esto se debe a que según disminuye la concentración, también lo hace la cantidad de agregados, hasta llegar al punto donde sólo se tendrá monómeros discretos.

Si se representa el número de cuentas (count rate/kps) frente a la concentración de la disolución medida se puede obtener una cac en el punto de corte de las dos tendencias de los datos, como se ve en la **Figura 15**.

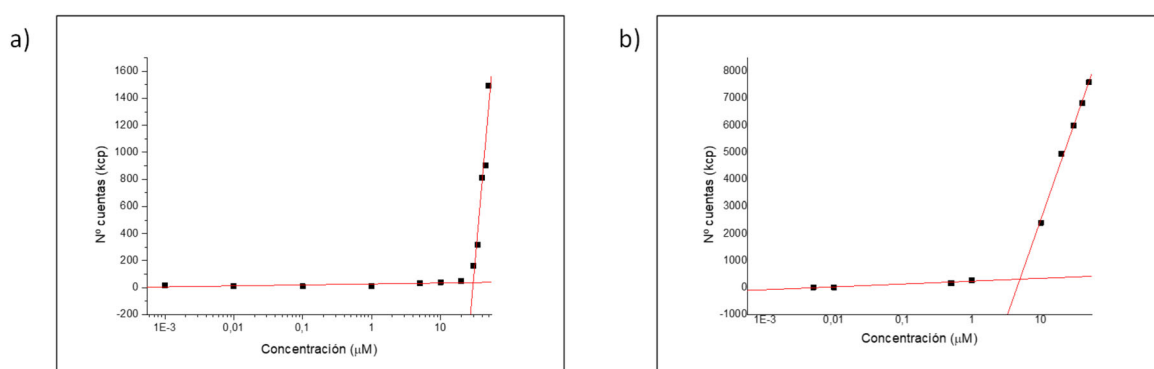


Figura 15: a) Ejemplo de una de las experiencias de DLS del $Ac_{16}\cdot 2Cl$ en medio básico. b) Ejemplo de una de las experiencias de DLS del $Ac_{16}\cdot 2Cl$ en medio ácido.

¹⁷ Shi, Y.; Zhou, H.; Zhang, X.; Wang, J.; Long, J.; Yang, Z.; Ding, D. Self-Assembling Choline Mimicks with Enhanced Binding Affinities to C-LytA Protein. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6621.

Se realizaron 2 réplicas del experimento en medio ácido y básico (**Figura A 22-Figura A 25**). A ambos pH se observó tendencia a la agregación, siendo lo esperado a la vista de los resultados obtenidos mediante UV-VIS. Para el medio ácido, en el cual el anfifilo presenta dos cargas positivas, se obtuvo un valor medio de cac de $0,02997 \pm 0,006675$ mM, mientras que para el básico fue menor, estando en $0,00829 \pm 0,001831$ mM. Estos valores se corresponden bien con los estimados mediante UV-VIS, ya que eran valores cercanos y con la misma tendencia dependiente del pH.

Se observa que en medio básico la agregación se da a menores concentraciones, lo cual se debe al cambio en la carga del compuesto, ya que pasa de Ac_{16}^{2+} a Ac_{16}^+ . Esto modifica la parte polar del anfifilo de forma que, al disminuir su carga, la cadena apolar influirá más en el comportamiento de la molécula, tendiendo a agregarse antes en un medio polar, como el agua.

Se repitió la experiencia en medio ácido para el $Ac_6 \cdot 2Cl$, en el mismo rango de concentraciones ($50-0,001 \mu M$) y se comprobó que no mostraba signos de agregación. Teniendo en cuenta las diferencias estructurales entre ambos compuestos, el Ac_6 presenta una cadena (que se corresponde con la parte apolar del anfifilo) considerablemente más corta, es lógico que agregue a mayores concentraciones que el Ac_{16} o incluso no llegue a agregar.

Finalmente, se pudieron observar las estructuras de agregación formadas mediante un microscopio electrónico. Como se ve en la **Figura 16**, tomada a una concentración $50 \mu M$ en buffer fosfato 20 mM, a pH 6, el Ac_{16} forma fibras con rangos de longitud sobre $100-20 \mu m$.

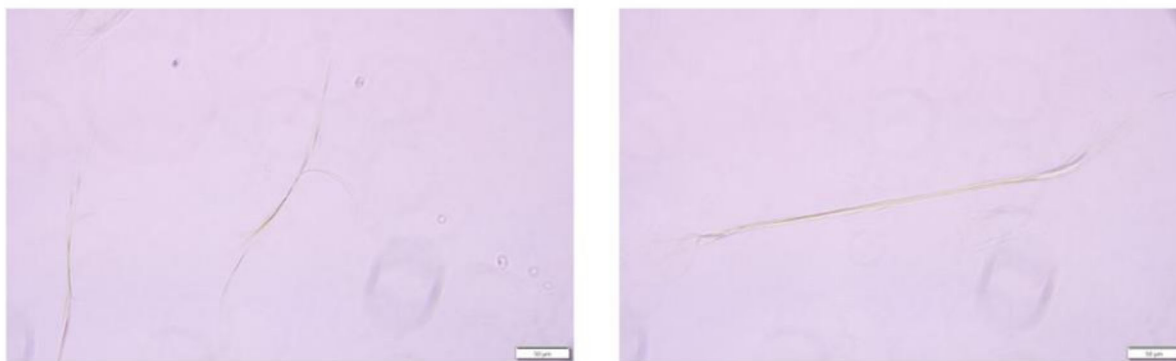


Figura 16: Fotos del $Ac_{16} \cdot 2Cl$ $50 \mu M$ en buffer fosfato a pH 6 sacadas con microscopio electrónico. Escala a $50 \mu m$.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos, equipos

En la parte experimental de este trabajo se han utilizado los reactivos y disolventes comerciales del laboratorio sin purificar. El agua milliQ se obtuvo utilizando un equipo Millipore Gradiente A10. Los compuestos P3 y P1 se sintetizaron y caracterizaron de acuerdo a lo reportado por el grupo de investigación.¹⁵ Para la agitación por ultrasonidos se usó un equipo Branson 2510. Para la medida de pH se utilizó un pH-metro Fisher Scientific Accumet AE150. La cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254, utilizando como disolvente acetato de etilo o “Magic” (mezcla de disolventes polares que consiste en 600 ml de MeCN, 150 ml de MeOH, 150 ml de H₂O y 5 g de NaCl). Para revelar se utilizó radiación ultravioleta de 254 y 360 nm. En las liofilizaciones se utilizó un liofilizador Telstar Cryodos -80.

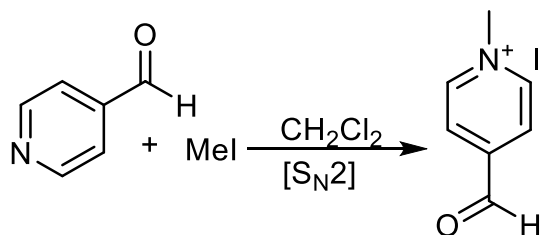
Los espectros ¹H RMN (300 MHz) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance 300, mientras que para la caracterización mono y bidimensional se enviaron las muestras al SAI (Servizo de Apoio á Investigación) donde se obtuvieron los espectros (500 MHz y 125 MHz, para ¹H y ¹³C respectivamente) con un espectrómetro Bruker Avance 500. Las muestras se prepararon en disolventes deuterados, D₂O y CD₃CN, siendo este último el utilizado en las caracterizaciones estructurales.

Las medidas UV-VIS se realizaron en un equipo Jasco V-650 spectrometer. El DLS en un equipo Nano Brook 90Plus Zeta.

La purificación por HPLC analítico se realizó en un equipo Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000, con un detector UV-VIS en 220 nm, utilizando una columna C18. Los eluyentes fueron H₂O y MeCN, ambos con 10 % de TFA. La purificación por HPLC preparativo se realizó en un equipo Agilent modelo 1260 Infinity II, con una columna InfinityLab ZORBAX Eclipse Plus C18 (de tamaños 21,2 x 250 mm, 5 μm)

4.2. Síntesis del anfífilo Ac6

4.2.1. Síntesis del precursor P3:

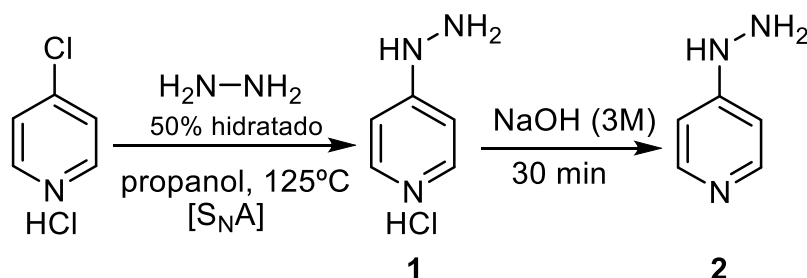


En un balón de 100 ml se añaden 22 ml de CH₂Cl₂, después se añaden 0,370 ml de 4-formilpiridina (4,01 mmol, 1 equivalente) y 3,8 ml de MeI (60 mmol, 15 equivalentes). Se deja la disolución (tono rosado), tapada con un septum, agitando. Se observa que se vuelve más oscura y aparece un precipitado blanco. Tras 48 horas se añaden 15 equivalentes más de MeI, tras comprobar por ccf que aún queda formilpiridina. Dos días más tarde, se filtra a vacío la disolución obteniendo un sólido naranja, que se lavó con éter 2×10ml y se secó con una corriente de N₂. Se obtuvo una cantidad de 0,8772 g, con un rendimiento del 88%.

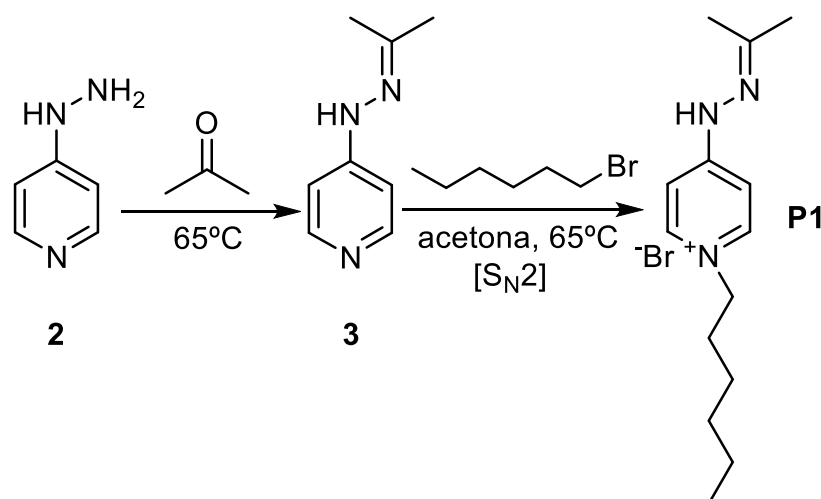
¹H RMN (300 MHz, D₂O)

δ (ppm)= 4,42 (s, 3H), 6,24 (s, 1H), 8,15 (d, 2H, *J*=6,28 Hz), 8,82 (d, 2H, *J*=6,27 Hz).

4.2.2. Síntesis del precursor P1:



En un matraz de 250 ml se añaden 8,6 g de hidrocloreuro de 4-cloropiridinio (57 mmol, 1 equivalente), a continuación 130 ml de propanol y 20 ml de hidrazina 50% hidratada (642 mmol, 11 equivalentes). La disolución, blanquecina, se deja agitando y calentando a 125 °C con reflujo. Al día siguiente se monitoriza la reacción mediante ccf y RMN ¹H, viendo que ha reaccionado. Se deja enfriar y se evapora en el rotavapor sin llegar a sequedad, secando con una corriente de N₂. Se obtienen 13,47 g de un sólido amarillo (**reactivo 1**), todavía húmedo. Se añaden 4,01 g (28 mmol, 1 equivalente) del **reactivo 1** en 50 ml de una disolución 3M de NaOH. Se deja agitando durante 30 minutos, tras lo cual se pasa a un embudo de decantación y se extrae con acetato de etilo 5x50 ml, recogiendo la fase orgánica en un Erlenmeyer, donde se seca con MgSO₄. A continuación, se evapora en el rotavapor, sin llegar a sequedad, y se seca con una corriente de N₂. Se obtienen 1,91 g de sólido (**reactivo 2**), con un rendimiento del 64%. Los datos espectroscópicos para el **reactivo 1** y el **reactivo 2**, coinciden con los reportados.



En matraz de 250 ml se echan 1,095 g del **reactivo 2** y se añaden 100 ml de acetona. La disolución, amarilla, se deja agitando y calentando a 65 °C durante 1h y 30 min. Entonces se añaden 2,11 ml de bromohexano, y continúa en las mismas condiciones de agitación y calentamiento. A las 12h se ve que la disolución se ha vuelto naranja-roja, y se hace una ccf y un RMN ^1H , donde se ve que la reacción aún no ha finalizado. Se repiten a las 36h, y se comprueba que ha formado el producto alquilado (**P1**).

Se deja enfriar la disolución y se rota, obteniendo un sólido aceitoso con restos de acetona. Se redissuelve en 20 ml de acetonitrilo y se lava con hexano en un embudo de decantación, 8x50 ml hasta que dejan de aparecer impurezas en el espectro de RMN ^1H . A continuación, se trasvasa y se rota, obteniendo un sólido aceitoso denso, 1,6641 g, con un rendimiento del 53%.

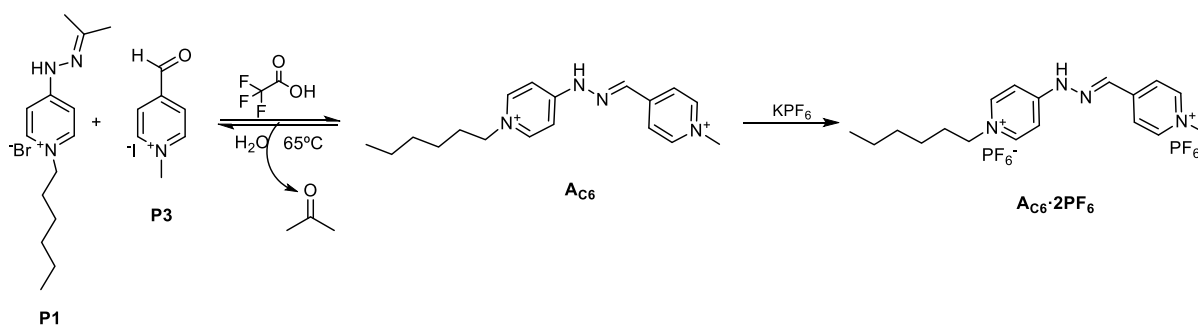
^1H RMN (500 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 0,74 (m, 3H), 1,16 (m, 6H), 1,67 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 3,96 (t, 2H, $J=7,33$ Hz), 7,28 (d, 1H, $J=7,42$ Hz), 7,63 (d, 1H, $J=7,51$ Hz), 7,86 (d, 1H, $J=18,41$ Hz, 7,34 Hz), 10,63 (s, 1H).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 14,12 (CH_3), 19,41 (CH_3), 22,99 (CH_2), 25,51 (CH_3), 26,21 (CH_2), 31,30 (CH_2), 31,77 (CH_2), 59,11 (CH_2), 108,02 (CH), 110,13 (CH), 142,71 (CH), 144,10 (CH), 156,00 (C), 158,75 (C).

4.2.3. Síntesis del Ac_6 por condensación de los precursores **P1** y **P3**:



Se disuelven, en agua destilada, 0,2490 g de **P1** en un matraz de 250 ml. A continuación, se añaden 0,2228 g de **P3** y se llevan a un volumen total de 160 ml agua destilada. A esta disolución, amarillo oscuro, se agregan 60 μL de TFA. Se deja agitando y calentando a ebullición (65 $^{\circ}\text{C}$). A las 24h se comprueba el avance con un RMN ^1H , y se deja reaccionar un día más. A las 48h se ha completado la reacción, tras dejar enfriar la disolución se añade KPF_6 , (4 equivalentes por mol). Se forma un precipitado blanco, que se filtra a vacío lavando con agua. Después se seca con una corriente de N_2 y se comprueba por RMN ^1H que está libre de impurezas. Se obtienen 0,3285 g de sólido, polvo blanco, consiguiendo un rendimiento del 70%.

^1H RMN (500 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 0,79 (t, 3H), 1,22 (m, 6H), 1,77 (m, 2H), 4,14 (t, 2H, $J=7,45$ Hz), 4,17 (s, 3H), 7,10 (s aparente, 1H), 7,75 (s aparente, 1H), 8,11 (s, 1H), 8,16 (d, 4H, $J=6,41$ Hz), 8,50 (d, 2H, $J=6,31$ Hz), 10,99 (s, 1H).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 14,08 (CH_3), 22,98-31,54 (CH_2), 48,79 (CH_3), 60,17 (CH_2), 110,18 (CH), 111,53 (CH), 125,41 (CH), 141,87 (CH), 144,92 (d, CH+CH), 146,41 (CH), 149,98 (C), 155,16 (C).

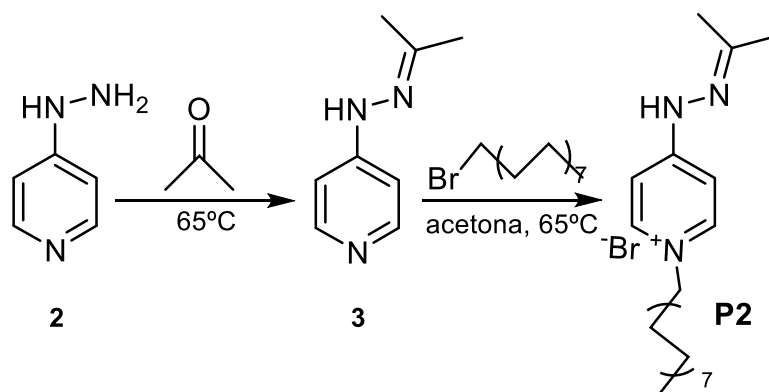
HR-ESI-MS

m/z teórica para $[\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_4^+]$: 297,2074 y la experimental 297,207. Para $[\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4^{2+}]$: 149,1073 y experimental de 149,107.

4.3. Síntesis del anfifilo **Ac16**

4.3.1. Síntesis del precursor **P2**:

Se añaden 2,0035 g del **reactivo 1** (14 mmol, 1 equivalente) en 25 ml de una disolución acuosa 3M de NaOH. Se forma una disolución amarilla transparente, que se deja agitando durante media hora. A continuación, se extrae el compuesto con 5x40 ml de acetato de etilo. Se recoge la fracción orgánica, se seca con MgSO_4 y se filtra a gravedad. Después se rota, obteniendo un líquido marrón denso (**reactivo 2**).



Sobre este líquido se añaden 50 ml de acetona, dejándolo en agitación y calentando a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas. Pasado este tiempo se añaden 1,21 ml (4 mmol, 0,29 equivalentes) de 1-

bromohexadecano y se deja en las mismas condiciones toda la noche. Al día siguiente la disolución se ha vuelto rojiza. Se le realiza un RMN ^1H en D_2O , donde se ve que todavía no ha reaccionado totalmente, por lo que se deja más tiempo y se sube la temperatura a $75\text{ }^\circ\text{C}$. Pasadas 24 h se realizó un segundo RMN ^1H en CD_3CN , donde se ve el producto. Por lo tanto, se deja enfriar y se rota, obteniendo un sólido naranja. Después, se redisuelve en 50 ml de MeCN y se lava 7x40 ml con hexano, separando la disolución con el producto, naranja, del hexano, incoloro. Se monitoriza mediante RMN ^1H y ccf que no queden restos del material de partida. Finalmente, se evapora el disolvente en el rotavapor, obteniendo 0,8012 g de un sólido naranja (**P2**) con 44% de rendimiento.

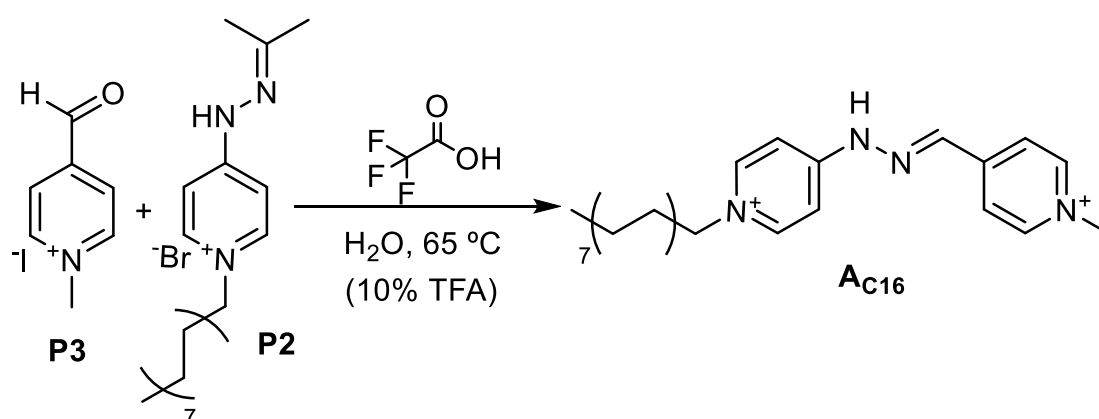
^1H RMN (500 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 0,81 (t, 3H), 1,19 (m, 26H), 1,74 (t, 2H), 1,99 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 4,02 (t, 2H, $J=7,31$ Hz), 7,36 (d, 1H, $J=7,21$ Hz), 7,51 (d, 1H, $J=7,14$ Hz), 7,88 (d, 1H, $J=7,36$ Hz), 7,93 (d, 1H, $J=7,33$ Hz), 10,31 (s, 1H).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3CN)

δ (ppm)= 13,97 (CH_3), 18,61 (CH_3), 22,98 (CH_2), 25,16 (CH_3), 26,15 (CH_2), 29,23-32,22 (CH_2), 58,84 (CH_2), 107,76 (CH), 109,73 (CH), 142,50 (CH), 143,83 (CH), 155,58 (C), 158,23 (C).

4.3.2. Condensación de los precursores **P2** y **P3** a **Ac16**



Se añaden 0,2970 g (0,65 mmol, 1 equivalente) del **P2** en agua, formando una disolución amarilla, sobre esta se echan 0,2123 g (0,85 mmol, 1,3 equivalentes) del **P3**. La disolución pasa de amarilla a blanca, y más tarde a rosa. Se añade un volumen total de 190 ml de agua y 20 μL de TFA, y se deja agitando y calentando a $65\text{ }^\circ\text{C}$.

Al día siguiente se monitoriza el avance de la reacción mediante RMN ^1H , como todavía se observan reactivos de partida, tanto en el RMN como sin disolver, se añaden 30 μL de TFA y se sube la temperatura a $75\text{ }^\circ\text{C}$. Tras 72 h se deja enfriar y se trasvasa a 7 tubos falcon para liofilizarlo. Después de 3 días se obtienen 0,2465 g de producto, sólido naranja (comprobado por ^1H RMN en CD_3CN), con un rendimiento del 57%.

Para obtenerlo como **Ac16** \cdot **2PF6**, se disuelven 100 mg de producto en 150 ml de agua, formando una disolución marrón. Después se añade KPF₆, 4 equivalentes por carga, y se deja

agitando durante 30 minutos. La disolución pasa de marrón a amarillo y finalmente forma un sólido blanco en suspensión. Este se filtra a vacío lavando con agua, y se pesa. Se obtienen 0,0745 g de producto, con un rendimiento del 68%.

¹H RMN (500 MHz, CD₃CN)

δ (ppm)= 0,76 (t, 3H, *J*=6,82 Hz), 1,17 (m, 26H), 1,75 (q, 2H, *J*=7,25, 7,10), 4,08 (t, 2H, *J*=7,37 Hz), 4,13 (s, 3H), 7,46 (s aparente, 1H), 7,70 (s aparente, 1H), 8,08 (d, 2H, *J*=17,34 Hz), 8,14 (d, 2H, *J*=6,64 Hz), 8,46 (d, 2H, *J*=6,56 Hz), 8,52 (s, 1H), 14,17 (s, 1H).

¹³C RMN (126 MHz, CD₃CN)

δ (ppm)= 13,06 (CH₃), 22,05-31,30 (CH₂), 47,45 (CH₃), 58,70 (CH₂), 108,48 (CH), 110,66 (CH), 124,03 (CH), 140,99 (CH), 143,37 (CH), 145,02 (CH), 149,39 (C), 154,77 (C).

HR-ESI-MS

m/z teórica para [C₂₈H₄₅N₄⁺]: 437,3639 y la experimental 437,364. Para [C₂₈H₄₆N₄²⁺]: 219,1856 y experimental de 219,185.

4.4. Purificación por HPLC y metátesis

4.4.1. Purificación del producto por HPLC

Para purificar por HPLC se disolvió parte del producto en una mezcla de MeCN:H₂O con TFA, con la máxima proporción de agua posible para que se solubilice. Se parte de un proceso optimizado previamente por el grupo de investigación para compuestos similares, adaptando las condiciones iniciales. En primer lugar, se comprobó mediante HPLC analítico que se producía una separación satisfactoria en esas condiciones de tiempo y eluyentes (indicadas en **Tabla 2** y **Tabla 3**) obteniendo los cromatogramas de la **Figura A 19**.

Para el **Ac₆** se preparó una disolución 2,8 mg de **Ac₆·2PF₆** en 9,51 ml de 85:15 de H₂O:MeCN, y se filtró a través de un filtro NY 0,020 μm. Se inyectó en las condiciones de la **Tabla 2** para dar el cromatograma de la **Figura A 19.a**. Se parte del método ya optimizado anteriormente por el grupo de trabajo, cambiando ligeramente las condiciones iniciales para adaptarlas al compuesto.

Tiempo (min)	H ₂ O (%)	MeCN (%)	Flujo (ml/min)
Inicio	85	15	20
3	85	15	20
18	45	55	20
19	5	95	20
26	5	95	20
27	85	15	20
35	85	15	20

Tabla 2. Gradiente para la purificación por HPLC analítico del **Ac₆**.

Para el **Ac₁₆** se trabajó con el crudo obtenido tras la liofilización, disolviendo 1,4 mg en 4,34 ml de una mezcla 1:1 de H₂O:MeCN y filtrando antes de inyectar. Se trabaja siguiendo la misma metodología que con el **Ac₆**, de forma que se obtienen las siguientes condiciones de trabajo (**Tabla 3**) y el cromatograma de la **Figura A 19.b**.

Tiempo (min)	H ₂ O (%)	MeCN (%)	Flujo (ml/min)
Inicio	50	50	20
6	50	50	20
26	20	80	20
27	5	95	20
34	5	95	20
36	85	15	20
38	85	15	20

Tabla 3. Gradiente para la purificación por HPLC analítico del Ac₁₆.

Después se llevó a cabo, en estas condiciones, una purificación mediante HPLC preparativo en fase reversa obteniendo los siguientes cromatogramas (**Figura A 20** y **Figura A 21**), para el **Ac₆** y **Ac₁₆** respectivamente), recogiendo el eluyente y liofilizándolo para obtener el producto.

Para el **Ac₆**, se disuelven 0,3283 g del producto, **Ac₆·2PF₆**, en 4 ml de una disolución H₂O:MeCN (85:15). La disolución, amarilla, se hace pasar a través de un filtro Nylon 0,020 µm. Se inyectan los 4 ml en el equipo y se recogen 3 tubos de eluyente, disoluciones transparentes de color amarillo, correspondientes al mismo pico del cromatograma. Tras realizar una medida de masas se identifica el producto en todos los picos recogidos, que a continuación se liofilizan, obteniendo un sólido amarillo. Se realiza un RMN ¹H (D₂O) donde se ve el producto con restos de agua, por lo que se seca con una corriente de N₂. Después se pesa, obteniendo 92,4 mg, lo cual conlleva un rendimiento del 32 %.

Para el **Ac₁₆**, se disuelven 49,6 mg del crudo de reacción de la condensación, en 6 ml de MeCN:H₂O (1:1). Se sigue el mismo procedimiento que para el **Ac₆**, recogiendo varios tubos para 4 picos distintos. Se liofiliza, obteniendo un sólido marrón para el pico 1 y uno amarillo para los 3 últimos picos. Se comprueba que el pico 1 no corresponde al producto mediante un RMN ¹H. Se consiguen 20,7 mg de producto, con un rendimiento del 42 %.

4.4.2. Cambio de contraión a Cl

Para el primer caso, se disuelve el producto obtenido de la purificación en agua, a la que se añade luego HCl. De esta forma, tras agitar, se produce un intercambio entre Cl y el TFA, este último queda en disolución pudiendo ser sublimado en la liofilización junto con el disolvente, obteniendo así la sal de cloruro. Se disuelven 18,8 mg de **Ac₁₆·2TFA** en 24 ml de H₂O, con 1 ml de HCl 0,1 M, en agitación. Después se liofiliza obteniendo 8,8 mg de un sólido marrón. Se comprueba mediante RMN ¹⁹F en D₂O que no quede TFA. Se consigue un rendimiento de 35%.

En el segundo caso, se disuelve el producto o el crudo, en MeCN y se añade TBACl. Al agitar se intercambian los contraiones y se obtiene el **Ac·2Cl** que precipita inmediatamente en medio

orgánico. Se disuelven 0,3285 g del producto $\text{Ac}_{16}\cdot 2\text{PF}_6$ en la mínima cantidad de MeCN, 4 ml. A continuación, se añaden 2 equivalentes por carga de TBACl (0,6207g) disueltos en MeCN. Se forma inmediatamente un precipitado amarillo. Se deja agitando durante 30 min, tras lo cual se filtra a vacío lavando con MeCN y éter. Se observa que el MeCN disuelve parte del producto, ya que el filtrado presenta un color amarillo. Se obtienen 92 mg de un sólido amarillo, con un 45 % de rendimiento.

4.5. Estudios ácido-base

4.5.1. Cálculo del pKa por UV VIS y potenciometría

Para UV-VIS:

Se preparan 4 ml de una disolución acuosa del anfífilo 1 mM (2,1 mg del $\text{Ac}_6\cdot 2\text{Cl}$, en agua milliQ), obteniendo una disolución amarilla. Se mide la absorbancia variando el pH con buffers 20 mM, manteniendo siempre la misma concentración del anfífilo. Se añaden 40 μL de la disolución preparada variando las cantidades de los buffers hasta 2 ml, trabajando con una concentración final de anfífilo 20 μM .

pH (medido)	V de NaH_2PO_4 (μL)	V de Na_2HPO_4 (μL)	V de KHCO_3 (μL)	V de K_2CO_3 (μL)	Abs (465 nm)	$\log [(A-A_{\text{ác}})/(A_{\text{ba}}-A)]$
4,76	1960				0,00608249	
6,93	980	980			0,00943331	-2,336250488
7,36	490	1470			0,0246841	-1,582640789
8,37		1960			0,174423	-0,52338382
9,09			1960		0,475596	0,255648685
9,53			1715	245	0,578494	0,55982985
9,78			1470	490	0,629494	0,766541208
10,91				1960	0,736211	

Tabla 4: Datos experimentales de la determinación del pKa del $\text{Ac}_6\cdot 2\text{Cl}$ a 20 μM en los buffer indicados (20 mM).

Se trabaja con una cubeta de cuarzo, a temperatura ambiente y en un rango de longitud de onda entre 220-600 nm.

Los cálculos se basan en que la absorbancia total de la disolución se debe a la suma de las absorbancias de la especie ácida y básica:

$$A_{\text{Total}} = A_{\text{ácida}} \cdot C_0(1 - \alpha) + A_{\text{básica}} \cdot C_0(\alpha)$$

Ecuación 1

Siendo C_0 la concentración total del anfífilo en disolución, y sabiendo que α (grado de disociación de la especie) es igual a:

$$\alpha = \frac{A_{\text{total}} - A_{\text{ácida}}}{A_{\text{básica}} - A_{\text{ácida}}}$$

Ecuación 2

Para relacionar la absorbancia con el pH, se utiliza la **Ecuación de Henderson-Hasselbalch**:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Desprotonado]}{[Protonado]}$$

Ecuación 3

Se puede expresar la concentración de cada especie de la siguiente forma, relacionándola con el equilibrio de disociación:

$$\frac{[Desprotonado]}{[Protonado]} = \frac{C_0(\alpha)}{C_0(1-\alpha)} = \frac{A - A_{\text{ácida}}}{A_{\text{básica}} - A}$$

Ecuación 4

Por lo tanto, se puede reorganizar la **Ecuación 3** combinándola con la **Ecuación 2**, para obtener:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Desprotonado]}{[Protonado]} = pK_a + \log \frac{A - A_{\text{ácida}}}{A_{\text{básica}} - A}$$

Ecuación 5

Sustituyendo en la **Ecuación 3** los valores de absorbancia ácida y básica obtenidos experimentalmente, medidos en los pH 4,76 y 10,91, y con A siendo el de cada medida.

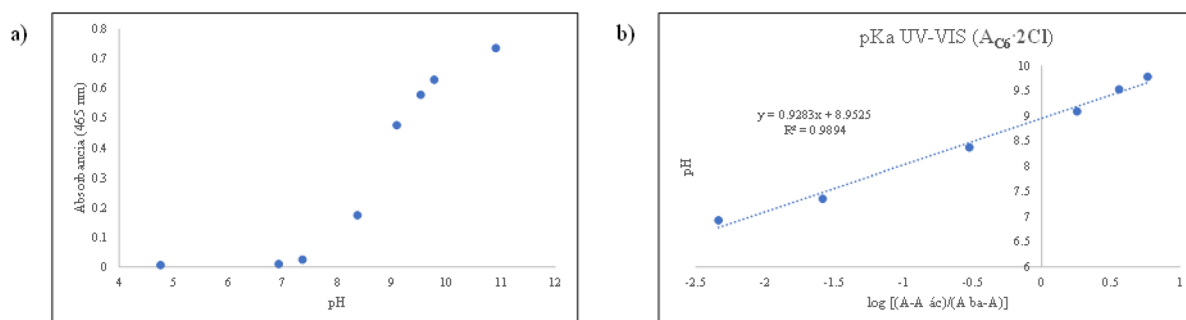


Figura 17: a) Representación de la absorbancia del $Ac_6 \cdot 2Cl$ frente al pH. b) Linealización del pH frente al $\log_{10} [(A - A_{\text{ácido}})/(A_{\text{básico}} - A)]$ para obtener el valor del pKa.

Para la potenciometría:

Se preparan 5 ml de una disolución acuosa 10 mM del anfifilo $Ac_6 \cdot 2Cl$ (18,5 mg en agua milliQ) y 10 ml de una disolución 50 mM de KOH (agua milliQ). Tras medir el pH inicial, se comienza a añadir KOH, representando el pH frente al volumen añadido se obtiene el espectro de la **Figura 13**.

4.5.2. Cálculo de ϵ

Se preparan 4 ml de una disolución acuosa 1 mM del anfifilo $AC_{16}\cdot 2Cl$ (1,7 mg en agua milliQ).

a)	V (μL)	C. fin (mM)	Abs (371nm)	b)	V (μL)	C. fin (mM)	Abs (468nm)
	5	0.00249377	0.0935168		10	0.00497512	0.113099
	10	0.00497512	0.202013		20	0.00990099	0.344773
	15	0.00749569	0.31299		30	0.01477833	0.594041
	20	0.00997506	0.403205		40	0.01960784	0.836253
	25	0.01243781	0.514947		50	0.02439024	1.0065
	35	0.01736973	0.712002				
	45	0.02227723	0.783840				

Tabla 5. a) Valores de volumen añadido de la disolución de AC_{16} , Concentración final de AC_{16} y de la Absorbancia de la disolución para el medio ácido. b) De la misma forma para el medio básico.

4.5.3. DLS en medio ácido y básico

En primer lugar, se prepara una disolución de buffer fosfato 20 mM a pH 3 y otra a pH 12. Para cada uno de estos medios se hicieron disoluciones desde 500 a 0,001 μM de $AC_{16}\cdot 2Cl$, filtrando previamente las disoluciones de buffer con un filtro NY 0,020 μm .

Se trabaja con una cubeta de fluorescencia de cuarzo, limpiando entre medidas con acetona y evaporándola con una corriente de N_2 . Se trabaja maximizando la potencia del láser incidente con la disolución de mayor concentración, con un tiempo de espera de 1 min antes de comenzar y medidas en intervalos de 5 segundos, durante un tiempo total de 20 s, repitiéndose 7 veces para cada muestra. Se realizan a temperatura ambiente.

En las siguientes tablas se muestran los datos experimentales para cada experiencia:

A pH 3:

C. μM kps	1	2	3	4	5	6	7	Media
50	1232,5	1492,4	2395	1681,4	1319,7	843,1		1494,0167
45	875,9	862,1	710,6	651,6	753,6	1224,6	1248,8	846,4000
40	1214,8	817,2	836,3	608,3	758,3	638,1		812,1667
35	339,8		352	362,3	237	297,7		317,7600
30	161,9	143,4	156,3	108,5	167,7	219,8		159,6000
20	43,2	52,7	56	53,2	35			48,0200
10	37	37	29,1	61,1	39,1	29	41	38,7167
5	26,8	36,9	37	31,5	34,9	26,2	25,7	32,2167
1	7,6	11,3	26,4	9	7,8	9,1	8,6	11,8667
0,1	8,7	8,2	12,7	8,9	9,5	9,4		9,5667
0,01	9,4	9,8	8,7	14,1	19,6	8,5		11,6833
1,00E-03	12,9	11,8	16,4	22,8	19,9			16,7600

Tabla 6: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 3 del $AC_{16}\cdot 2Cl$ (Experimento 1).

C. μM kps	1	2	3	4	5	6	7	Media
100	374	427,1	375,3	370,4	351,1	400,8		383,1167
75	218,2	179,4	184,2	233,5	191,8			201,4200
45	75,8	76,8	70,2	68,8	68			71,9200
40	39,1	52,3	40,5	35,6	38,5	71,3		46,2167
35	36	46	43,8	34,2	34,4			38,8800
30	46,8	47,8	37	34,4	30,1	35,6	33,5	37,8857
25	46,7	61,2	45,9	28,9	35,5			43,6400
20	27,5	45,3	25,5	24,2	27,6	32		30,3500
10	22,5	20,7	19,7	18,8				20,4250
5	31,8	30,1	25,7	27,7	27,5	27,8		28,4333
1	7,5	9,5	9,1	8	8,5	11	9,3	8,9857
0,1	12,4	8,9	10	9,8	8,1	7	13,9	10,0143
0,01	5,3	6,2	5,8	12,2	5,3	6,5	7,1	6,9143

Tabla 7: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 3 del $\text{AC}_{16}\text{:}2\text{Cl}$ (Experimento 2).

C. μM kps	1	2	3	4	5	Media
50	581,1	594	661,2	651	629,2	623,3000
40	377,4	385	390,7	397,2	397	389,4600
37,5	340,4	387,2	343,5	381,1	342,9	359,0200
25	252	246,5	236,7	227,6		240,7000
10	72,7	64,9	68,6	66,2		68,1000
5	53,1	49,5	54,9	46,9	46,3	50,1400
1	20,4	29,8	24,5			24,9000
0,5	19,2	18,6	18,4			18,7333
0,1	7,5	8,1	8	7,2	10,6	8,2800
0,05	9,7	9,1				9,4000
0,01	19	13,6	18,1	18,4		17,2750
0,005	30,1	12	35,7	42,2		30,0000
0,001	15,9	17,1	26,6	24,9		21,1250
0,0001	21,3	19,2	16,2			18,9000

Tabla 8: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 3 del $\text{AC}_{16}\text{:}2\text{Cl}$ (Experimento 3).

A pH 12:

C. μM kps	1	2	3	4	5	6	7	Media
50	7562,2	7410,8	7504	7600	7978	7218,8		7545,6333
40	7591,1	6828,2	6813,4	6826,7				7014,8500
30	6335,3	5934,5	6329,4	5869,7	5900,4	5546		5985,8833
20	4817,6	4894	4304,6	4867,2	4947,8	5349,1	5478,8	4863,3833
10	2519,5	2293,2	2204,8	2595,8	2400,1			2402,6800
5	1552,1	1579,6	1505,1					1545,6000
1	294,8	261						277,9000
0,5	164,1							164,1000
0,01	13,2	12,8	13,2					13,0667
0,005	12,4	16	16					14,8000
0,001	11,2	13						12,1000
0,0005	10,5	10,2	8,3	8,2				9,3000

Tabla 9: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 12 del $\text{AC}_{16}\text{:}2\text{Cl}$ (Experimento 1).

C. μM kps	1	2	3	4	5	6	7		Media
50	35,2	37,8	37,1	54,6	38,6	27,6	78,4		44,1857
40	23,1	28,5	28,7	24,6	21,9	26,7	19,4		24,7000
30	16,1	11,5	22,4	13,8		22,2	14,6		16,7667
20	10,4	12,1	6,2	8	6,8	8,6	6,1		8,3143
15	5,3	5	6,9	6,7	5,9	3,5			5,5500
10	1,3	1,1	0,8	0,9	1,2	0,7	0,7		0,9571
5	2,9	3,4	2	8,8	3,3	1,7	5,9		4,0000
1	1	1	1,4	1,2	0,8	1,2	0,8		1,0571
0,5	0,9	0,9	1	1,2	1	0,8	1		0,9714
0,05	0,8	0,8	1,2	0,8	0,8	0,8	0,7		0,8429
0,005	0,7	0,6	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7		0,6571

Tabla 10: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 12 del $\text{AC}_{16}\text{:}2\text{Cl}$ (Experimento 2).

C. μM kps	1	2	3	4	5	6	7		Media
50	6098,4	6810,4	6376,2	6223,3	6406,2	6347,4	5683,3		6277,8857
45	5755,7	7201,8	6270	6372,9	5258,3	4780,5	6110,9		5964,3000
40	5041,6	5813	5081,3	6285,7	5824,3	5168	5219		5490,4143
30	5022,56	3496,2	6452	4352,7	4024,4	2974,2			4387,0100
20	3616,7	3143,6	2565,8	2959	3113,8	4320,5	3978,7		3385,4429
15	2079,5	1542,5	1703,5	1632	1675,5	1384,1	5857		2267,7286
10	662,5	1214,8	940	1548,7	2443,2	1209,3	689,3		1243,9714
1	910,9	920,7	982,5	824,9	831,2	558,4	681,3		815,7000
0,5	437,1	508,6	458,4	305,2	258,9	532,2	297,1		399,6429
0,05	365	612,2	744,2	384,5	354,6	289,2	600,9		478,6571
0,005	891,9	728,6	348,7	371	802,5	290,4	614,6		578,2429

Tabla 11: Datos experimentales de las medidas DLS a pH 12 del $\text{AC}_{16}\text{:}2\text{Cl}$ (Experimento 3).

5. CONCLUSIONES

1. Se lograron sintetizar dos nuevos anfifilos catiónicos derivados del vermellógeno (**Ac₆** y **Ac₁₆**), siguiendo la metodología descrita y con rendimientos aceptables.
2. Ambos se caracterizaron estructuralmente mediante el uso de las técnicas de RMN ¹H y ¹³C y espectrometría de masas, comprobándose que las estructuras coinciden con las propuestas.
3. Se caracterizaron sus propiedades ácido-base a través de distintas técnicas, comprobando que son similares al vermellógeno y que el pKa se encuentra dentro de un rango de aplicación fisiológica.
4. Se observó que el **Ac₆** no muestra evidencias de agregación, las cuales sí se ven en el caso del **Ac₁₆**.

Se estudió la agregación del **Ac₁₆** en medio ácido y básico, pudiendo comprobar que es dependiente del pH. En medio básico, estando desprotonado como **Ac₁₆⁺**, agrega a concentraciones de 8,29 μ M, mientras que protonado como **Ac₁₆²⁺** agrega a 29,97 μ M. Se puede afirmar, por lo tanto, que el **Ac₁₆** podría tener el potencial para las aplicaciones mencionadas previamente.

CONCLUSIÓNS

1. Lográronse sintetizar dous novos anfifilos catiónicos derivados do vermellóxico (\mathbf{Ac}_6 y \mathbf{Ac}_{16}), seguindo a metodoloxía descrita e con rendementos aceptables.
2. Ambos caracterizáronse estruturalmente mediante o uso das técnicas de RMN ^1H , ^{13}C e espectrometría de masas comprobándose que as estruturas coinciden coas propostas.
3. Caracterizáronse a súas propiedades ácido-base a través de distintas técnicas, comprobando que son similares ao vermellóxico e que o pKa encóntrase dentro dun rango de aplicación fisiolóxica.
4. Observouse que o \mathbf{Ac}_6 non mostra evidencias de agregación, as cales si se ven no caso do \mathbf{Ac}_{16} .

Estudouse a agregación do \mathbf{Ac}_{16} en medio ácido e básico, podendo comprobar que depende do pH. En medio básico, estando desprotonado como \mathbf{Ac}_{16}^+ , agrega a concentracións de $8,29 \mu\text{M}$, mentres que protonado como \mathbf{Ac}_{16}^{2+} , agrega a $29,97 \mu\text{M}$. Pódese afirmar polo tanto, que o \mathbf{Ac}_{16} podería ter potencial para as aplicacións mencionadas anteriormente.

CONCLUSIONS

1. It was possible to synthesize two new cationic amphiphiles derivatives of the read thread (**Ac6** and **Ac16**), following the described methodology and with adequate yields.
2. Both were structurally characterized through the use of RMN ^1H , ^{13}C and mass spectrometry techniques, proving that the structures match with those predicted.
3. The acid-base properties were characterized through diverse techniques, proving that they were similar to those of the read thread and that the pKa is in a physiological application zone.
4. It was observed that the **Ac6** doesn't show any evidence of aggregation, which are seen in the **Ac16**.

The aggregation of **Ac16**, in acidic and basic medium, was studied, proving that it was pH dependent. In basic medium, deprotonated as **Ac16⁺**, it forms aggregates at concentrations of 8,29 μM , meanwhile protonated, as **Ac16²⁺**, it aggregates at 29,97 μM . It's possible then to assert that the **Ac16** has the potential to be used in the foregoing applications.

ANEXOS

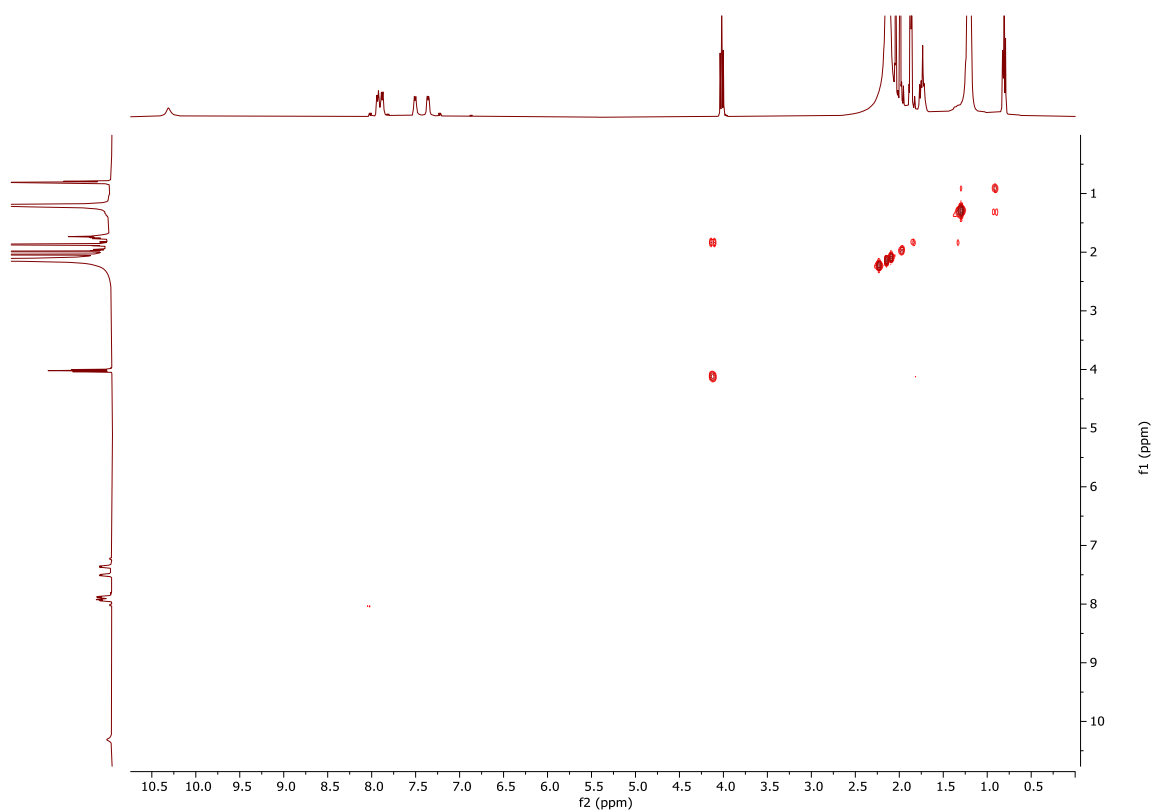


Figura A 1: Espectro COSY en CD_3CN del **P2**.

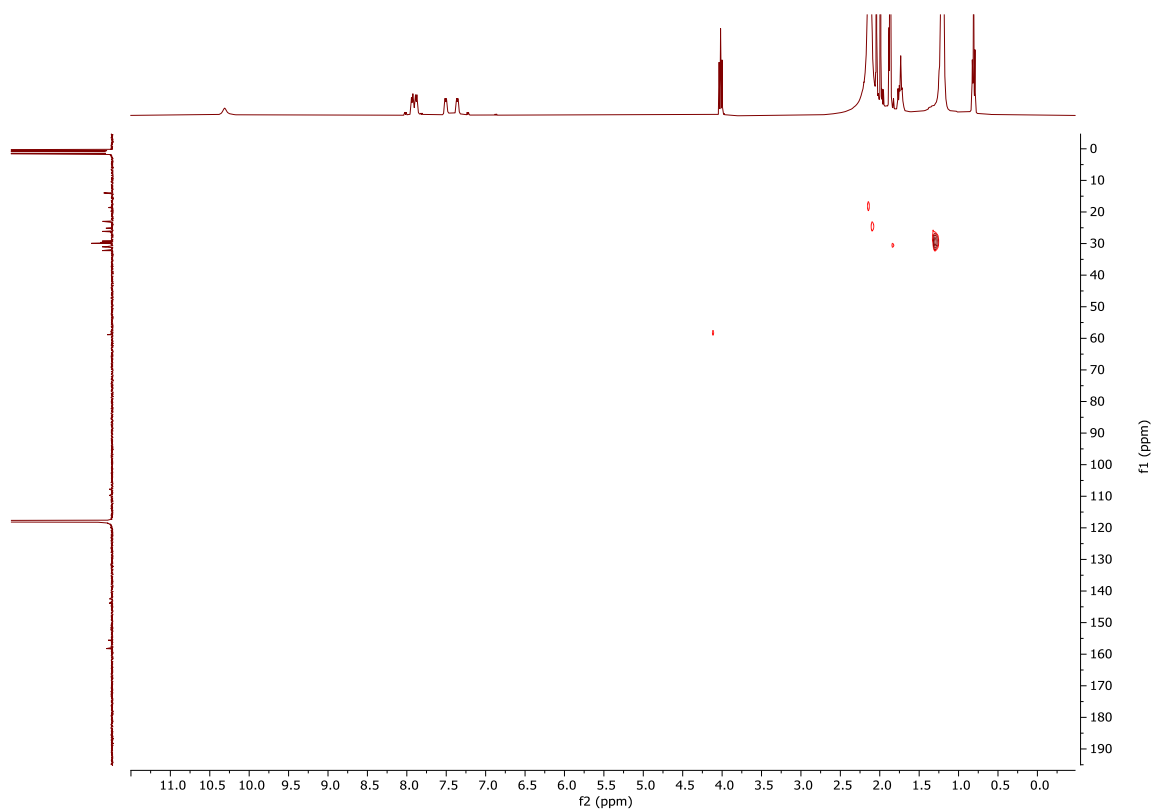


Figura A 2: Espectro HSQC del **P2** en CD_3CN .

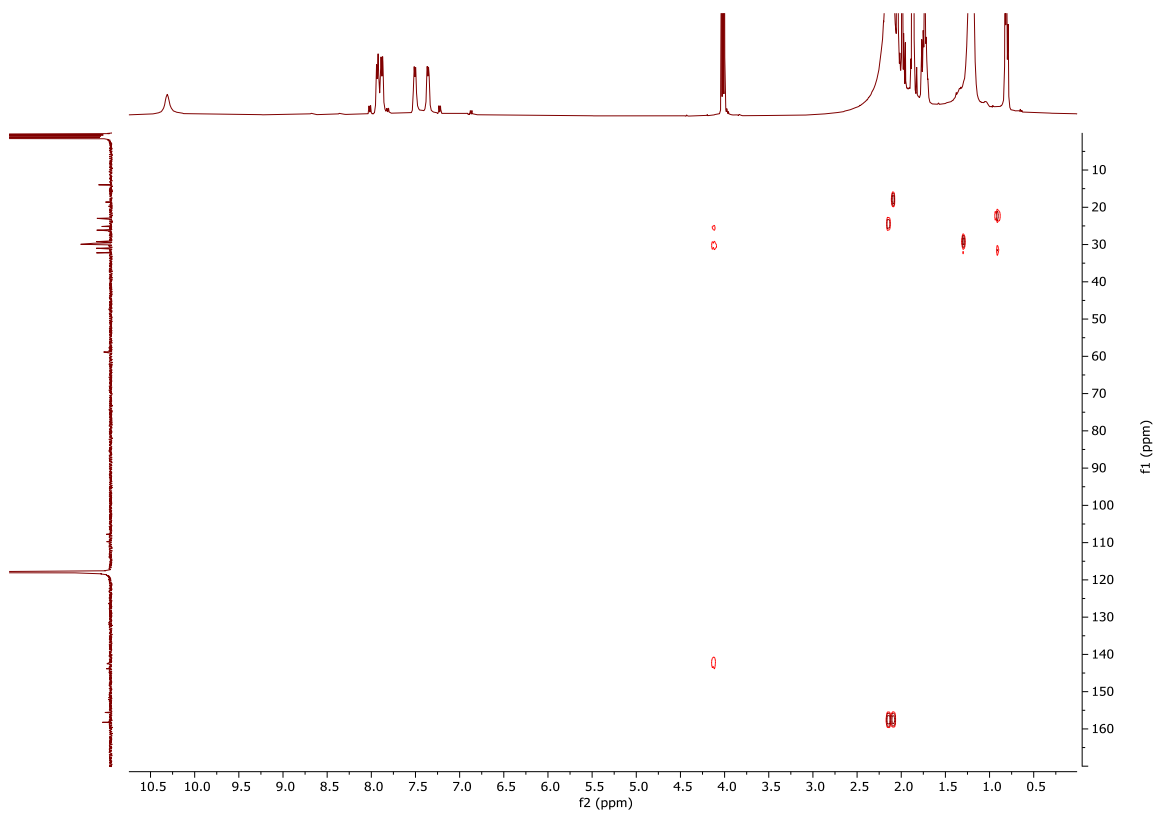


Figura A 3: Espectro HMBC del **P2** en CD_3CN .

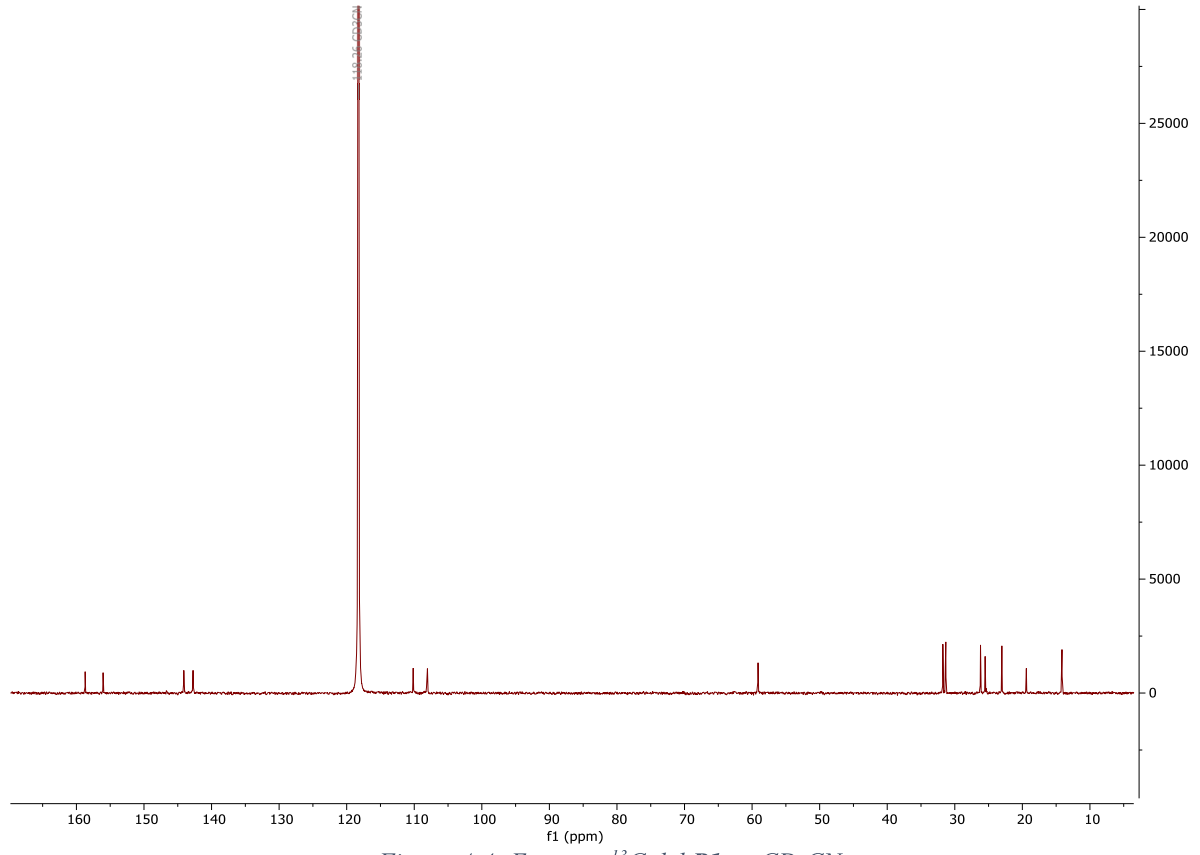


Figura A 4: Espectro ^{13}C del **P1** en CD_3CN .

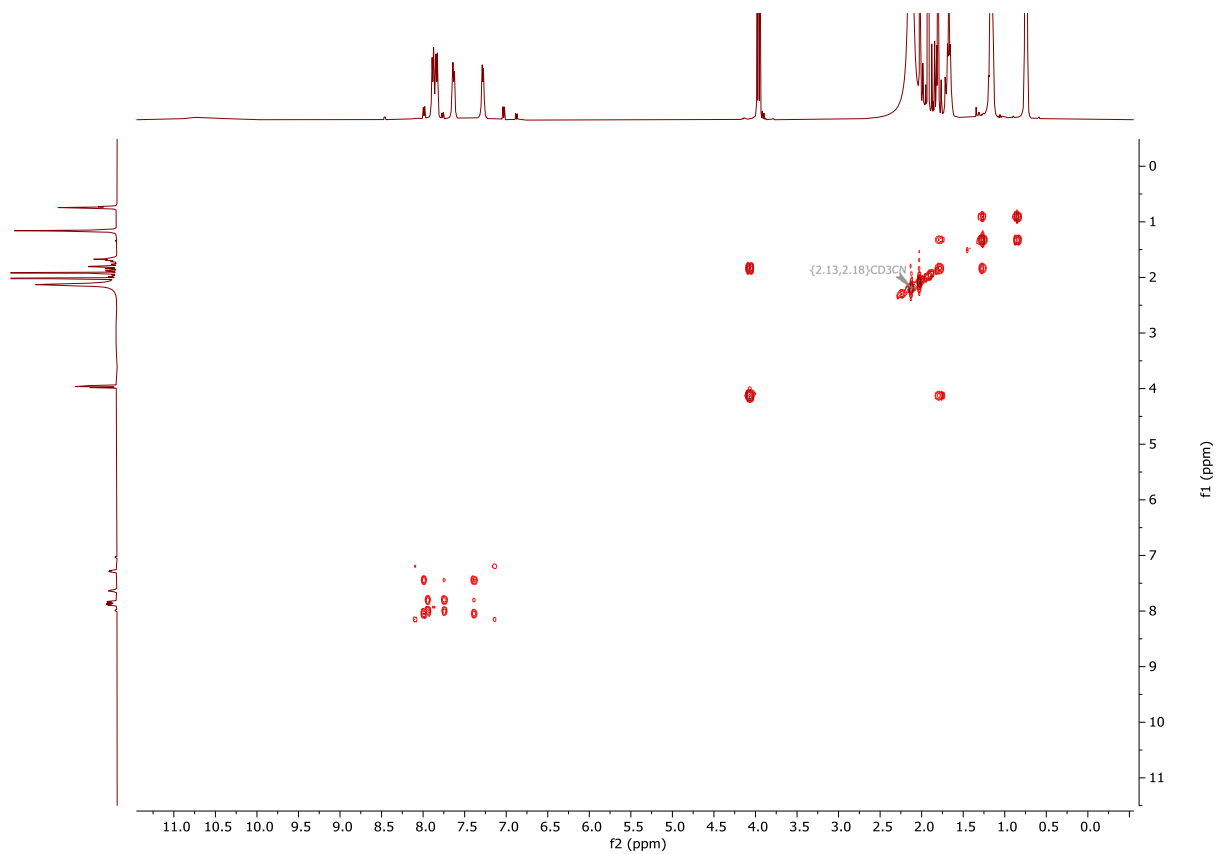


Figura A 5: Espectro COSY en CD_3CN del **P1**.

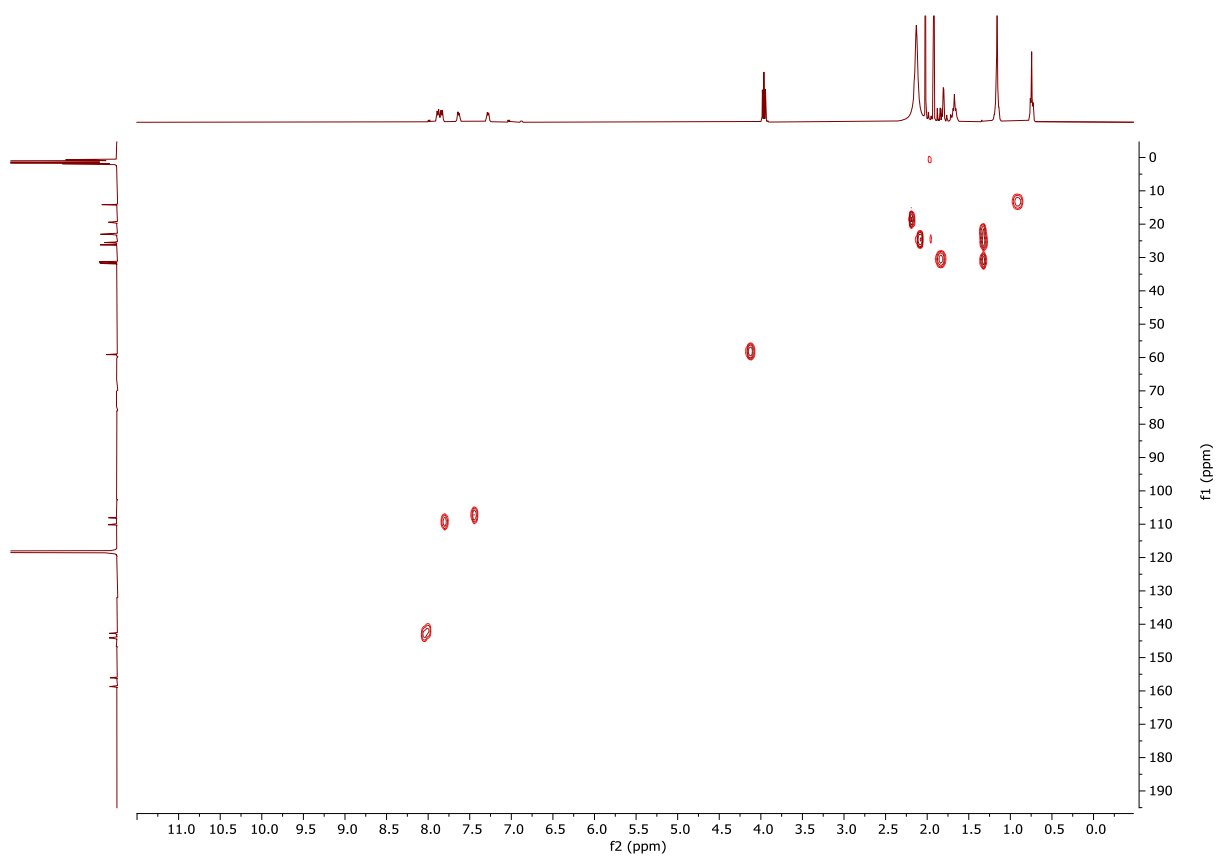


Figura A 6: Espectro HSQC del **P1** en CD_3CN .

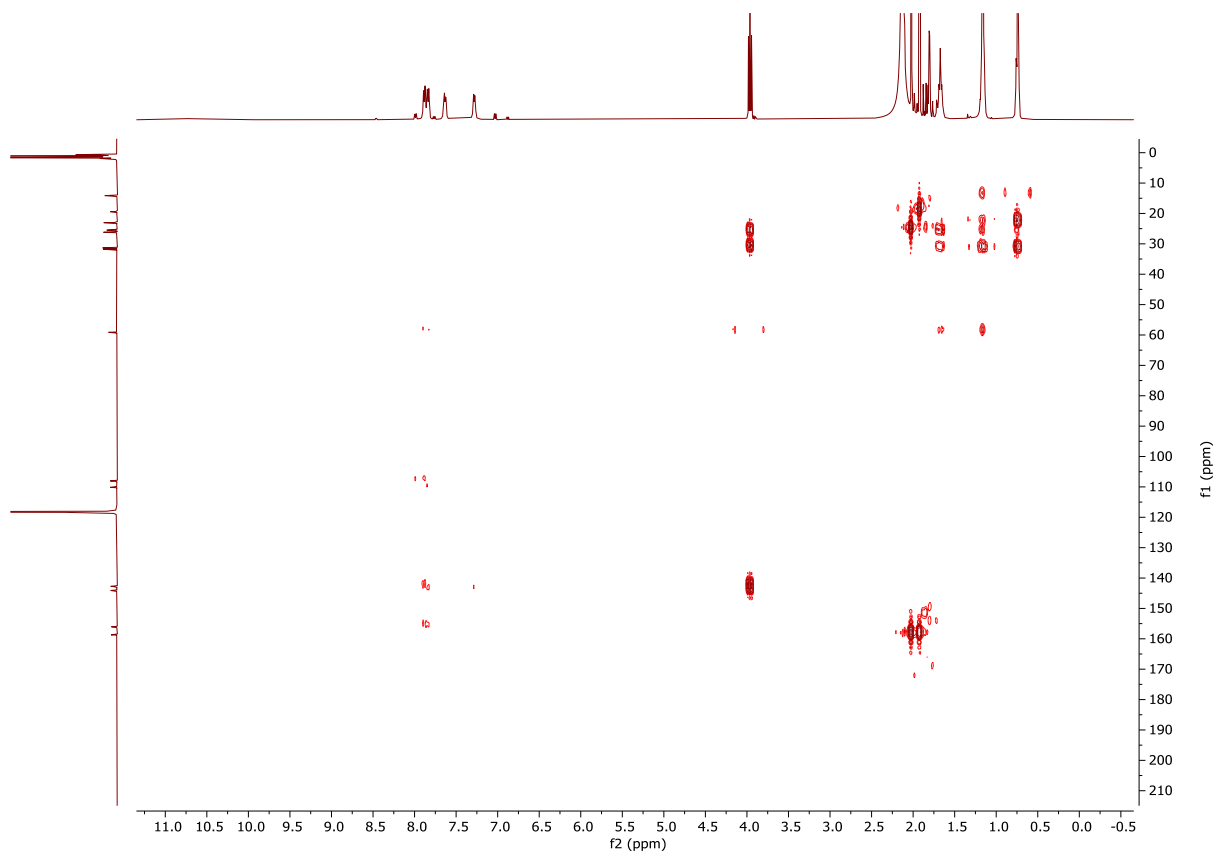


Figura A 7: Espectro HMBC del PI en CD₃CN.

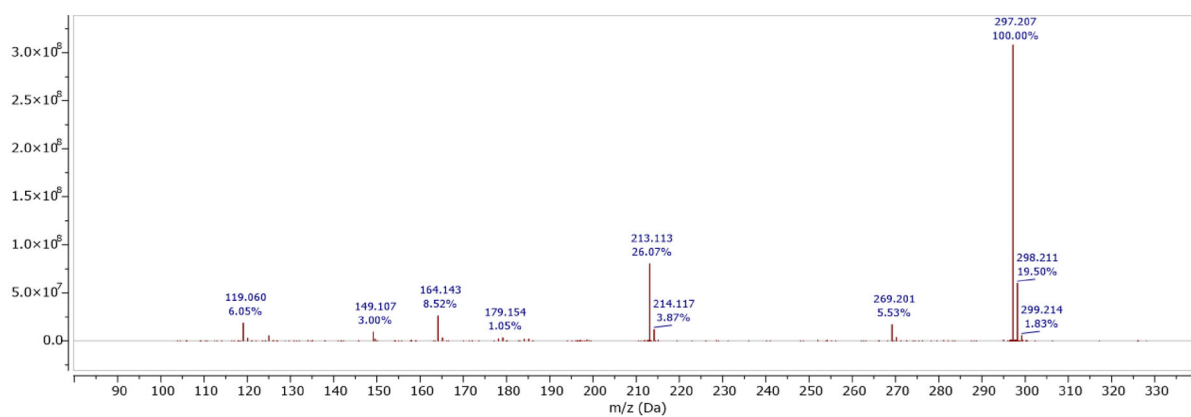


Figura A 8: Espectro HR-ESI-MS del compuesto Ac₆.

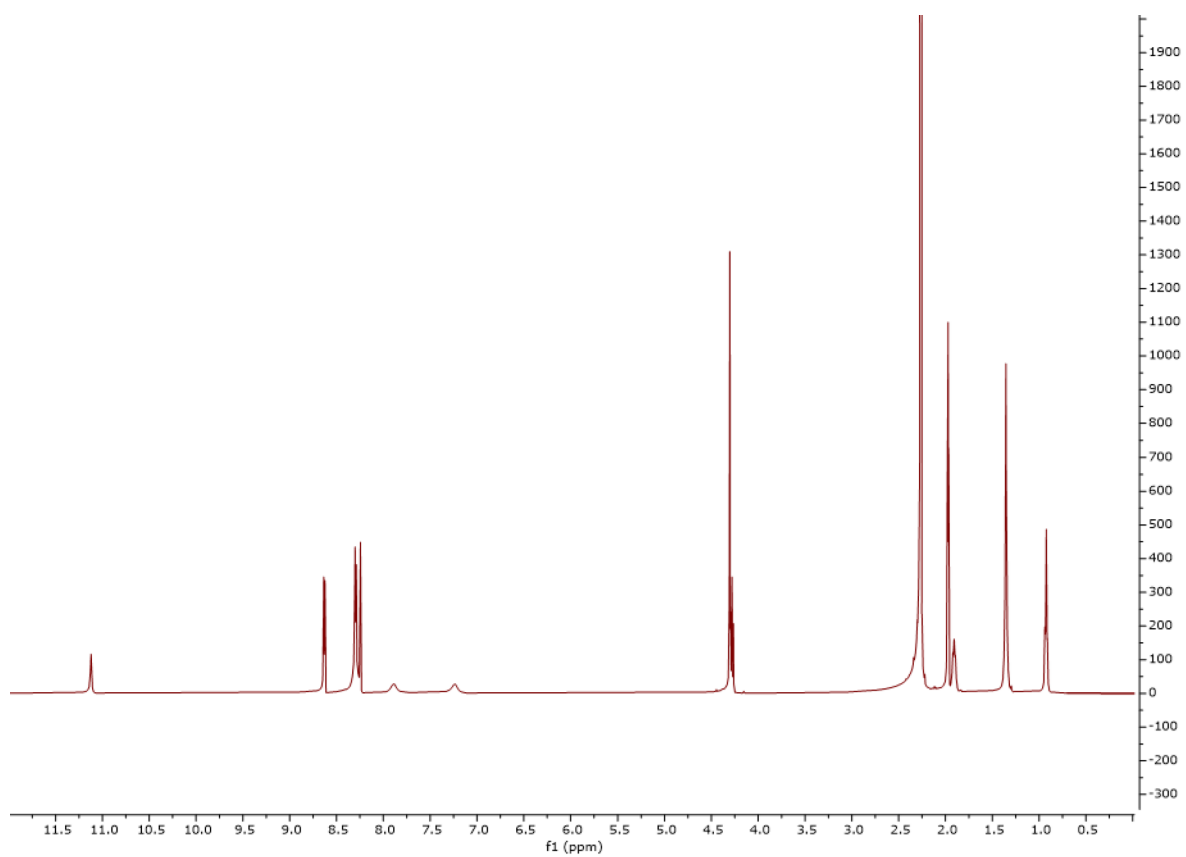


Figura A 9: Espectro ^1H RMN en CD_3CN de la forma protonada del Ac_6 .

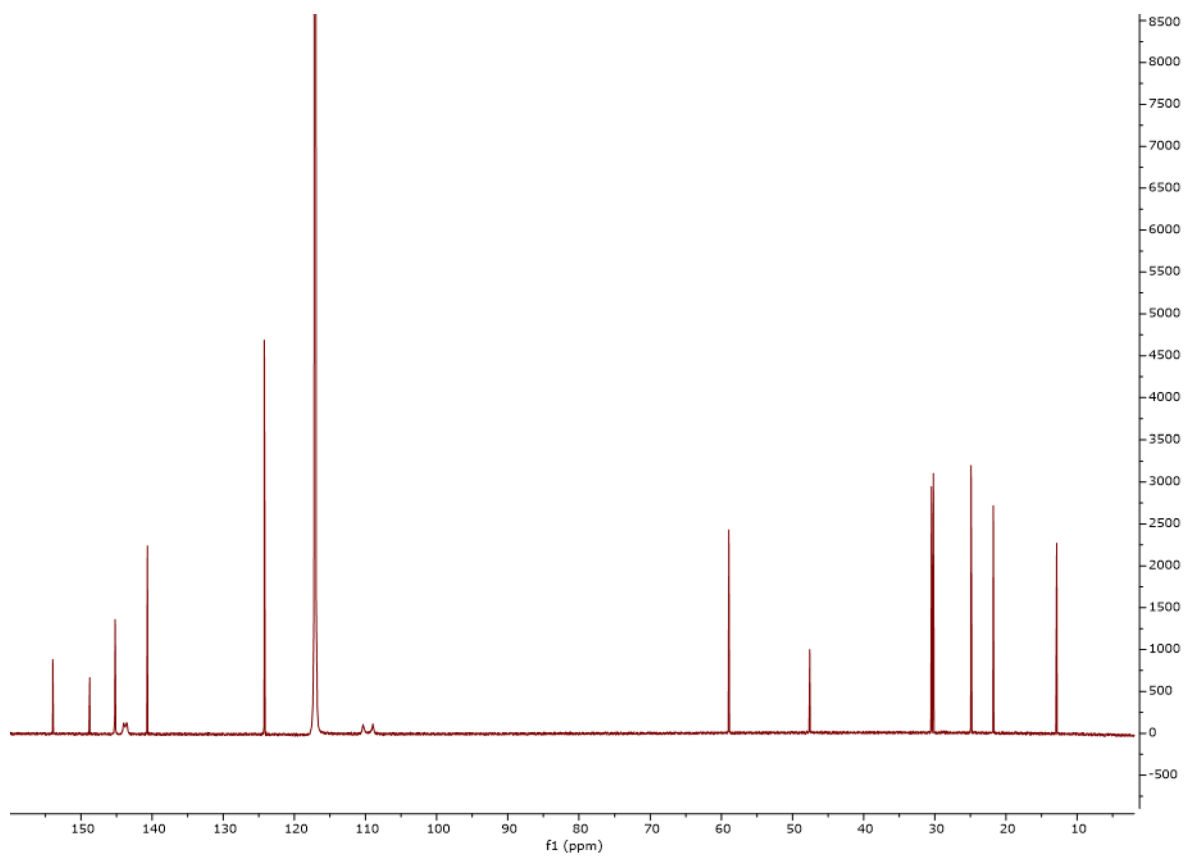


Figura A 10: Espectro ^{13}C en CD_3CN de la forma protonada del Ac_6 .

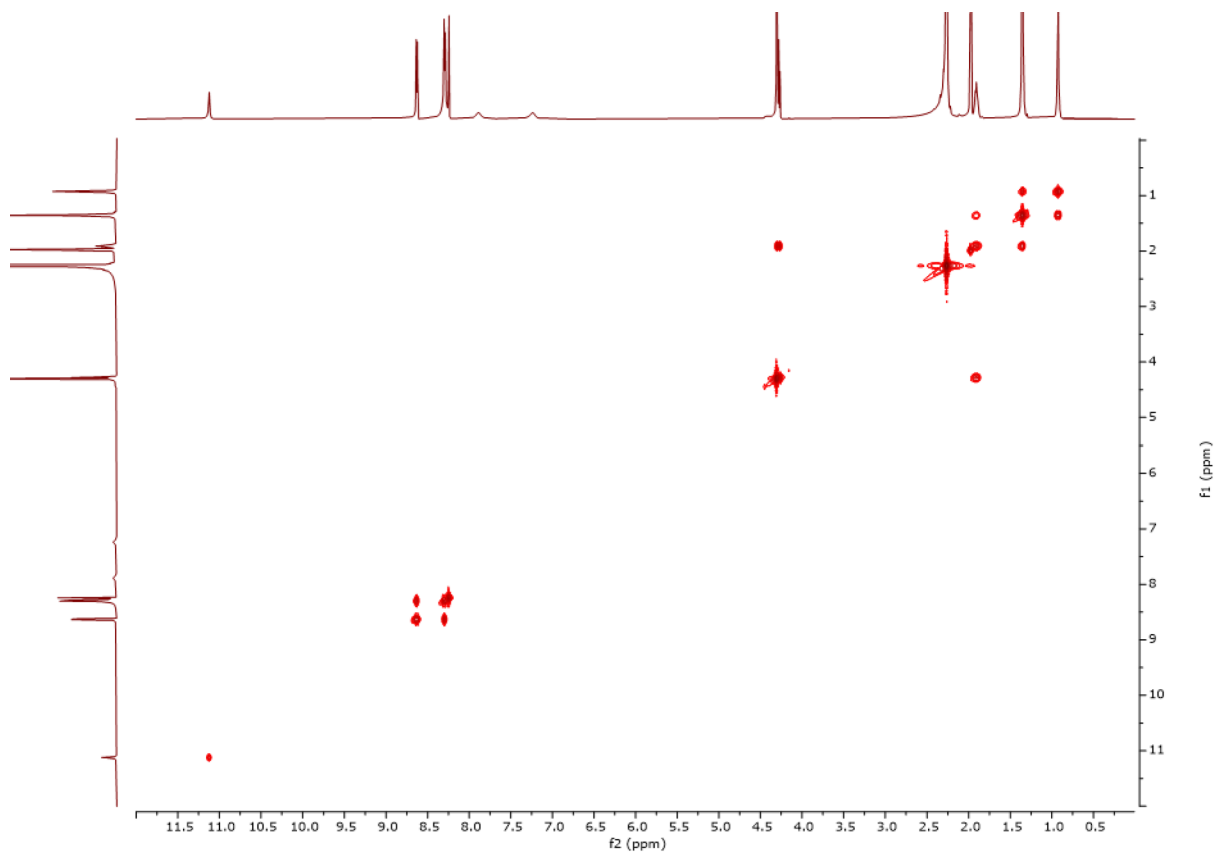


Figura A 11: Espectro COSY en CD_3CN de la forma protonada del Ac_6 .

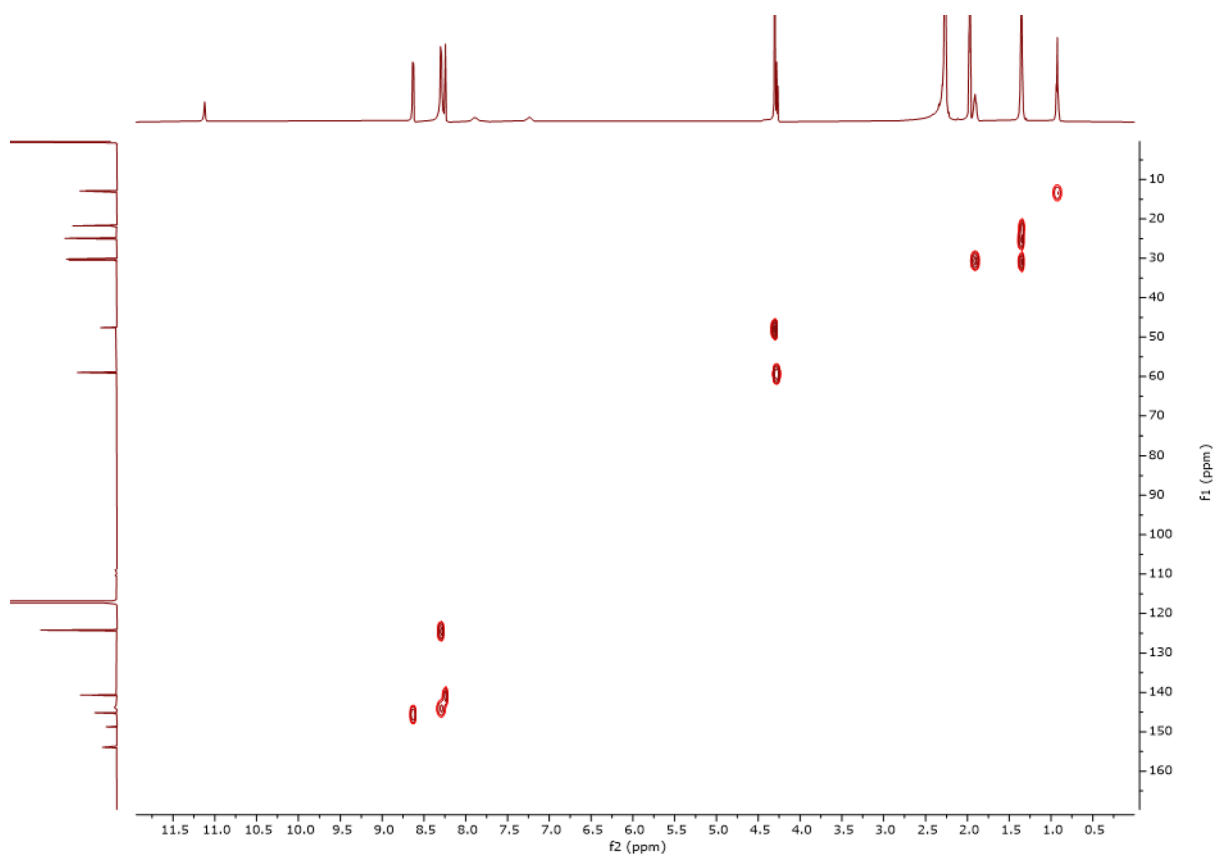


Figura A 12: Espectro HSQC en CD_3CN de la forma protonada del Ac_6 .

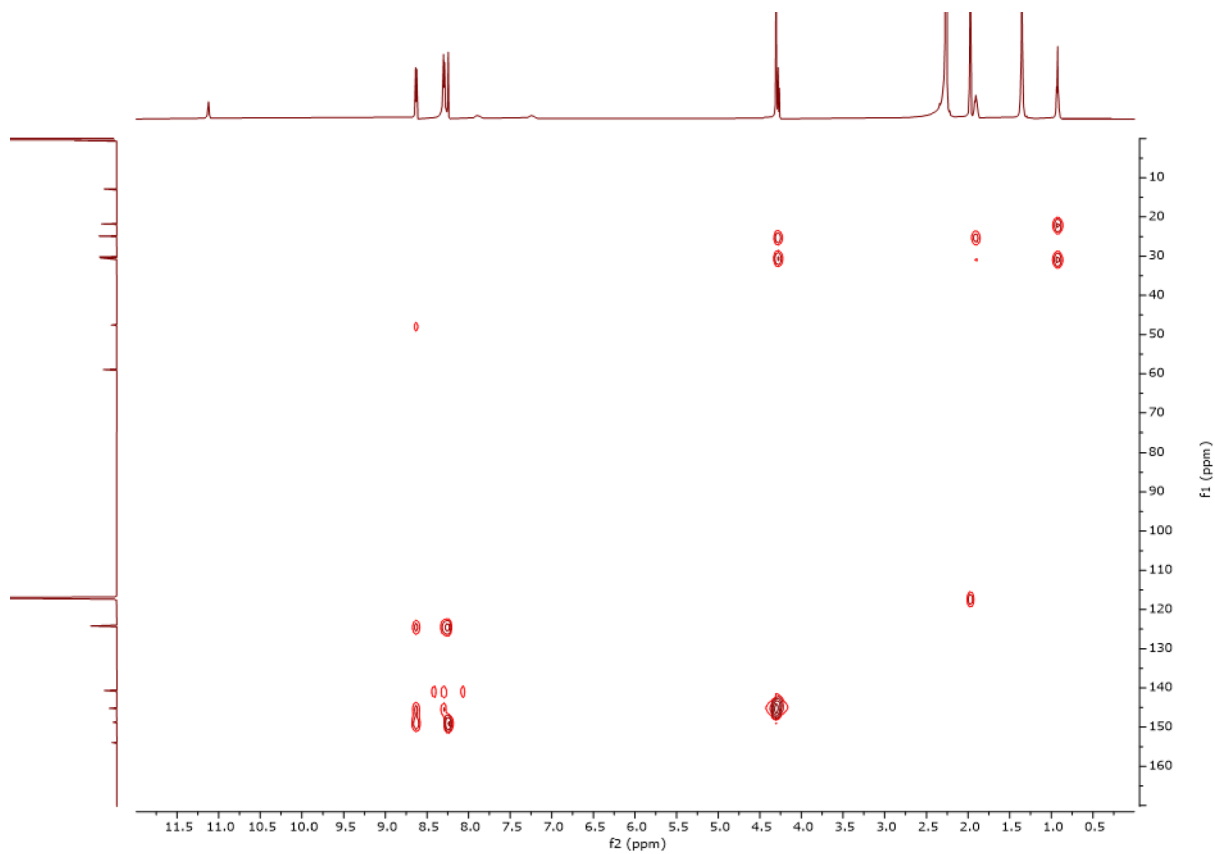


Figura A 13: Espectro HMBC en CD_3CN de la forma protonada del Ac_6 .

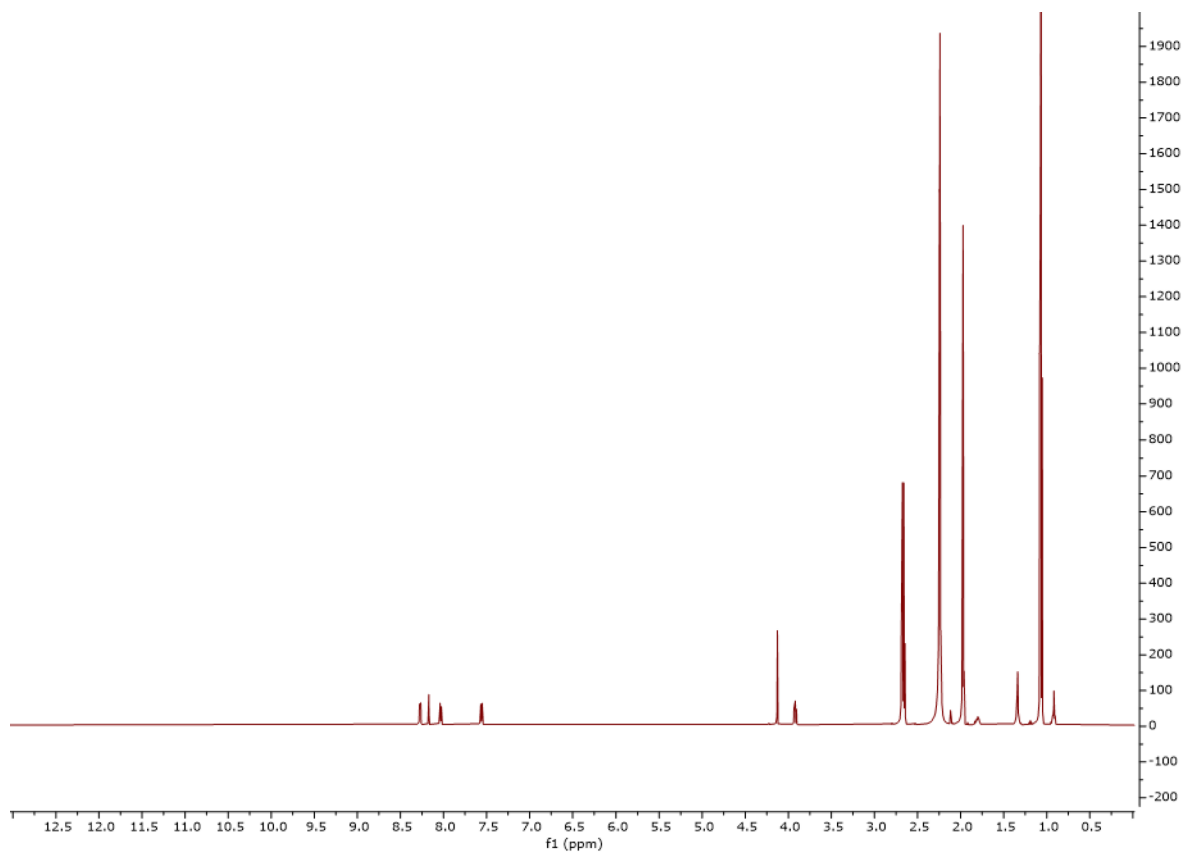


Figura A 14: Espectro 1H RMN en CD_3CN de la forma desprotonada del Ac_6 .

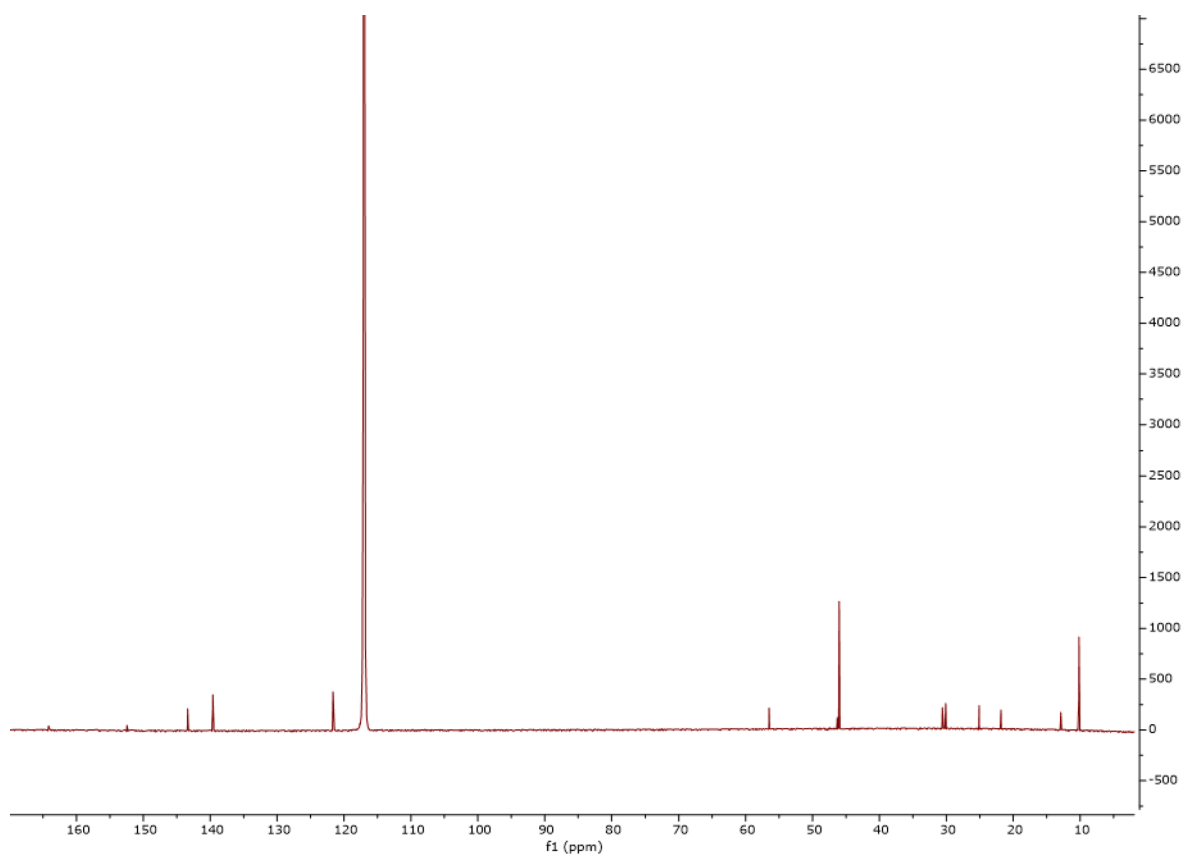


Figura A 15: Espectro ^1H RMN en CD_3CN de la forma desprotonada del Ac_6 .

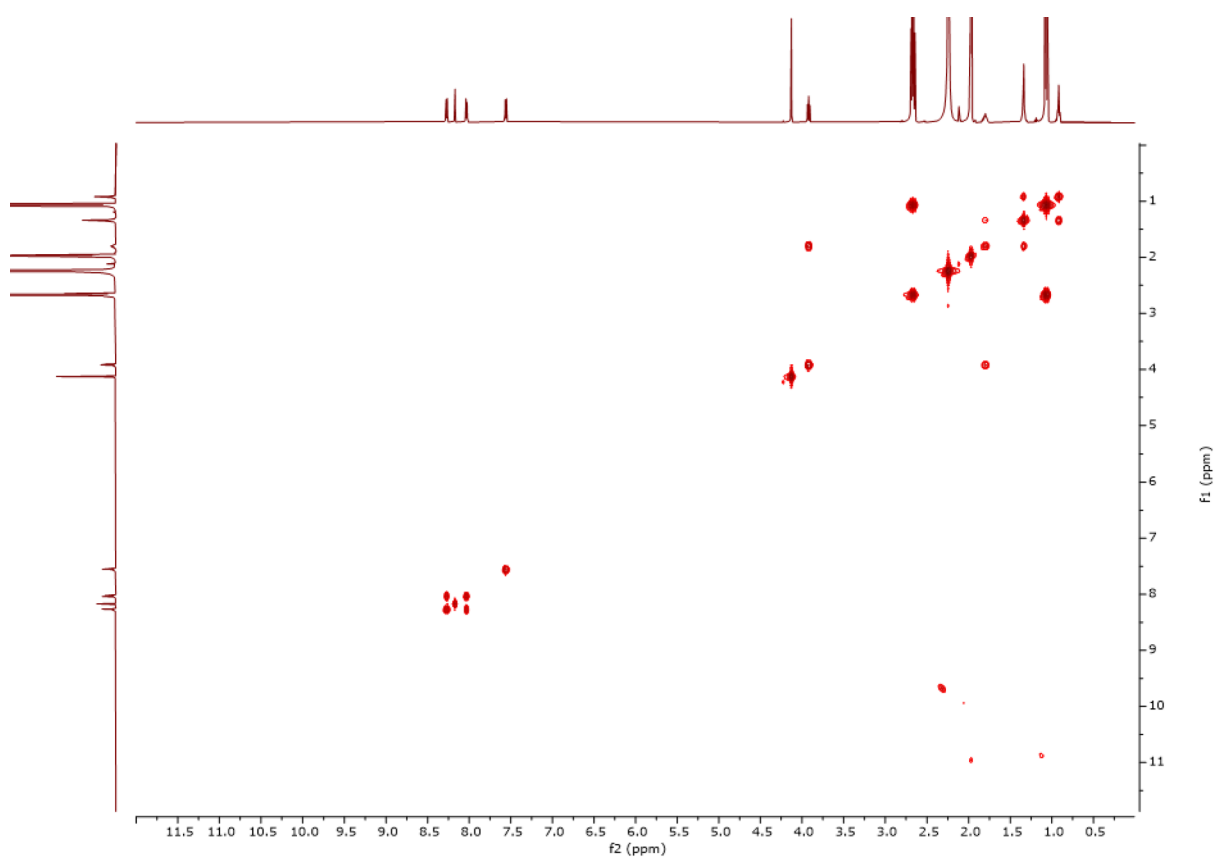


Figura A 16: Espectro COSY en CD_3CN de la forma desprotonada del Ac_6 .

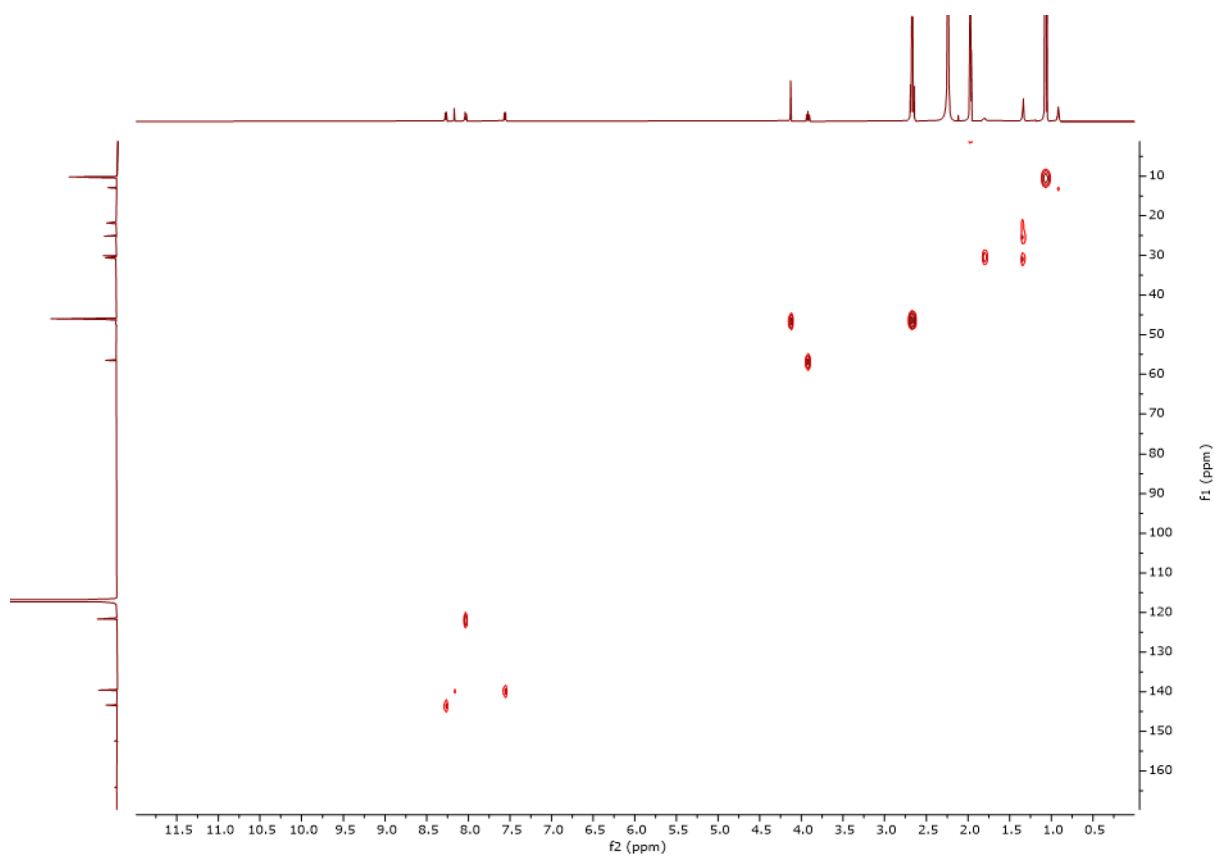


Figura A 17: Espectro HSQC en CD_3CN de la forma desprotonada del Ac6.

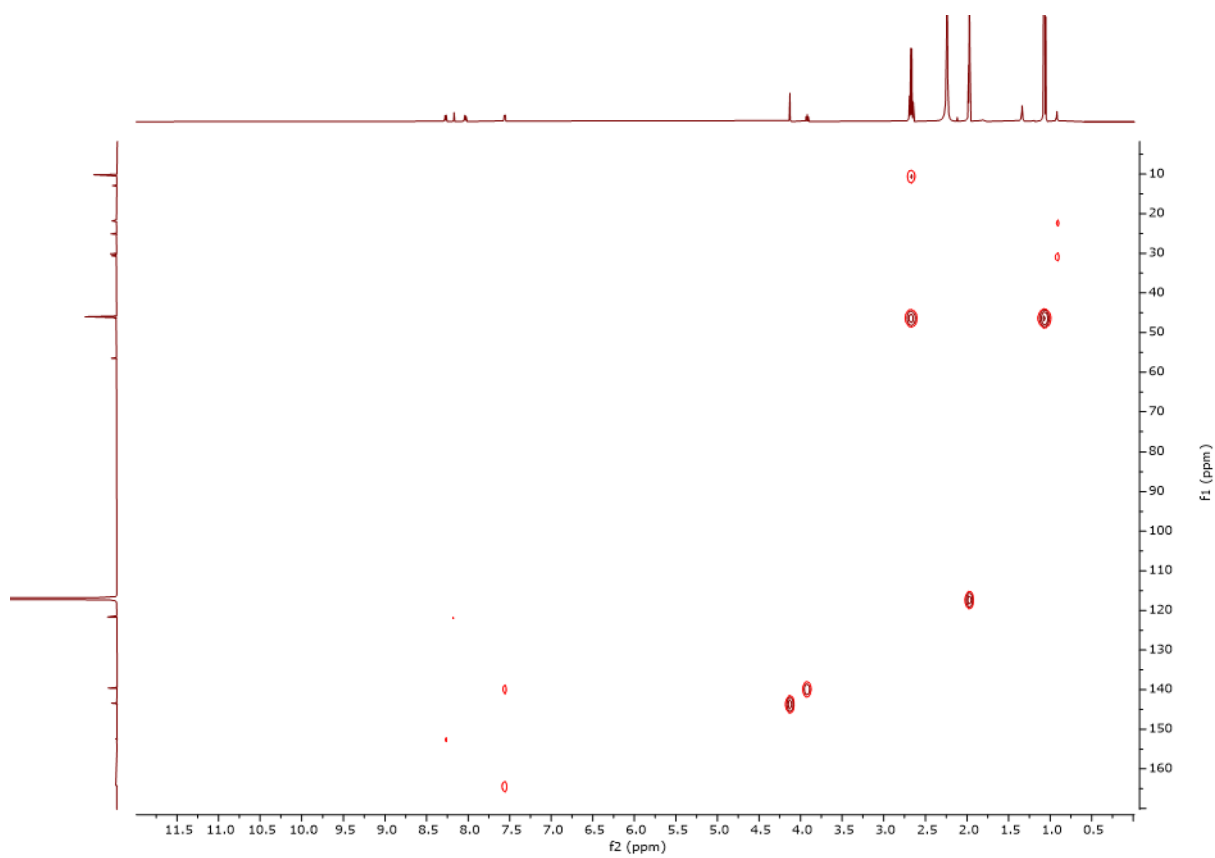


Figura A 18: Espectro HMBC en CD_3CN de la forma desprotonada del Ac6.

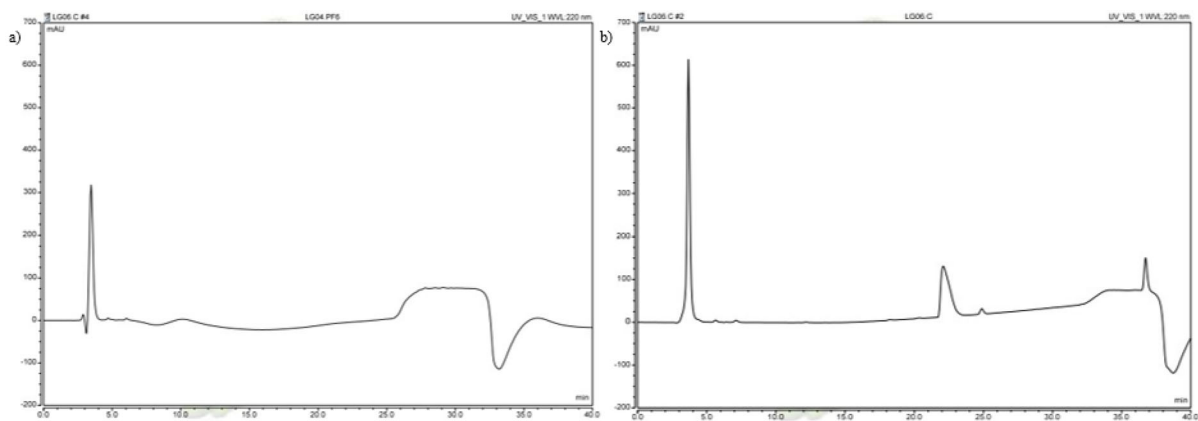


Figura A 19: a) Cromatograma de la purificación por HPLC analítico (λ :220 nm) del $A_{C6}2PF_6$. b) Cromatograma de la purificación por HPLC analítico (λ :220 nm) del A_{C16} (crudo de la reacción de formación)

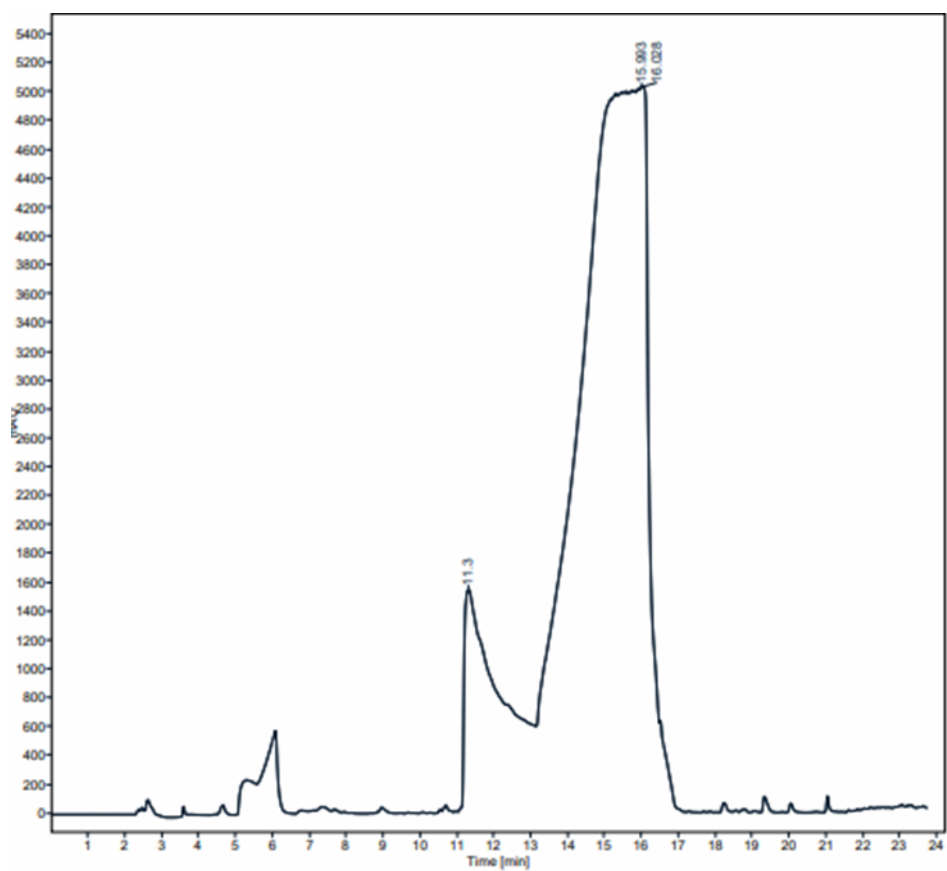


Figura A 20: Cromatograma obtenido por HPLC preparativo para la purificación de A_{C6} .

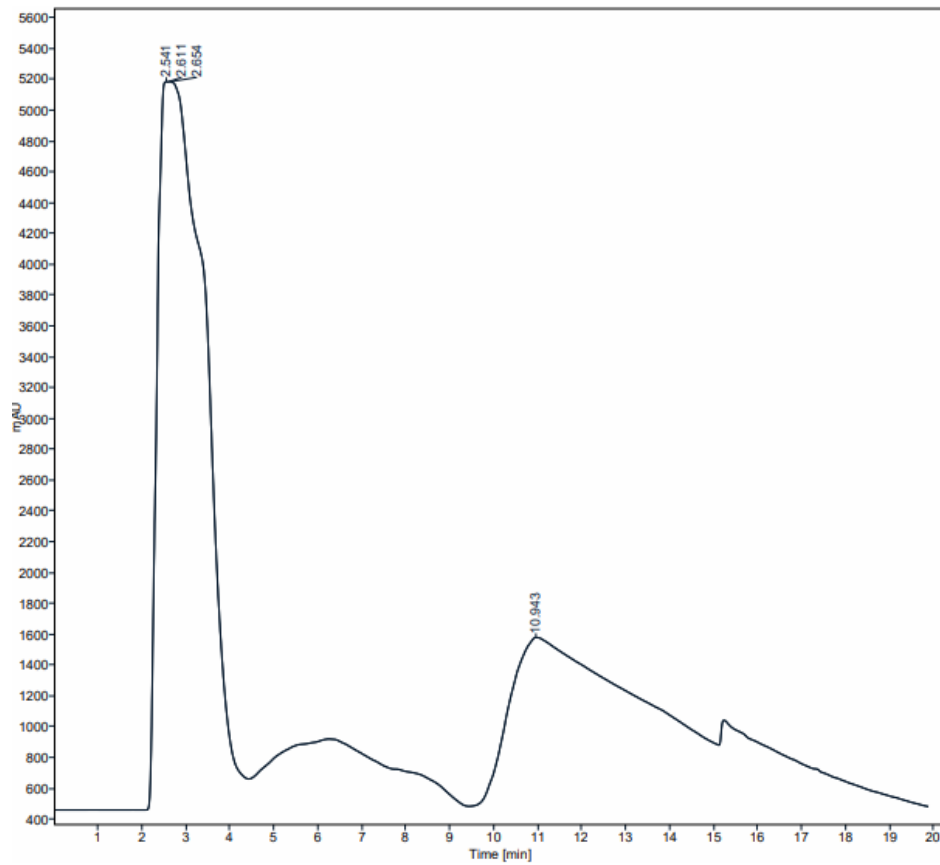


Figura A 21: Cromatograma obtenido por HPLC preparativo para la purificación de A_{C16} .

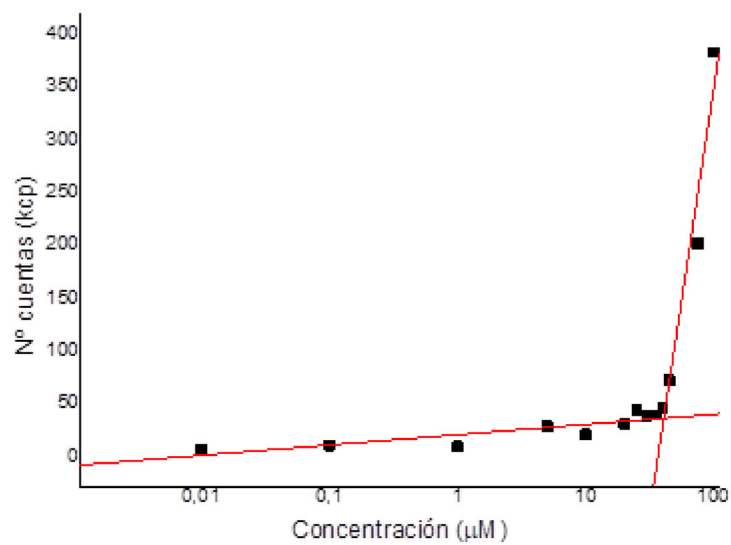


Figura A 22: Réplica 1 del DLS a pH 3.

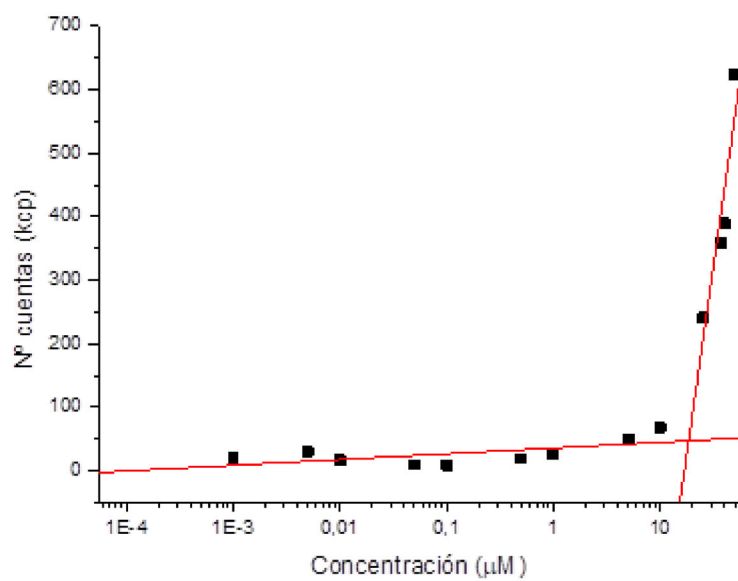


Figura A 23: Réplica 2 del DLS a pH 3.

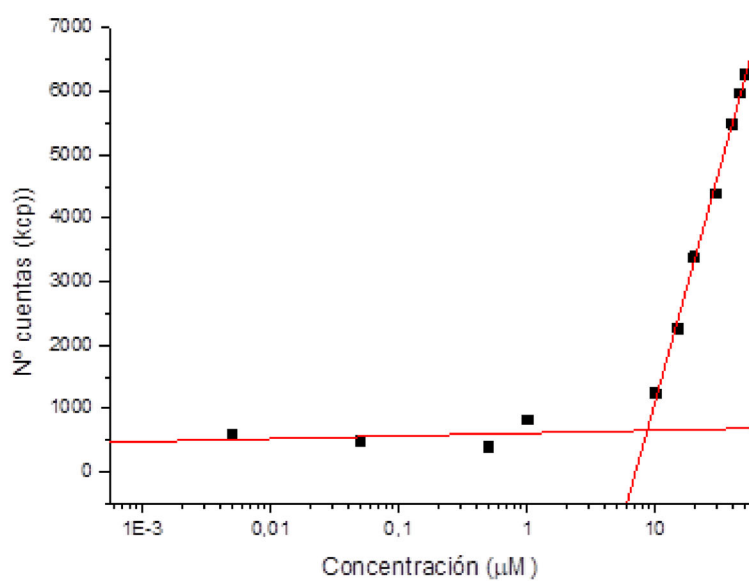


Figura A 24: Réplica 2 del DLS a pH 12.

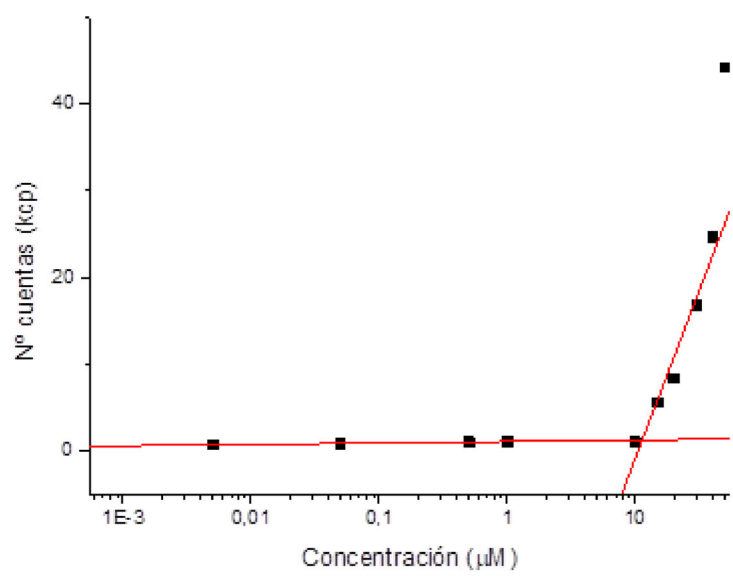


Figura A 25: Réplica 3 del DLS a pH 12.