



**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**

**2017**

**ÁCIDOS ESCUARÁMICOS: SÍNTESIS,  
CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES**

**Carlos López Roig**





**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2017**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología**  
**Química**

**ÁCIDOS ESCUARÁMICOS: SÍNTESIS,**  
**CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES**

**Carlos López Roig**

**Director: Dr. Antonio Costa Torres**

**Doctor por la Universitat de les Illes Balears**







**Universitat**  
de les Illes Balears

Dr. Antonio Costa Torres, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Ácidos escuarámicos: síntesis, caracterización y aplicaciones*, presentada por Carlos López Roig para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

Dr. Antonio Costa Torres

Palma de Mallorca, día 22 de Mayo de 2017



**Los resultados que se derivan de esta tesis han dado lugar a la publicación de los siguientes artículos científicos:**

1. C. López, M. Vega, E. Sanna, C. Rotger, A. Costa. *Efficient microwave-assisted preparation of squaric acid monoamides in water.*  
*RSC Advances*, **2013**, 3, 7249-7253
2. C. López, E. Sanna, L. Carreras, M. Vega, C. Rotger, A. Costa. *Molecular Recognition of Zwitterions: Enhanced Binding and Selective Recognition of Miltefosine by a Squaramide-Based Host.*  
*Chemistry - An Asian Journal*, **2013**, 8, 84-87
3. C. López, M. Ximenis, F. Orvay, C. Rotger, A. Costa. *Supramolecular Hydrogels Based on Minimalist Amphiphilic Squaramide-Squaramates for Controlled Release of Zwitterionic Biomolecules.*  
*Chemistry - A European Journal*, **2017**, DOI: 10.1002/chem.201701029

**Otras publicaciones derivadas de colaboraciones durante la tesis:**

1. E. Sanna, C. López, P. Ballester, C. Rotger, A. Costa. *Unexpected Squaramide-Induced Cleavage of Benzyls: Synthesis and Characterization of Mono-Aryl Squarimides.*  
*Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 35, 7656-7660.
2. E. Sanna, E. C. Escudero-Adán, C. López, P. Ballester, C. Rotger, A. Costa. *Macrocyclic Tetraimines: Synthesis and Reversible Uptake of Diethyl Phthalate by a Porous Macrocycle.*  
*J. Org. Chem.* **2016**, 81, 5173–5180



## ***Agradecimientos***

Al mirar atrás en el calendario me asusto al ver lo rápido que ha pasado el tiempo. A lo largo de estos años parecía que la tesis no iba a acabar nunca y, sin embargo, tras lo que ahora se me antojan tan sólo unos meses, ya está escrita. En primer lugar quisiera agradecer a mi director de tesis la proposición de empezar este proyecto antes incluso de que yo me lo planteara seriamente. Gracias por la ayuda prestada durante todos estos años, y por todo lo que he aprendido. También quisiera agradecer a Carmen el apoyo que me ha brindado siempre que la he necesitado.

Asimismo, quiero dar las gracias a mis compañeros del grupo de Química Supramolecular. A los que ya se han ido, Ángel, Lluís, Ruth, Alberto y Elena. A los que aún siguen, Manel, Susana y Paulino. Y a los teóricos, Toni F., David y Toni B. Quiero agradecer especialmente a Marta y a Xisca todas las risas (que son muchas), las sobremesas arreglando el mundo, las frustraciones compartidas y el apoyo científico, técnico, artístico y moral. Trabajar entre amigos ha hecho que las cosas parezcan más fáciles, y las semanas, más cortas.

También me gustaría agradecer al Servei Científicotècnic de la UIB, especialmente a Juan, Rosa, Biel, Ferràn y Jose, por estar siempre dispuestos a ayudarme, independientemente de la complejidad del trabajo sugerido.

Quiero dar las gracias también a la Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats del Govern Balear y al Fondo Social Europeo por la beca que me concedieron, que ha hecho posible el desarrollo de esta tesis.

Tampoco hubiese sido posible de ninguna manera sin el apoyo incondicional de mis padres y mi hermano, que siempre se han preocupado por mi trabajo. Sin su apoyo, las moléculas ni "s'aferrarien" ni "gelificarien", de eso estoy convencido.

Quiero hacer especial mención a Maria del Mar y Pere, por interesarse por mis batallitas de laboratorio y ayudarme a desconectar. El simple hecho de que siguierais ahí, a mi lado, dándome ánimos en lugar de apartaros de mí como si tuviera algún virus o fuera peligroso, no tiene precio.

Y por último, quiero dar las gracias a Carla, básicamente por todo. A lo largo de toda esta empresa hemos compartido tanto los logros como los reveses. Tú más que nadie has escuchado día a día los pormenores de cada uno de mis experimentos, convirtiéndote en una experta en la materia. Gracias por tu paciencia y por tu apoyo constante.

*La commedia è finita*



**Unión Europea**

Fondo Europeo  
de Desarrollo Regional  
"Una manera de hacer Europa"

Invertim en el seu futur



**Unió Europea**  
**Fons Social Europeu**

*When you make the finding yourself – even if  
you're the last person on Earth to see the light –  
you'll never forget it.*

Carl Sagan





## Abreviaturas

A	Absorbancia
Å	Ångstrom
AcCol	Acetil Colina
ACN/MeCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Atomic Force Microscopy
Ala	Alanina
AlOOH	Oxo-hidróxido de Aluminio
BE	Binding Energy
°C	Grados centígrados
CAC	Concentración de Agregación Crítica
CAM	Contact Angle Measurement
CCD	Charge-Coupled Device
CGC	Concentración de Gelificación Crítica
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
δ	Desplazamiento químico
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMA	Dynamic Mechanical Analyzer
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DSC	Differential Scanning Calorimetry
ESI(-)-HRMS	Electrospray high-resolution mass spectrometry (negative mode)
Et <sub>2</sub> O	Dietiléter
EtOH	Etanol
EtSqC <sub>16</sub>	Hexadecilescuaramato de etilo
eV	Electronvoltios
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GA-FTIR	Grazing-angle reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy
HSqC <sub>4</sub>	Ácido butilescuarámico
HSqC <sub>8</sub>	Ácido octilescuarámico
HSqC <sub>12</sub>	Ácido dodecilescuarámico
HSqC <sub>16</sub>	Ácido hexadecilescuarámico
Ile-Phe	Isoleucina-fenilalanina
IMDH	β-isopropilmalato deshidrogenasa
J	Constante de acoplamiento

LCSQA	Long-chain squaramic acid
LMWH	Low Molecular Weight Hydrogelator
LVR	Lineal Viscoelastic Region
m/z	Ratio masa-carga
M	Molaridad
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight
mg	Miligramo
MHz	Megahertzios
MI	Miltefosina
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
ms	Milisegundos
NMDA	N-metil-D-aspartato
PA	Palmitic Acid
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno, teflón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
SAM	Self-assembled monolayer
SAW	Surface acoustic wave
SAXS	Small-angle X-ray scattering
seg	Segundos
SEM	Scanning Electron Microscopy
SLS	Static Light Scattering
SQA	Squaramic Acids
SQM	Squaramate
TEACl	Cloruro de tetraetilamonio
TEAES	2-(triethylammonio)ethane sulfonate
TEM	Transmission Electron Microscopy
UV-vis	Espectroscopia de Ultravioleta-visible
W	Watts
WHO	World Health Organization
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
XRD	X-ray powder diffraction

## Resumen

En esta Memoria se describen los ácidos escuarámicos y su aplicación en distintos campos relacionados con la Química Supramolecular. Estos compuestos son un tipo de derivados del ácido escuárico poco conocidos. Específicamente, el trabajo aquí descrito se divide en cinco capítulos.

Capítulo 1. La introducción general ofrece una visión general de la Química Supramolecular y de los principales campos de aplicación actuales. De forma más específica, se describen los derivados del ácido escuárico y su utilización como centros activos para llevar a cabo fenómenos de reconocimiento y agregación supramolecular, tema principal sobre el que versa esta Memoria.

Capítulo 2. En este capítulo se ha desarrollado un método efectivo de síntesis asistido por microondas de ácidos escuarámicos derivados de aminas tanto alifáticas como aromáticas, con rendimientos comprendidos entre el 41 y 92%. Se han caracterizado las propiedades ácidas de los compuestos más representativos mediante valoraciones espectrofotométricas, obteniéndose valores de  $pK_a$  entre 0.9 y 2.0.

Capítulo 3. En una primera fase se han sintetizado ácidos escuarámicos de cadena larga y se ha estudiado su capacidad para quimisorberse sobre superficies de aluminio. Este capítulo ofrece información básica para una posterior implementación de ácidos escuarámicos en materiales recubiertos. Los recubrimientos obtenidos se han estudiado mediante un amplio abanico de técnicas, como medidas de ángulo de contacto, técnicas de microscopía, espectroscopia de IR de ángulo rasante y espectrometría de masas. Las medidas de ángulo de contacto han demostrado la formación de una capa que aporta a la superficie una hidrofobicidad comparable a la obtenida con ácidos carboxílicos de longitudes de cadena similar. La aromaticidad del grupo escuaramato ha permitido la detección y seguimiento de la formación de la capa molecular mediante espectroscopia de reflectancia en UV-vis, una técnica poco utilizada en este campo. Además, los recubrimientos obtenidos han demostrado tener una mayor resistencia a la desorción por inmersión en isopropanol que los recubrimientos llevados a cabo con ácidos carboxílicos.

Capítulo 4. En este capítulo se ha diseñado un receptor de base escuaramido-escuaramato para la detección de moléculas zwitteriónicas como la miltefosina. La estructura del mismo da lugar a una disposición de los grupos escuaramida y escuaramato que permite su autoagregación, impidiendo en gran medida la unión con aniones competitivos como los haluros.

Capítulo 5. La capacidad de autoagregación de las escuaramidas se ha utilizado para el diseño de hidrogelantes de base escuaramido-escuaramato. La elevada acidez del ácido

escuarámico hace que se encuentre desprotonado en un amplio rango de pH, lo que permite su utilización como parte hidrofílica de un hidrogelante de bajo peso molecular. La introducción de los grupos  $-\text{NO}_2$  y  $-\text{CF}_3$  en la arilescuaramida permite modular las propiedades de los hidrogeles resultantes, dando lugar a marcadas diferencias en la estabilidad térmica, en las propiedades mecánicas y en la morfología de las fibras que los componen. Así, el hidrogel nitroderivado resulta inyectable, tixotrópico, y experimenta un proceso de encogimiento irreversible en presencia de disoluciones salinas. Además puede cargarse con cantidades sustanciales de biomoléculas zwitteriónicas en su interior (hasta una relación molar de 240:1), que pueden liberarse posteriormente al medio de forma controlada.

## Resum

En aquesta Memòria es descriuen els àcids escuaràmics i la seva aplicació en diferents camps relacionats amb la Química Supramolecular. Aquests composts són un tipus de derivats de l'àcid escuàric poc conegut. Específicament, el treball aquí descrit es divideix en cinc capítols.

Capítol 1. La introducció general ofereix una visió general de la Química Supramolecular i dels seus principals camps d'aplicació actuals. De forma més específica, es descriuen els derivats de l'àcid escuàric i la seva utilització com a centres actius per dur a terme fenòmens de reconeixement i agregació supramolecular, tema principal sobre el qual versa aquesta Memòria.

Capítol 2. En aquest capítol s'ha desenvolupat un mètode efectiu de síntesi assistida per microones d'àcids escuaràmics derivats d'amines tant alifàtiques com aromàtiques, amb rendiments compresos entre el 41 i el 92%. S'han caracteritzat les propietats àcides dels composts més representatius mitjançant valoracions espectrofotomètriques, obtenint valors de  $pK_a$  entre 0.9 i 2.0.

Capítol 3. En una primera fase s'han sintetitzat àcids escuaràmics de cadena llarga i s'ha estudiat la seva capacitat per quimisorbir-se sobre superfícies d'alumini. Aquest capítol ofereix informació bàsica per a una posterior implementació d'àcids escuaràmics a materials recoberts. Els recobriments obtinguts s'han estudiat mitjançant un gran ventall de tècniques tals com mesures d'angle de contacte, tècniques de microscòpia, espectroscòpia de IR d'angle rasant i espectrometria de masses. Les mesures d'angle de contacte han demostrat la formació d'una capa que aporta a la superfície una hidrofobicitat comparable a la obtinguda amb àcids carboxílics de longituds de cadena semblants. L'aromaticitat del grup escuaramat ha permès la detecció i seguiment de la formació de la capa molecular mitjançant espectroscòpia de reflectància en UV-vis, una tècnica poc utilitzada en aquest camp. A més, els recobriments obtinguts han demostrat tenir una major resistència a la desorció per immersió en isopropanol que els recobriments duts a terme amb àcids carboxílics.

Capítol 4. En aquest capítol s'ha dissenyat un receptor de base escuaramido-escuaramat per a la detecció de molècules zwitteriòniques com la miltefosina. La seva estructura dona lloc a una disposició dels grups escuaramida i escuaramat que permet la autoagregació, impedit en gran mesura la unió amb anions competitiu com els halurs.

Capítol 5. La capacitat d'autoagregació de les esquaramides s'ha utilitzat pel disseny d'hidrogelants de base escuaramido-escuaramat. L'elevada acidesa de l'àcid escuaràmic fa que es trobi desprotonat en un ampli rang de pH, la qual cosa permet la seva utilització com a part hidrofílica de un hidrogelant de baix pes molecular. La introducció dels grups  $-NO_2$  i  $-CF_3$  a

l'arilesquaramida permet modular les propietats dels hidrogels resultants, donant lloc a pronunciades diferències en l'estabilitat tèrmica, en les propietats mecàniques i en la morfologia de les fibres que els componen. Així, l'hidrogel nitroderivat resulta injectable, tixotròpic, i experimenta un procés d'encongiment irreversible en presència de dissolucions salines. A més pot carregar-se amb quantitats substancials de biomolècules zwitteriòniques al seu interior (fins a una relació molar de 240:1), que poden alliberar-se posteriorment al medi de forma controlada.

## Abstract

This PhD thesis describes squaramic acids and their application in different fields related to Supramolecular Chemistry. These compounds are a little known type of squaric acid derivatives. Specifically, the work described herein is divided into five chapters.

Chapter 1. The general introduction provides an overview of Supramolecular Chemistry and its main current fields of application. More specifically, squaric acid derivatives and their use as active centers for recognition and supramolecular aggregation phenomena, the main topic on which this report is, are described.

Chapter 2. In this chapter an effective method of microwave-assisted synthesis of squaramic acids derived from both aliphatic and aromatic amines is developed in yields ranging from 41 to 92%. The acid properties of the most representative compounds have been characterized by spectrophotometric titrations, obtaining  $pK_a$  values between 0.9 and 2.0.

Chapter 3. In a first phase, long-chain squaramic acids have been synthesized, and their ability to chemically adsorb on aluminum surfaces has been studied. This chapter provides basic information for a subsequent implementation of squaramic acids in coated materials. The coatings obtained have been studied through a wide range of techniques, such as contact angle measurements, microscopy techniques, grazing angle IR spectroscopy and mass spectrometry. Contact angle measurements have shown the formation of a layer which provides hydrophobicity to the surface, comparable to that obtained with carboxylic acids of similar chain lengths. The aromaticity of the squaramate group has allowed for detecting and monitoring the formation of the molecular layer by UV-vis reflectance spectroscopy, a technique not widely used in this field. In addition, the coatings obtained exhibit a higher resistance to desorption by immersion in isopropanol than those carried out with carboxylic acids.

Chapter 4. In this chapter a squaramide-squaramate based receptor has been designed for the detection of zwitterionic molecules such as miltefosine. The structure of this receptor gives rise to an ensemble of the squaramide and squaramate groups that allows its self-aggregation, preventing the formation of complexes with competitive anions like halides.

Chapter 5. The self-aggregation capacity of squaramates has been used for the design of squaramide-squaramate-based hydrogels. The high acidity of the squaramic acid ensures its ionization over a wide pH range, allowing its use as a hydrophilic part of a low molecular weight hydrogelator. The introduction of the  $-NO_2$  and  $-CF_3$  groups into the arylsquaramide leads to the modulation of the resulting properties of the hydrogels, causing marked differences in the thermal stability, mechanical properties and morphology of the fibers. Thus, the nitroderivative hydrogel turn out to be injectable, thixotropic, and undergoes an

irreversible shrinking process in the presence of saline solutions. In addition, substantial amounts of zwitterionic biomolecules can be charged inside the hydrogel (up to 240: 1 excess molar ratio), which can subsequently be released into the medium in a controlled manner.



# Índice

Capítulo 1. Introducción General .....	25
1.1. Química Supramolecular .....	27
1.2. Ácido escuárico y derivados .....	28
1.2.1. Actividad biológica .....	30
1.2.2. Reconocimiento molecular con derivados de ácido escuárico .....	33
1.3. Agregación y autoensamblaje molecular .....	36
1.3.1. Máquinas moleculares .....	37
1.4. Agregación de escuaramidas.....	43
1.5. Ácidos oxámicos como alternativa estructural de los ácidos escuarámicos.....	46
Capítulo 2: Síntesis eficiente asistida por microondas de ácidos escuarámicos en agua.* .....	49
2.1. Introducción .....	51
2.1.1. Ácidos escuarámicos .....	51
2.1.2. Síntesis asistida por microondas .....	56
2.2. Objetivos .....	61
2.3. Resultados y discusión .....	63
2.4. Conclusiones.....	72
2.5. Sección Experimental .....	73
2.5.1. Información general .....	73
2.5.2. Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de ácidos escuarámicos.....	73
2.5.3. Valoraciones espectrofotométricas .....	84
2.5.4. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ NMR. ....	91
Capítulo 3: Adsorción de ácidos escuarámicos de cadena larga sobre superficies de aluminio. ....	109
3.1. Introducción .....	111
3.1.1. Modificación química de superficies metálicas .....	111
3.1.2. Quimisorción de ácidos carboxílicos sobre superficies metálicas .....	113
3.1.3. Quimisorción de ácidos fosfónicos y fosfonatos sobre superficies metálicas .....	115
3.1.4. Características y aplicaciones de los materiales recubiertos .....	117
3.2. Objetivos .....	121
3.3. Síntesis y diseño de ácidos escuarámicos de cadena larga.....	123
3.4. Resultados y discusión .....	125
3.4.1. Adsorción de LCSQAs, EtSqC <sub>16</sub> y PA.....	125

3.4.2. Desorción comparada de HSqC <sub>16</sub> y PA. ....	136
3.5. Conclusiones.....	142
3.6. Sección Experimental .....	143
3.6.1. Síntesis y caracterización de productos .....	143
3.6.2. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C NMR. ....	145
3.6.3. Preparación, activación y quimisorción de las muestras de Al .....	149
3.6.4. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM).....	149
3.6.5. Imágenes de AFM.....	150
3.6.6. Medidas del ángulo de contacto (CAM).....	150
3.6.7. Espectroscopia de "Grazing Angle" GA-FTIR .....	151
3.6.8. Espectroscopia de masas por MALDI-TOF.....	151
3.6.9. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	152
3.6.10. Espectroscopia UV de reflectancia total .....	152
Capítulo 4: Reconocimiento molecular de zwitteriones: reconocimiento selectivo de miltefosina mediante un receptor de base escuaramida-escuaramato.* .....	153
4.1. Introducción .....	155
4.1.1. Receptores para moléculas zwitteriónicas.....	155
4.1.2. Miltefosina: un zwitterión con actividad biológica como objetivo de estudio .....	159
4.2. Objetivos .....	161
4.3. Diseño y síntesis de un receptor de base escuaramida para miltefosina .....	163
4.4. Resultados y discusión .....	165
4.5. Conclusiones.....	170
4.6. Sección Experimental .....	171
4.6.1. Información general .....	171
4.6.2. Síntesis.....	171
4.6.3. Experimentos ROESY .....	176
4.6.4. MALDI-TOF .....	177
4.6.5. Experimentos DOSY.....	177
4.6.6. Valoraciones por RMN .....	179
4.6.7. Espectros de RMN de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C NMR. ....	185
Capítulo 5: Hidrogeles supramoleculares anfifílicos basados en escuaramido-escuaramatos.* .....	189
5.1. Introducción .....	191
5.1.1. Hidrogeles .....	191
5.1.2. Hidrogeles poliméricos.....	192

5.1.3. Hidrogeles supramoleculares.....	193
5.1.4. Aplicaciones de los hidrogeles supramoleculares.....	204
5.1.5. Antecedentes de la utilización de escuaramidas en geles.....	206
5.2. Objetivos .....	209
5.3. Diseño y síntesis de hidrogelantes de base escuaramido-escuaramato.....	211
5.4. Resultados y discusión .....	213
5.5. Conclusiones.....	225
5.6. Sección Experimental .....	227
5.6.1. Métodos e instrumentación.....	227
5.6.2. Síntesis de los hidrogelantes.....	227
5.6.3. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .....	229
5.6.4. Preparación de los hidrogeles.....	231
5.6.5. Caracterización de hidrogeles.....	231
5.6.6. Estudio de agregación por Static Light Scattering (SLS).....	241
5.6.7. Estudio de agregación por espectroscopia de absorción en UV-vis.....	241
5.6.8. Calorimetría diferencial de barrido.....	243
5.6.9. Citotoxicidad.....	243
5.6.10. Encogimiento de hidrogeles inducido por la adición de sales.....	244
5.6.11. Reología.....	245
5.6.12. Preparación de hidrogeles cargados.....	245
Conclusiones .....	249
Conclusiones .....	251



## ***Capítulo 1. Introducción General***



## 1.1. Química Supramolecular

El campo de la Química Supramolecular<sup>1</sup> se inició a partir de los estudios pioneros sobre reconocimiento molecular llevados a cabo por Jean-Marie Lehn, Donald J. Cram y Charles J. Pedersen en los años sesenta y setenta. A partir de dichos trabajos se les otorgó conjuntamente el Premio Nobel de Química en 1987. Así pues Lehn, uno de los padres de la Química Supramolecular, define la disciplina exponiendo que “*la Química Supramolecular apunta al desarrollo de sistemas químicos de elevada complejidad, a partir de componentes que interactúan entre sí mediante fuerzas intermoleculares no covalentes*”.<sup>2</sup> Esta definición implica que otras disciplinas distintas a las tradicionales de la química tienen cabida y trascendencia en la Química Supramolecular, entre ellas las relacionadas con las ciencias de la salud: Bioinorgánica, Bioorgánica, Bioquímica, Biomedicina, la ciencias de los Materiales, la Nanotecnología, etc.

La inspiración de los estudios en este campo reside en la presencia de interacciones supramoleculares en los organismos vivos y en la mayoría de sistemas complejos. La gran mayoría de reacciones que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas, proteínas plegadas de manera que conforman cavidades preparadas para reconocer sustratos de manera específica, constituyendo así un complejo supramolecular, para luego llevar a cabo la reacción enzimática. Otros procesos, como el transporte a través de membranas, la estructura tridimensional del ADN, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, o las interacciones proteína-proteína, son ejemplos de sistemas supramoleculares cuya naturaleza define la vida tal y como la conocemos.

Todas las fuerzas intermoleculares tienen su peso en la Química Supramolecular, pues la combinación de varias de ellas será la que aportará unas propiedades u otras. Por fuerzas intermoleculares deben entenderse cualquier tipo de interacción de naturaleza atractiva entre especies moleculares. Entre éstas destacan enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , ion- $\pi$ , etc. La magnitud de la energía de interacción y la direccionalidad son los factores que diferencian unas de otras y que definen las características del sistema diseñado.

Para que se establezcan interacciones intermoleculares debe existir una complementariedad química y estructural entre las moléculas que van a interactuar. Es decir, una estructura química deberá disponer de una serie de grupos químicos distribuidos de tal manera que puedan interactuar con grupos complementarios de la molécula con la que se va a llevar a cabo la interacción y que se conoce como *reconocimiento molecular*.<sup>3</sup> El reconocimiento molecular se basa en la interacción no covalente que se produce entre una

---

<sup>1</sup> (a) J.-M. Lehn. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, Germany, **1995**.

<sup>2</sup> J. M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4763.

<sup>3</sup> S.H. Gellman. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1231-1232

molécula anfitriona o receptor (*host*) y una molécula huésped o substrato (*guest*), complementaria al receptor, para dar lugar al complejo supramolecular receptor-substrato.

Relacionado con lo anterior surge el concepto de autoensamblaje<sup>4</sup> en sus versiones intramolecular e intermolecular. El primero hace referencia al proceso por el cual se produce un plegamiento en la molécula debido a una interacción no covalente entre dos partes de la misma.<sup>5</sup> El segundo hace referencia a la formación de estructuras moleculares constituidas por moléculas asociadas en condiciones de equilibrio y de forma no covalente gracias a la autocomplementariedad existente.<sup>6</sup>

### 1.2. Ácido escuárico y derivados

En la Química Supramolecular se utilizan grupos funcionales específicos que suelen repetirse en las moléculas diseñadas debido a su capacidad para proporcionar interacciones no covalentes concretas. El ácido escuárico y sus derivados constituyen una estructura química que aporta esas características.<sup>7</sup>

El ácido escuárico (3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona) está constituido por un anillo de ciclobuteno con dos grupos carbonilo contiguos y dos grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 4. Los hidrógenos hidroxílicos son fuertemente ácidos ( $pK_a$  1.54 y 3.48) (Figura 1.1a).<sup>8</sup> El término escuarato se utiliza cuando uno de los hidroxilos, o ambos, se encuentran ionizados por la acción de una base. Si uno o ambos hidroxilos se encuentra sustituido por uno o dos alcoholes se habla de ésteres del ácido escuárico. Si uno de los hidroxilos se mantiene y el otro se encuentra en forma de amida, se suelen denominar como ácido amidoescuáricos, o ácido escuarámicos. Si el escuarato está sustituido en forma de diamida, entonces se habla de diescuaramidas, o simplemente escuaramidas. En algunos casos, la obtención de escuaramidas se acompaña de otros productos de doble entrada denominados escuarainas, sobre todo si la amina utilizada es un derivado de anilina con grupos electroatrayentes (Figura 1.1b).

<sup>4</sup> G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seta. *Science*, **1991**, 254, 1312-1319.

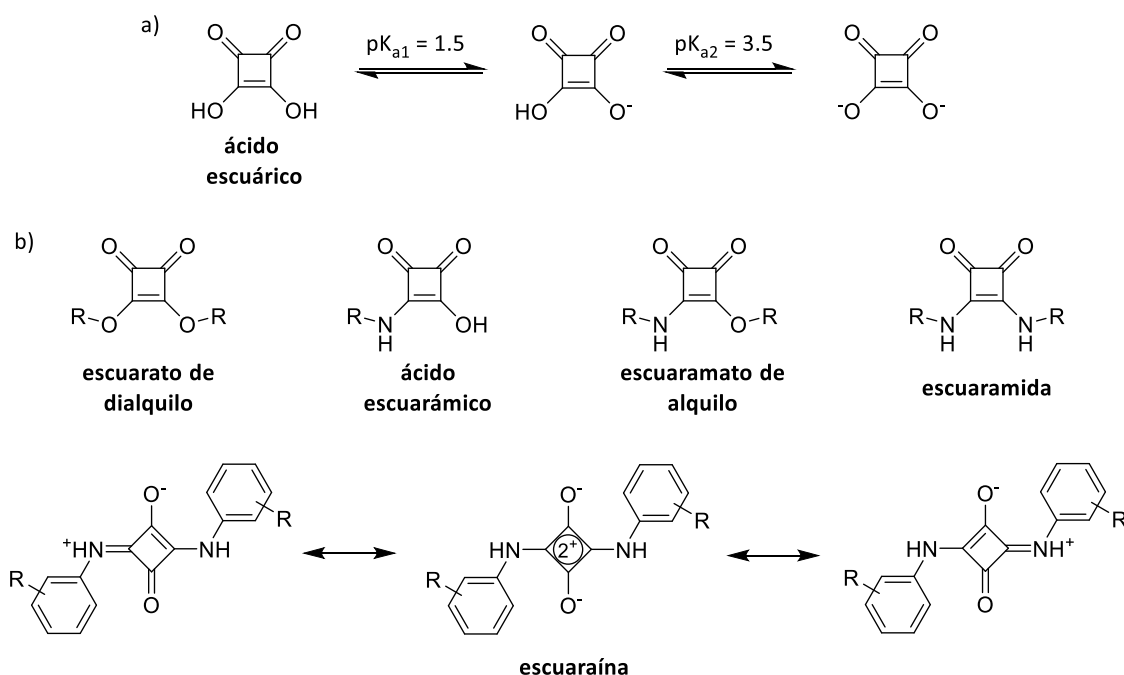
<sup>5</sup> J. W. Steed, P. A. Gale. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Wiley, **2012**.

<sup>6</sup> (a) D. Philp, J. F. Stoddart. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35, 1154-1196; (b) G. M. Whitesides, B. Grzybowski. *Science* **2002**, 295, 2418-2421; (c) S. I. Stupp, L. C. Palmer. *Chem. Mater.* **2014**, 26, 507-518

<sup>7</sup> R. I. Storer, C. Aciro, L. H. Jones. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2330-2346.

<sup>8</sup> L. L. M. Schwartz, L. L. O. Howard. *J. Phys. Chem.* **1971**, 751, 1798-1803.





**Figura 1.1.** a) Equilibrios de ionización del ácido escuárico. b) Diferentes derivados de ácido escuárico.

Las escuaramidas presentan una estructura plana con capacidad para formar enlaces de hidrógeno con interacciones secundarias favorables debido a la presencia de dos grupos dadores (NH) y dos grupos aceptores (C=O) de enlace hidrógeno contiguos. Además, el par de electrones no enlazante de los nitrógenos amídicos puede deslocalizarse hasta el oxígeno situado en el vértice opuesto del ciclobuteno a través del sistema  $\pi$  (Figura 1.2a).<sup>9</sup> Esta característica implica que el oxígeno presenta una densidad de carga negativa adicional, lo que lo convierte en un excelente aceptor de enlaces de hidrógeno. Por otra parte, el nitrógeno adquiere una densidad de carga positiva, lo que debilita el enlace N-H y por tanto aumenta su capacidad como dador de enlaces de hidrógeno.

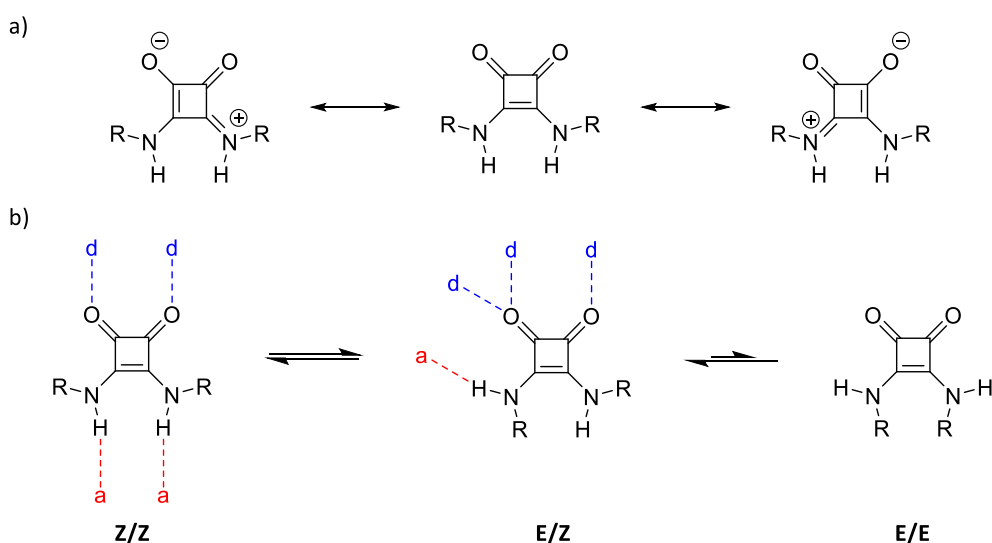
Las estructuras resonantes indicadas, además de fortalecer la capacidad para que se produzcan enlaces de hidrógeno, hacen que el enlace C-N sea más corto de lo habitual, e imposibilita la libre rotación del enlace C-N escuaramídico. De esta manera pueden presentarse confórmeros que se encuentran en equilibrio: Z/Z, Z/E y E/Z (Figura 1.2b).<sup>10</sup> El confórmero E/E no se llega a observar, debido al elevado impedimento estérico que presentan las cadenas de la escuaramida. Los confórmeros Z/Z, E/Z y Z/E presentan además patrones distintos de formación de enlaces de hidrógeno.<sup>11</sup>

<sup>9</sup> G. Cerioni, R. Janoschek, Z. Rappoport, T. T. Tidwell. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6212-6217.

<sup>10</sup> M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2302-2308.

<sup>11</sup> W. L. Jorgensen, J. Pranata. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2008-2010

Sin embargo, la capacidad que tienen las escuaramidas para llevar a cabo puentes de hidrógeno disminuye la solubilidad de estos compuestos en disolventes orgánicos apolares, favoreciendo por otra parte la interacción con disolventes como el DMSO y DMF, en los que suelen ser generalmente solubles. Además, dependiendo de la naturaleza de las cadenas unidas a los nitrógenos escuarámicos, la solubilidad en disolventes polares también puede verse mermada. Por otra parte, la aromaticidad mencionada de los derivados del ácido escuárico y la consiguiente capacidad de llevar a cabo interacciones por apilamiento dificulta también su solvatación en disolventes polares.



**Figura 1.2.** a) Formas resonantes zwitteriónicas para una escuaramida secundaria. b) Equilibrio conformacional de las escuaramidas secundarias y patrón de formación de enlaces de hidrógeno para los confórmeros más estables (d = dador, a = aceptor).

### 1.2.1. Actividad biológica

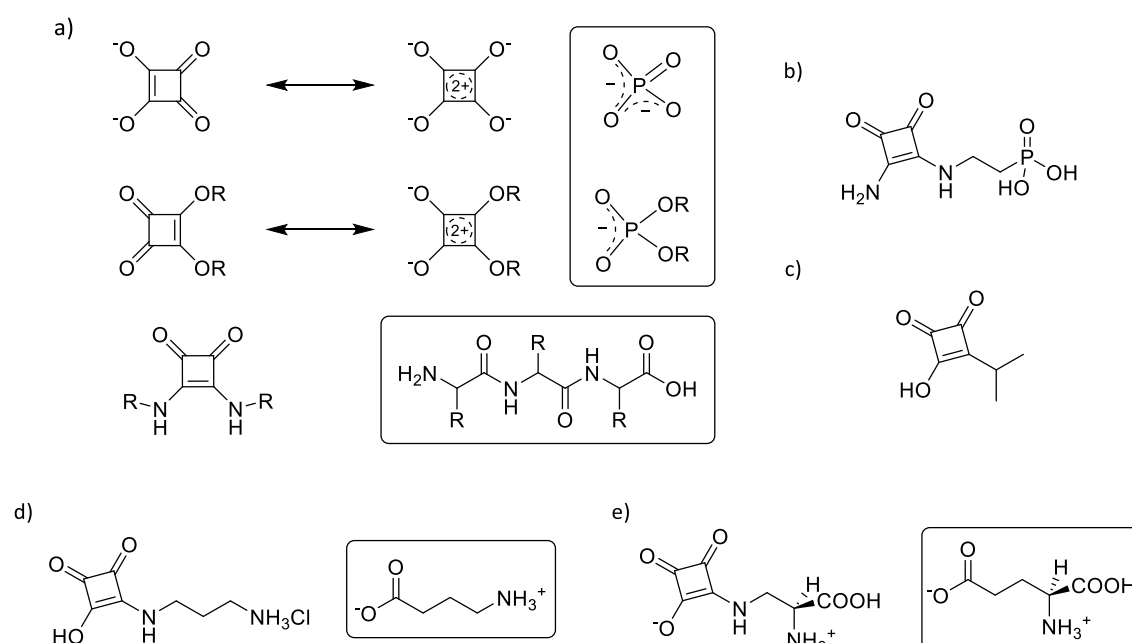
Dada la elevada capacidad de interacción vía enlaces de hidrógeno y/o interacciones de tipo  $\pi$  no es de extrañar que existan numerosos ejemplos de moléculas basadas en derivados del ácido escuárico que poseen actividad biológica. En la bibliografía pueden encontrarse numerosos estudios sobre estructuras basadas en la unidad escuarato o escuaramida que presentan algún tipo de actividad biológica. El propio ácido escuárico es un inhibidor de la glioxilasa,<sup>12</sup> mientras que el ácido semiescuárico es inhibidor de la piruvato deshidrogenasa y la transcetolasa.<sup>13</sup> También se ha descrito la capacidad del ácido escuárico para actuar como

<sup>12</sup> J. F. Barnard, J. F. Honek. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **1989**, 165(1), 118-24.

<sup>13</sup> L. T. Burka, J. Doran, B. J. Wilson. *Biochemical Pharmacology*, **1982**, 31(1), 79-84.

bioisómero de enlaces de tipo éster fosfórico y del grupo fosfato (Figura 1.3a), mostrando en este último caso una capacidad inhibitoria de la familia de las proteínas fosfatasa de Tyr.<sup>14</sup>

Por su parte, las escuaramidas actúan como bioisómeros del grupo amida e incluso de ciertos aminoácidos (Figura 1.3a), mostrando actividad biológica.<sup>15</sup> Siguiendo este principio, se han desarrollado escuaramidas con capacidad para sustituir  $\alpha$ -aminoácidos o derivados, dando lugar por ejemplo a antagonistas del N-metil-D-aspartato (NMDA) en receptores de aminoácidos<sup>16</sup> (Figura 1.3b), antagonistas de isopropil malato en la  $\beta$ -isopropilmalato deshidrogenasa (IMDH) (Figura 1.3c),<sup>17</sup> y análogos de glicina,  $\beta$ -alanina, GABA (Figura 1.3d) y L-glutámico (Figura 1.3e),<sup>18</sup> en este último caso con actividad como agente neuroquímico.



**Figura 1.3.** a) Representación del escuarato como bioisómero de los grupos fosfato y fosfodiéster y de las escuaramidas como bioisómeros del enlace peptídico. b-e) Derivados de ácido escuárico con actividad biológica: (b) antagonista de NMDA, (c) inhibidor de IMDH, (d) análogo de GABA y (e) análogo de L-glutamato.

<sup>14</sup> J. Xie, A. B. Comeau, C. T. Seto. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 83-86

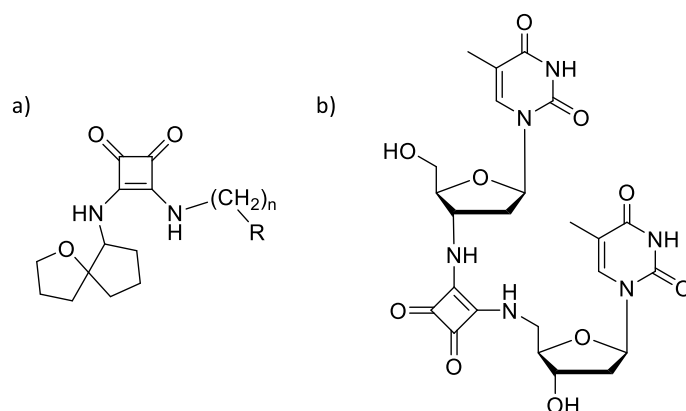
<sup>15</sup> W. A. Kinney, N. E. Lee, D. T. Garrison, E. J. Podlesny, J. T. Simmonds, D. Bramlett, R. R. Notvest, D. M. Kowal, R. P. Tasse. *J. Med. Chem.* **1992**, *34*, 4720-4726.

<sup>16</sup> P. C. M. Chan, R. J. Roon, J. F. Koerner, N. J. Taylor, J. F. Honek. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4433-4438

<sup>17</sup> M. C. Pirrung, H. Han, R. T. Ludwig. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2430-2436

<sup>18</sup> D. J. Crak. *Science* **2006**, *311*, 1563-1564

Otros compuestos derivados de escuaramidas son capaces de abrir canales de potasio (Figura 1.4a), resultando así de utilidad como fármacos potenciales para el tratamiento de varias enfermedades como la hipertensión, Alzheimer, epilepsia y Parkinson entre otras.<sup>19</sup>



**Figura 1.4.** a) Derivado de escuaramida con capacidad para abrir canales de potasio. b) Ejemplo del uso de una escuaramida como análoga del grupo fosfato en síntesis de oligonucleótidos.

La similitud estructural con el grupo fosfodiéster ha llevado a la síntesis de bioisómeros de 5'-nucleótidos sustituyendo el grupo fosfato por un centro escuarato.<sup>20</sup> El compuesto que aparece en la Figura 1.4b se ha incorporado como parte de un decanucleótido, consiguiéndose la unión con la cadena complementaria. El fragmento resultante, a pesar de tener cierta inestabilidad térmica en comparación con el mismo oligonucleótido sin modificar, mantiene la paridad de bases, de forma que pueden llevarse a cabo procesos de reconocimiento de bases a pesar de la alteración.

En el campo de los neurotransmisores, un conjunto de derivados del ácido semiescuárico se ha probado que actúan como antagonistas del receptor CCR1.<sup>21</sup> Este receptor está relacionado con enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple. En este caso el producto aún conserva uno de los dos hidroxilos del ácido escuárico original. Sin embargo, la unión del centro escuárico al resto de la molécula no es mediante una amida, dando lugar así un ácido escuarámico, sino mediante un enlace directo C-C entre la cadena y el ciclobuteno (Figura 1.5). Este tipo de compuestos son relativamente frecuentes en la bibliografía, sin embargo al carecer de un grupo NH amídico su potencial como unidades

<sup>19</sup> WO 2007/115071 A1

<sup>20</sup> (a) K. Seio, T. Miyashita, K. Sato, M. Sekine. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5163–5170; (b) K. Sato, K. Seio, M. Sekine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12715–12724.

<sup>21</sup> M. R. Soll, W. A. Kinney, J. Primeau, L. Garrick, R. J. McCaully, T. Colatsky, G. Oshiro, C. H. Park, D. Hartupee, V. White, J. Mccallum, A. Ruso, A. Wojdan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 757-760.

clave para el reconocimiento molecular son reducidas. Aun así resultan ser bioisómeros de aminoácidos y fosfodiésteres, por ejemplo.

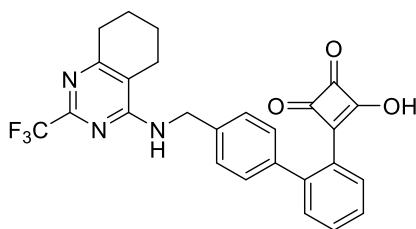


Figura 1.5. Derivado de ácido semiescuárico preparado mediante enlace (R)C-C(Sq).

### 1.2.2. Reconocimiento molecular con derivados de ácido escuárico

Las escuaramidas, debido a sus características estructurales y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, pueden servir como receptores moleculares de sustratos concretos. En la configuración Z/Z, los NH se encuentran coplanarios y en disposición de llevar a cabo enlaces de hidrógeno con grupos aniónicos o con densidad de carga negativa. Por otra parte, los oxígenos cetónicos del centro escuaramida son capaces de interactuar con grupos electropositivos y con cationes.

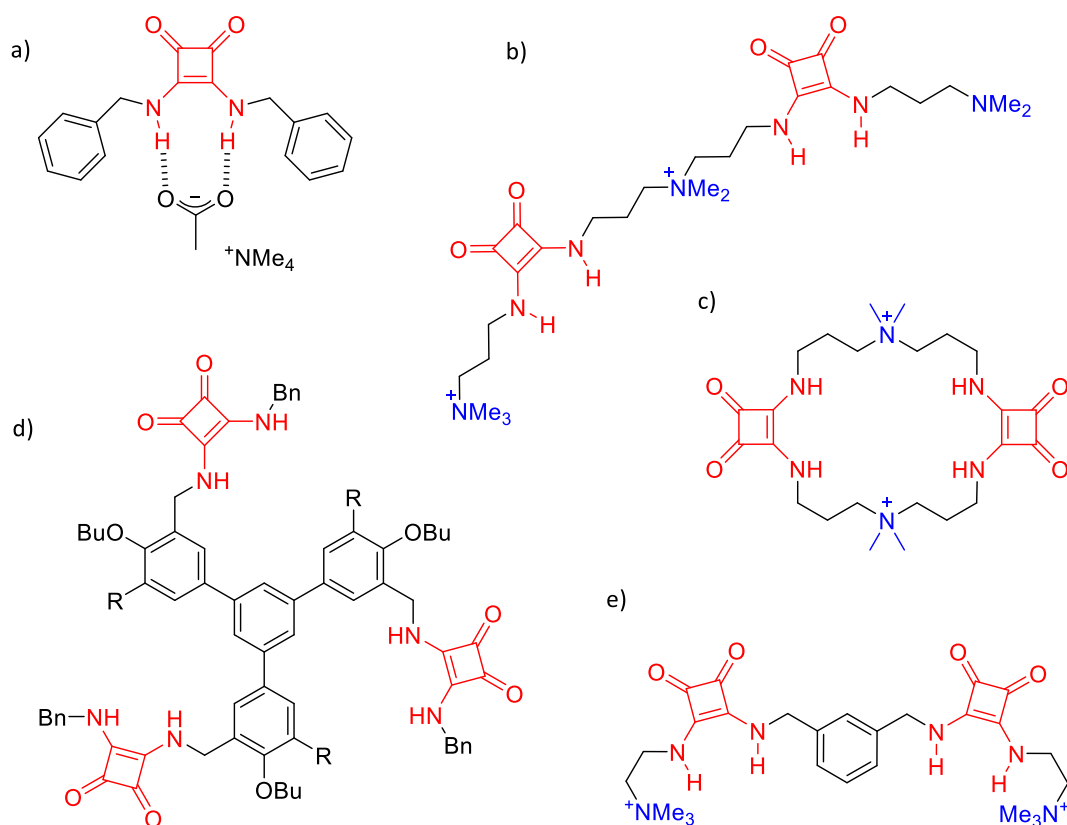
En la bibliografía pueden encontrarse una gran cantidad de estudios sobre reconocimiento de aniones mediante el uso de escuaramidas. En este campo, el grupo de Química Supramolecular de la UIB ha realizado numerosas aportaciones. Uno de los ejemplos más sencillos, pero que sirve como ejemplo básico del tipo de interacción que lleva a cabo una escuaramida, es la capacidad de la dibencilescuaramida para interactuar con el anión acetato (Figura 1.6a).<sup>22</sup>

Mediante escuaramidas más complejas que incluyen cadenas laterales con aminas terciarias o cuaternarias se ha conseguido el reconocimiento de aniones como el sulfato,<sup>23</sup> el trimesoato<sup>24</sup> o el oxalato (Figura 1.6).<sup>17</sup> En estos receptores, la parte de la molécula que desempeña las interacciones principales con el sustrato son los propios centros escuaramida, que sirviéndose de una estructura molecular adicional quedan dispuestos en la posición y orientación adecuados para llevar a cabo el complejo.

<sup>22</sup> R. Prohens, M. C. Rotger, M. N. Piña, P. M. Deyà, J. Morey, P. Ballester, A. Costa. *Tet. Lett.*, **2001**, 42(29), 4933-4936.

<sup>23</sup> (a) M. N. Piña, C. Rotger, B. Soberats, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa. *Chem. Comm.* **2007**, 963-965; (b) R. Prohens, G. Martorell, P. Ballester, A. Costa. *Chem. Comm.*, **2001**, 16, 1456-1457; (c) J. Xie, A. B. Comeau, C. T. Seto. *Org. Lett.* **2004**, 6, 83-86

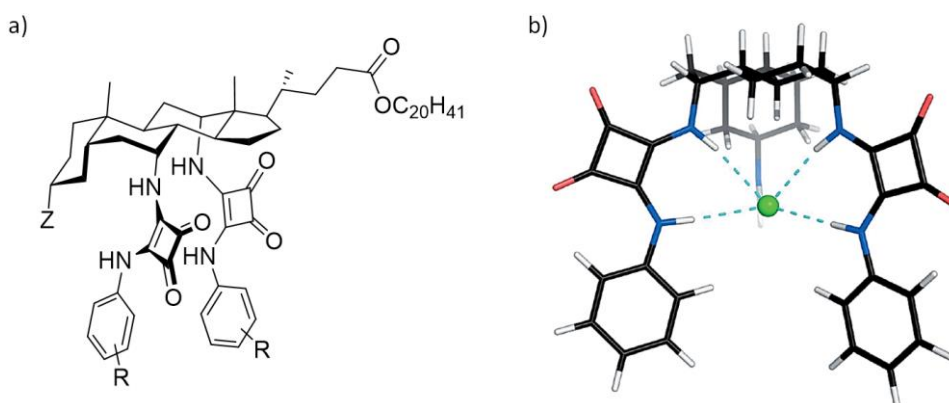
<sup>24</sup> R. Prohens, S. Tomàs, J. Morey, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa. *Tet. Lett.*, **1998**, 39(9), 1063-1066.



**Figura 1.6.** a) Esquema de la interacción de dibencilescuaramida con el anión acetato. b, c) Receptores escuaramídicos para el anión sulfato. d) Receptor tripodal para trimesoato (1,3,5-tricarboxilatobenceno). e) Receptor escuaramídico para oxalato ( $C_2O_4^{2-}$ ).

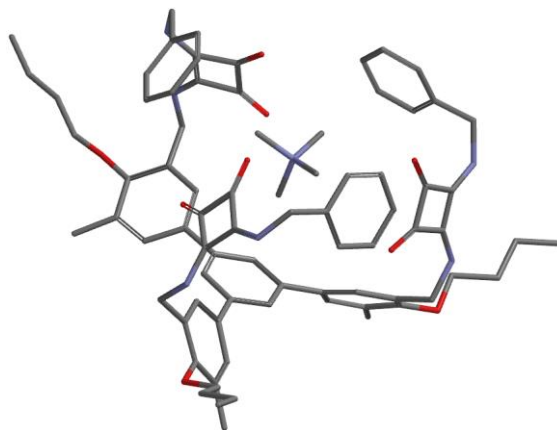
Un ejemplo notable de este tipo de arquitectura molecular es la unión de escuaramidas a las posiciones axiales de un esteroide, dando lugar a un receptor de aniones excepcionalmente potente (Figura 1.7).<sup>25</sup> El esqueleto esteroide preorganiza las escuaramidas de manera que los NH quedan dispuestos con la orientación adecuada para interactuar con el anión. Además, los anillos aromáticos unidos a las escuaramidas están sustituidos por distintos grupos funcionales, modificando así la fortaleza de unión con el anión. Por otra parte, el esqueleto esteroide confiere solubilidad en medios apolares, incluso una vez formado el complejo. Así, las constantes de asociación resultan superiores a  $10^{14} M^{-1}$  con sales de tetrametilamonio en cloroformo. Este valor resulta ser el valor más elevado publicado hasta la fecha para un receptor no natural de tetrametilamonio. Además, se ha evaluado la capacidad de estos receptores para actuar como transportadores de aniones transmembrana formando parte de vesículas.

<sup>25</sup> S. J. Edwards, H. Valkenier, N. Busschaert, P. A. Gale, A. P. Davis, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 4592–4596.



**Figura 1.7.** a) Esquema de receptor de aniones constituido por arilescuaramidas unidas a un esteroide. b) Cálculo ab initio (Hartree–Fock, 6-31+G\*) del complejo formado por uno de los receptores y  $\text{Cl}^-$ .

En cuanto al reconocimiento de cationes se han diseñado receptores tripodales optimizados para el reconocimiento selectivo de sales de amonio cuaternario  $\text{R}_4\text{N}^+$  (Figura 1.8). Aquí el esqueleto carbonado que actúa como espaciador permite la participación simultánea de hasta tres unidades escuaramida. En este caso, la interacción entre el receptor y el sustrato se produce mediante los grupos carbonilo de las unidades escuaramida.<sup>26</sup>



**Figura 1.8.** Representación de la estructura tridimensional de un receptor escuaramídico tripodal al interactuar con cationes del tipo  $\text{R-N}^+(\text{CH}_3)_3$ .

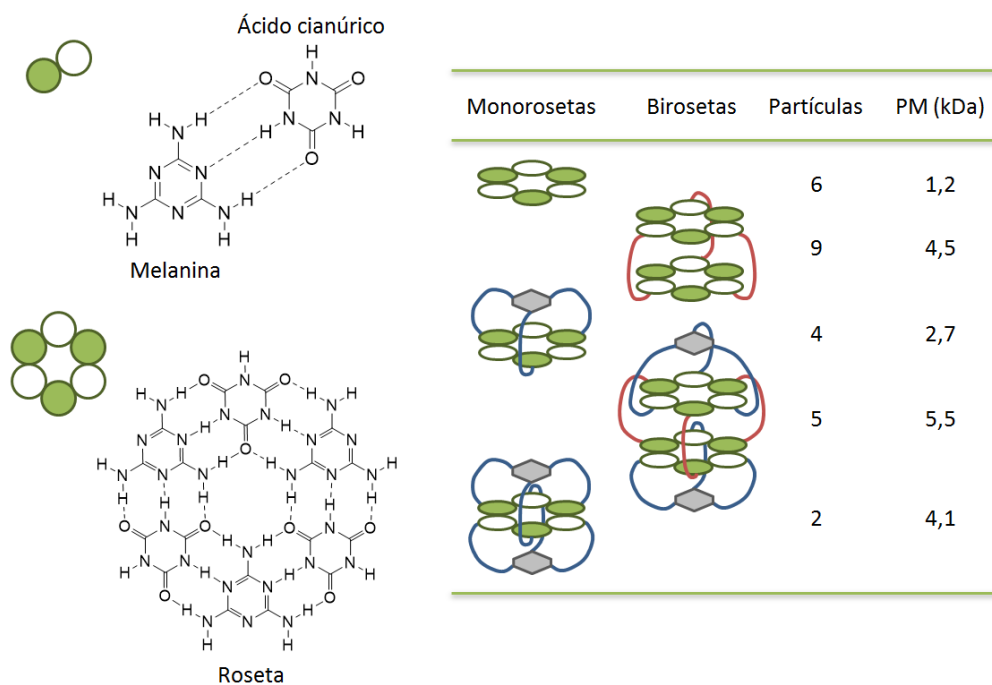
<sup>26</sup> S. Tomàs, R. Prohens, M. Vega, M. C. Rotger, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(26), 9394-9401.

### 1.3. Agregación y autoensamblaje molecular

Jean-Marie Lehn definió el concepto de autoensamblaje como “el proceso por el cual los componentes específicos se ensamblan espontáneamente de una manera altamente selectiva en una estructura supramolecular discreta y bien definida”.<sup>27</sup>

Para que se lleve a cabo el autoensamblaje las unidades deben quedar empaquetadas mediante interacciones no covalentes. La formación del agregado debe producirse de forma selectiva, de manera que las subunidades se acoplen de manera cooperativa formando el agregado más estable, cuyas propiedades serán diferentes a las de las subunidades que lo conforman. Además debe tener tamaño finito y composición molecular. Eso quiere decir que no se considerará un proceso de autoensamblaje a la agregación natural que llevan a cabo las especies químicas en una disolución saturada que se encuentra próxima a la precipitación.

El estudio de moléculas e iones capaces de autoensamblarse es actualmente uno de los principales puntos de interés y esfuerzo por parte de los investigadores que trabajan en el campo de la Química Supramolecular. En la bibliografía podemos encontrar una gran variedad de compuestos autoensamblantes, a cual más complejo que el anterior, y con aplicaciones muy variadas.



**Figura 1.9.** Rosetas derivadas de melanina y ácido cianúrico ordenadas de menor a mayor estabilidad.

<sup>27</sup> A. Pfeil, J.-M. Lehn. *Chem. Commun.* **1992**, 838-840



Uno de los primeros trabajos realizados en este campo, llevado a cabo por el equipo de Whitesides, explica la formación de estructuras supramoleculares denominadas rosetas a partir de la interacción mediante enlaces de hidrógeno de moléculas complementarias como son la melanina y el ácido cianúrico.<sup>28</sup> De esta manera se llegan a conseguir agregados discretos de hasta 5.5 kDa.

#### 1.3.1. Máquinas moleculares

La Real Academia Sueca de Ciencias decidió premiar a Jean-Pierre Sauvage, a Sir James Fraser Stoddart y a Bernard (Ben) L. Feringa con el Premio Nobel de Química 2016 "por el diseño y síntesis de máquinas moleculares".

Una máquina molecular se puede definir como "el ensamblaje de un número de componentes moleculares que están diseñados para realizar movimientos similares a los de una máquina (output) como resultado de una estimulación externa apropiada (input)".<sup>29</sup> La función que lleve a cabo la máquina debe ser una consecuencia de cómo están construidas y ensambladas las partes que la componen.

El diseño de entramados moleculares basados en enlaces mecánicos ha servido de punto de partida para la preparación de máquinas moleculares. En estas estructuras, las partes individuales no están conectadas directamente por enlaces covalentes, sino que se entrelazan de forma mecánica en forma de bucles, por ejemplo. Este diseño da lugar a complejos moleculares discretos en los cuales existe libertad de movimiento de las partes individuales que los conforman, siempre dentro del espacio que delimitan las interconexiones mecánicas.

En 1983 Jean-Pierre Sauvage y colaboradores introdujeron la síntesis a partir de plantillas o "templates" como una ruta para la formación de catenanos y rotaxanos (Figura 1.10),<sup>30</sup> lo cual supuso un gran avance en esta área. Mediante la formación de complejos de coordinación con metales, el plegamiento de las cadenas podía lograrse fácilmente, mejorando en gran medida los rendimientos globales. Esta metodología ha dado lugar a una amplia gama de

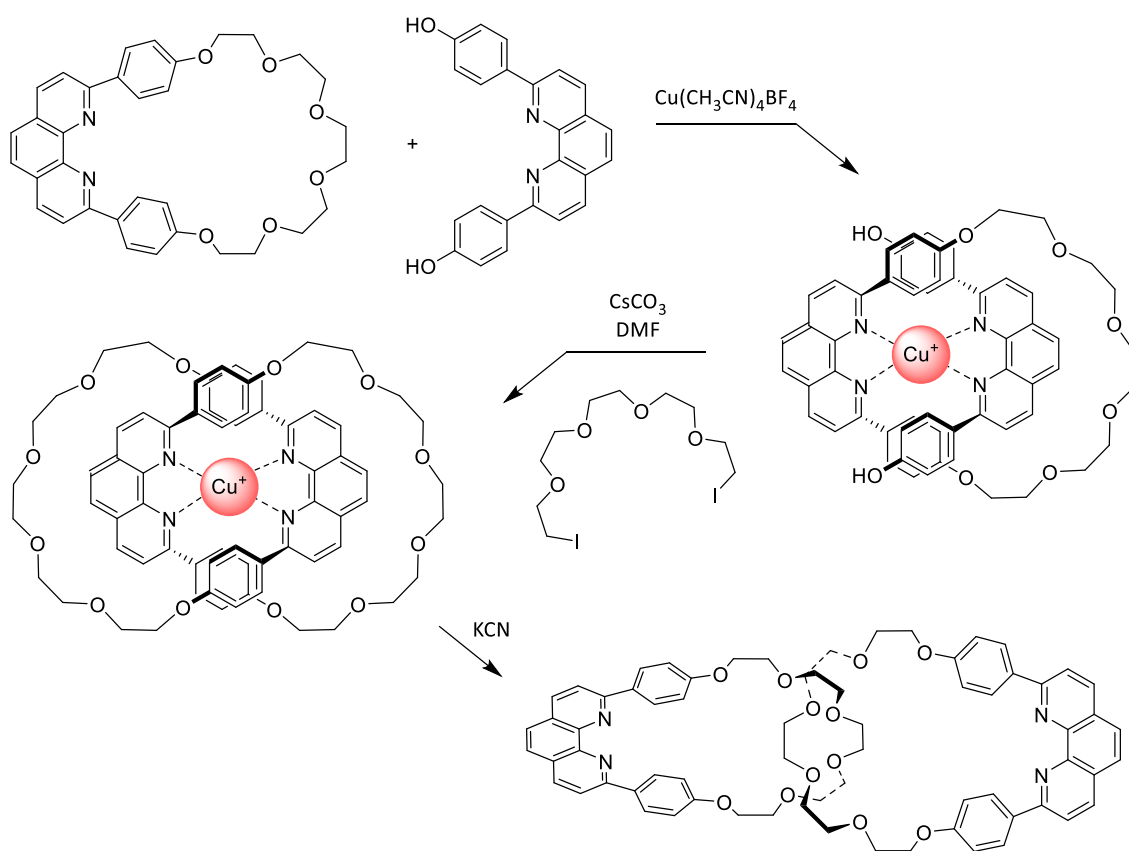
---

<sup>28</sup> (a) C. T. Seto, G. M. Whitesides. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*(17), 6409-11; (b) C. T. Seto, G. M. Whitesides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*(3), 905-16; (c) M. Mammen, E. E. Simanek, G. M. Whitesides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(50), 12614-12623; (d) I. S. Choi, X. Li, E. E. Simanek, R. Akaba, G. M. Whitesides, *Chemistry of Materials*, **1999**, *11*(3), 684-690.

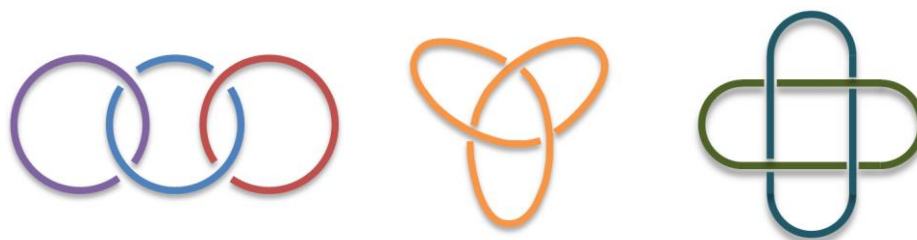
<sup>29</sup> V. Balzani, A. Credi, F. Raymo, J. Stoddart. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (19), 3348-3391.

<sup>30</sup> C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, J. P. Kintzinger. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5095-5098.

estructuras de diferente topología, como por ejemplo [3]catenanos, nudos de trébol y “Solomon links” (Figura 1.11).<sup>31</sup>



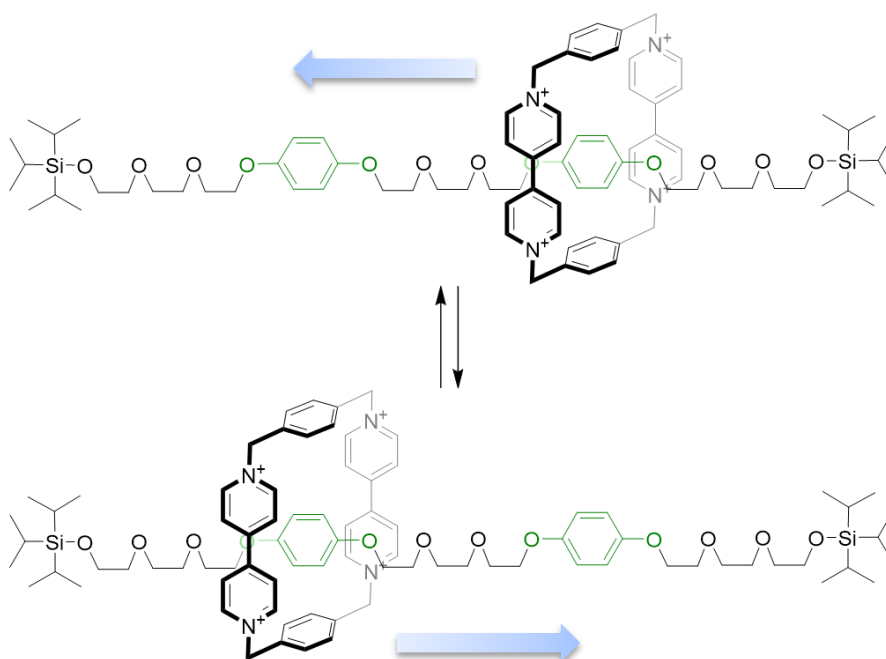
**Figura 1.10.** Catenano sintetizado mediante la formación de un complejo de Cu (I) facilitando así el plegamiento de la molécula.



**Figura 1.11.** De izquierda a derecha, esquema de la estructura de [3]catenanos, nudos de trébol y “Solomon links”.

<sup>31</sup> (a) J. P. Sauvage, J. Weiss. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6108–6110; (b) C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28* (2), 189–192; (c) J.-F. Nierengarten, C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 375–376.

En 1991 el grupo de Sir James Fraser Stoddart describió un sistema que mostraba isomería traslacional.<sup>32</sup> Para ello utilizaron un método alternativo de síntesis con moldes o “templates” para preparar moléculas mecánicamente entrelazadas, basado en la utilización de interacciones entre unidades aromáticas electrónicamente ricas y pobres. Estos estudios dieron como resultado el desarrollo de un derivado de bis-paraquat ciclofano,<sup>33</sup> que se podía cerrar alrededor de un eje molecular que contenía dos unidades de hidroquinol separadas por un linker. Los extremos del eje se bloquearon mediante la colocación de grupos voluminosos, dando lugar a un [2]rotaxano (Figura 1.12). Además, demostraron que el anillo de rotaxano ciclofano resultante actuaba como una lanzadera molecular, capaz de moverse entre las dos estaciones de hidroquinol sobre el eje.



**Figura 1.12.** a) Equilibrio traslacional de un [2]rotaxano compuesto por una unidad derivada de bis-paraquat ciclofano cerrada alrededor de un eje que contiene dos unidades de hidroquinol.

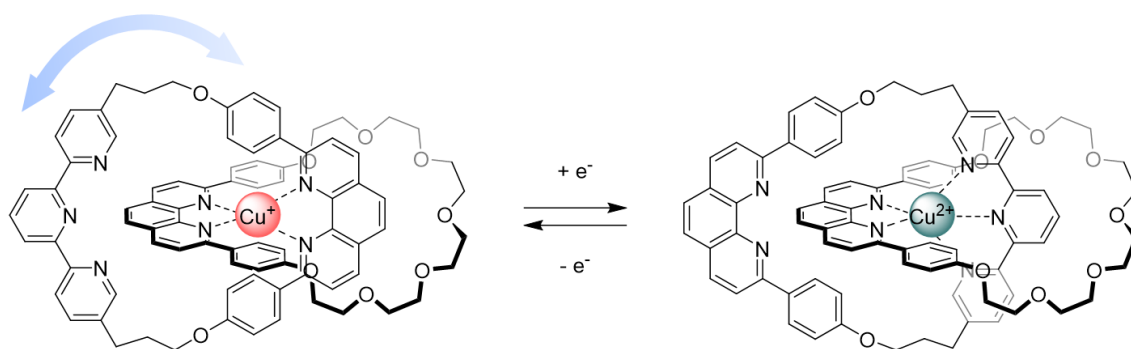
En 1994, se describieron movimientos de traslación y rotación controlados externamente en moléculas mecánicamente interconectadas introduciendo asimetrías en las estructuras.<sup>34</sup> El grupo de Stoddart introdujo dos unidades dadoras de electrones  $\pi$  diferentes en el eje de

<sup>32</sup> P. L. Anelli, N. Spencer, J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5131–5133.

<sup>33</sup> B. Odell, M. V. Reddington, A. M. Z. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart, D. J. Williams. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27* (11), 1547–1550.

<sup>34</sup> (a) R. A. Bissell, E. Córdova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart. *Nature*. **1994**, *369* (6476), 133–137; (b) A. Livoreil, C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9399–9400.

rotaxano. De esta manera demostraron que un anillo de bis-paraquat ciclofano podía moverse de forma controlada entre las dos estaciones tras ciclos de oxidación y reducción electroquímicas o mediante cambios de pH. Por su parte, el grupo de Sauvage diseñó un catenano que incluía dos sitios de coordinación diferentes en uno de los anillos, dejando un único sitio en el otro anillo (Figura 1.13). Así, la rotación se podía obtener tras ciclos de oxidación electroquímica y reducción del ión de cobre central.



**Figura 1.13.** Catenano con dos sitios de unión en uno de los anillos que permite la rotación de una posición a otra al modificar el estado de oxidación del metal coordinado.

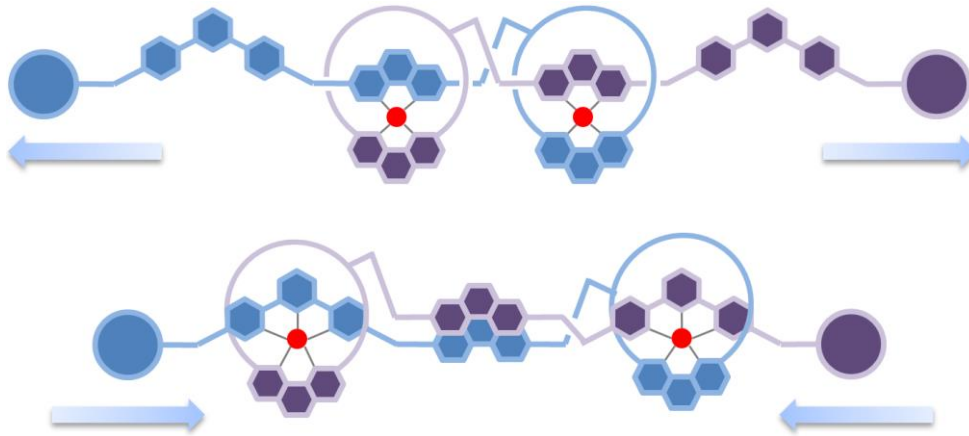
A partir de estos resultados se establecieron los principios sobre los que diseñar nuevas máquinas moleculares. También se empezó a investigar de forma más exhaustiva en aplicaciones que pudieran derivar de este tipo de sistemas. En el año 2000, el grupo de Sauvage integró dos rotaxanos entrelazados mutuamente,<sup>35</sup> de forma que se controlaba químicamente la contracción/extensión molecular, asemejándose a la acción de los músculos en los sistemas vivos (Figura 1.14). Así, fueron capaces de lograr un alto control de la contracción y la extensión traslacional de aproximadamente 2 nm bajo un estímulo químico.

Del mismo modo, en 2004 el grupo de Stoddart desarrolló un complejo dispositivo basado en rotaxanos llamado "ascensor molecular",<sup>36</sup> en el cual se pudo lograr gran control del movimiento de un plano móvil entre dos "pisos" separados por una distancia de 0,7 nm (Figura 1.15).

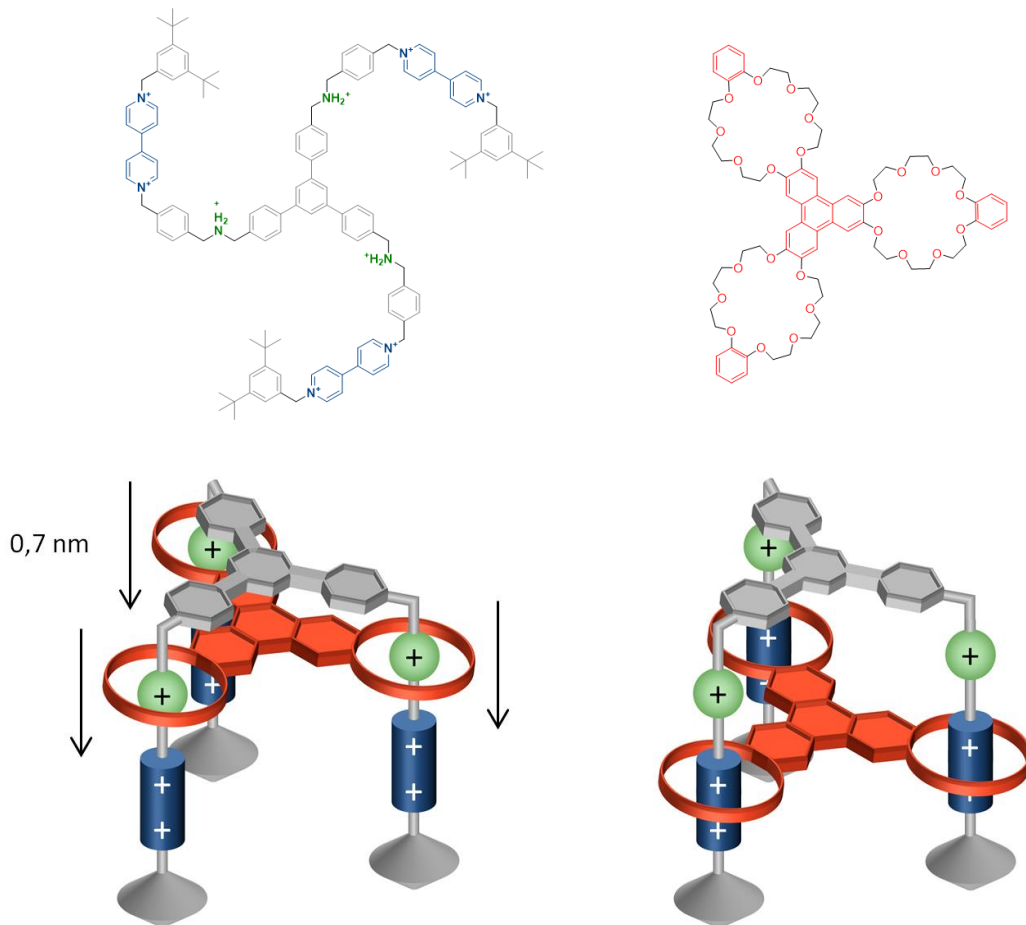
<sup>35</sup> R. Dimer, C. Dietrich-buchecker, M. C. Jime, J. Sauvage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *1*, 3284–3287.

<sup>36</sup> F. Standards, F. Standards, *Science.* **2004**, *303*, 1845–1849.

### 1.3. Agregación y autoensamblaje molecular

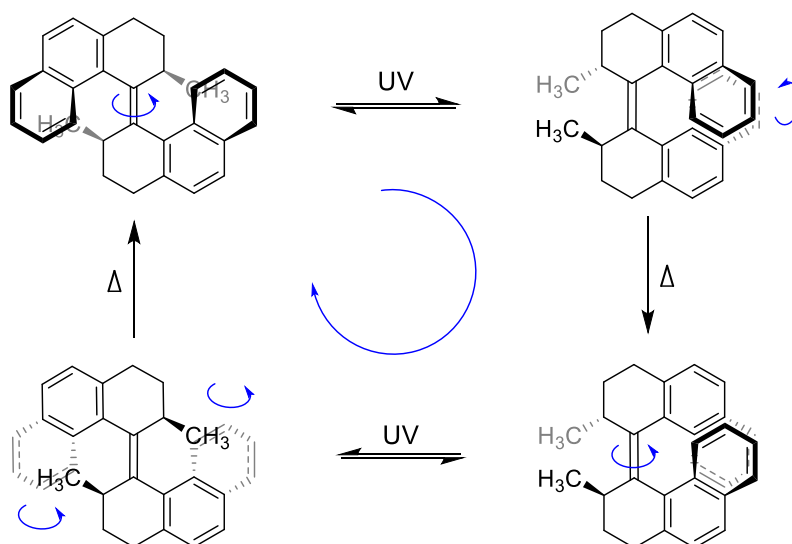


**Figura 1.14.** Esquema de dos rotaxanos entrelazados mutuamente con capacidad para llevar a cabo una extensión y contracción traslacional de aproximadamente 2 nm.



**Figura 1.15.** “Ascensor molecular” basado en el ensamblaje de rotaxanos.

En 1999 Bernard (Ben) L. Feringa publicó el primer ejemplo de rotación unidireccional controlada,<sup>37</sup> una característica que se considera típica en un dispositivo de motor rotatorio. Este componente no estaba basado en enlaces simples, sino en enlaces dobles isomerizables. Utilizando los llamados alquenos superpoblados y mediante asimetrías concretas en las moléculas, fue posible obtener rotación unidireccional a través de ciclos de irradiación de luz y relajación térmica (Figura 1.16).



**Figura 1.16.** Dispositivo molecular de motor rotatorio a partir de dobles enlaces isomerizables

Posteriormente, el grupo de Feringa ha descrito varios diseños de motores que aumentan drásticamente la frecuencia de rotación. En 2014, por ejemplo, se demostró que una estructura de motor molecular optimizada giraba con una frecuencia de más de 12 MHz.<sup>38</sup> A partir de este original avance, se llevó a cabo la construcción de un motor molecular anclando la parte del estator del dispositivo sobre una superficie de oro, dando lugar a una hélice molecular accionada por luz.<sup>39</sup> Feringa y col. demostraron que se podía utilizar un diseño de motor molecular similar para rotar unidireccionalmente objetos de tamaño micrométrico en una película de cristal líquido.<sup>40</sup>

<sup>37</sup> N. Koumura, R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delden, N. Harada, B. L. Feringa. *Nature*. **1999**, 401 (6749), 152–155.

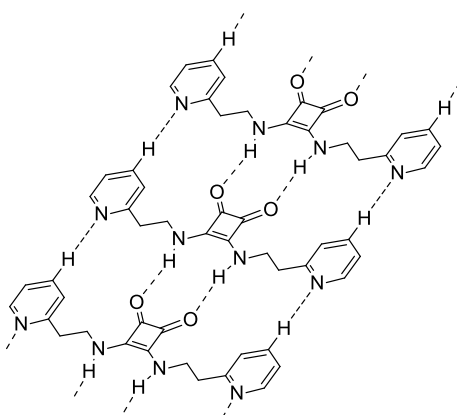
<sup>38</sup> J. Vachon, G. T. Carroll, M. M. Pollard, E. M. Mes, A. M. Brouwer, B. L. Feringa, K. Kinbara, T. Aida, P. D. Boyer, C. Leduc, et al. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, 13, 241–246.

<sup>39</sup> R. A. van Delden, M. K. J. ter Wiel, M. M. Pollard, J. Vicario, N. Koumura, B. L. Feringa. *Nature*. **2005**, 437 (7063), 1337–1340.

<sup>40</sup> R. Eelkema, M. M. Pollard, J. Vicario, N. Katsonis, B. S. Ramon, C. W. M. Bastiaansen, D. J. Broer, B. L. Feringa. *Nature*. **2006**, 440 (7081), 163–163.

## 1.4. Agregación de escuaramidas

Debido a la disposición en el espacio que presentan las escuaramidas y su gran capacidad para llevar a cabo enlaces de hidrógeno, es común la formación de agregados de tipo cabeza-cola a partir del confórmero Z/Z (Figura 1.17). Esta clase de agregados se observa por ejemplo en el empaquetamiento en estado sólido de la dibenzilescuaramida.<sup>41</sup> Si los grupos o cadenas unidos a la escuaramida son los adecuados, las interacciones favorables que puedan producirse entre ellos, combinadas con las interacciones entre unidades escuaramida, pueden dar lugar a agregados suficientemente estables y con la ordenación necesaria para formar cristales.

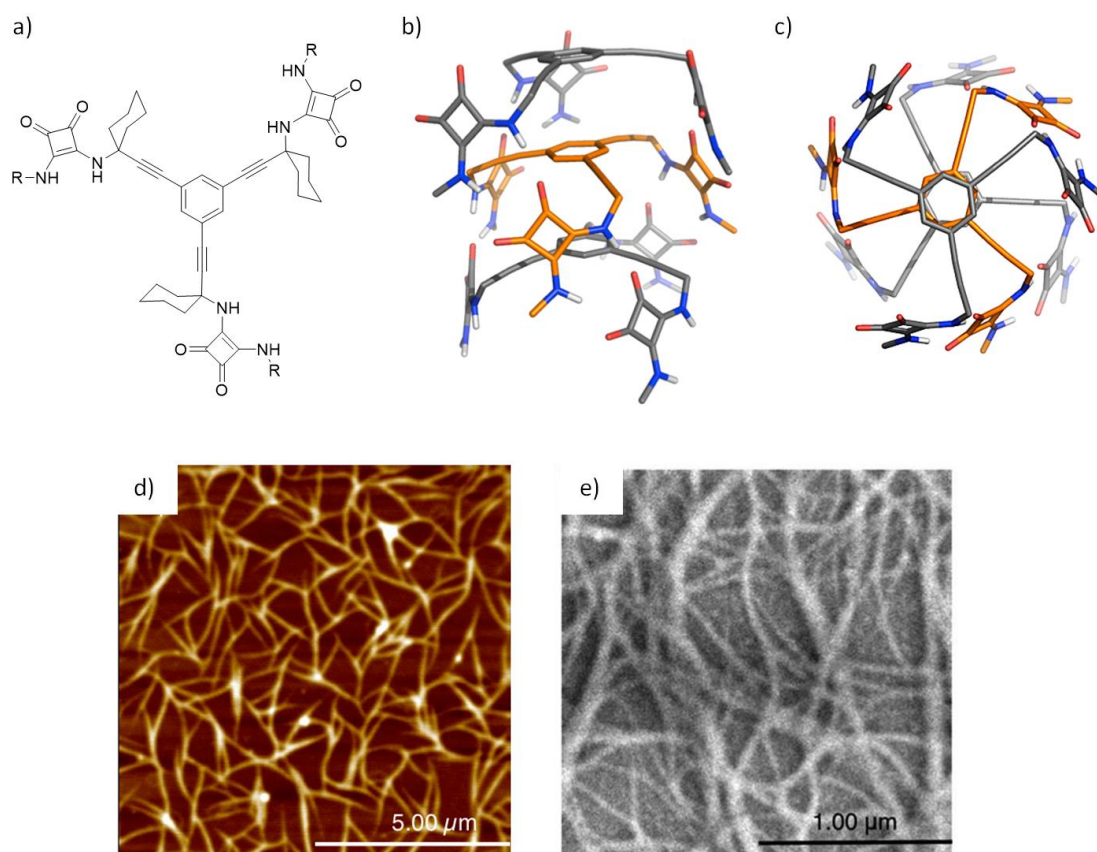


**Figura 1.17.** Agregados del tipo cabeza-cola habituales en escuaramidas secundarias.

Este tipo de interacción entre unidades de escuaramida es un factor clave que dirige el patrón de agregación en moléculas escuaramídicas más complejas. Uno de los últimos trabajos publicados sobre escuaramidas presenta una estructura tripodal con dos caras.<sup>42</sup> El receptor es capaz de reconocer cationes del tipo  $\text{NR}_4^+$  y, mediante giro, aniones trimesoato. Además, este receptor forma agregados de geometría helicoidal, apilándose moléculas de receptor una sobre otra alternando las cadenas laterales. La formación de estos agregados influye en la forma e intensidad con que interacciona con los substratos. Los puentes de hidrógeno entre las escuaramidas, así como las interacciones de apilamiento aromático o “stacking” entre los fenilos centrales, serían los que gobernarían la formación de agregados por apilamiento de una molécula sobre otra, para acabar en la formación de fibras (Figura 1.18).

<sup>41</sup> C. Rotger, B. Soberats, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, J. Benet-Buchholz, P. M. Ceyà, A. Costa. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 1864-1868

<sup>42</sup> B. Soberats, L. Martínez, E. Sanna, A. Sampedro, C. Rotger, A. Costa. *Chemistry-A European Journal*, **2012**, 18(24), 7533-7542.

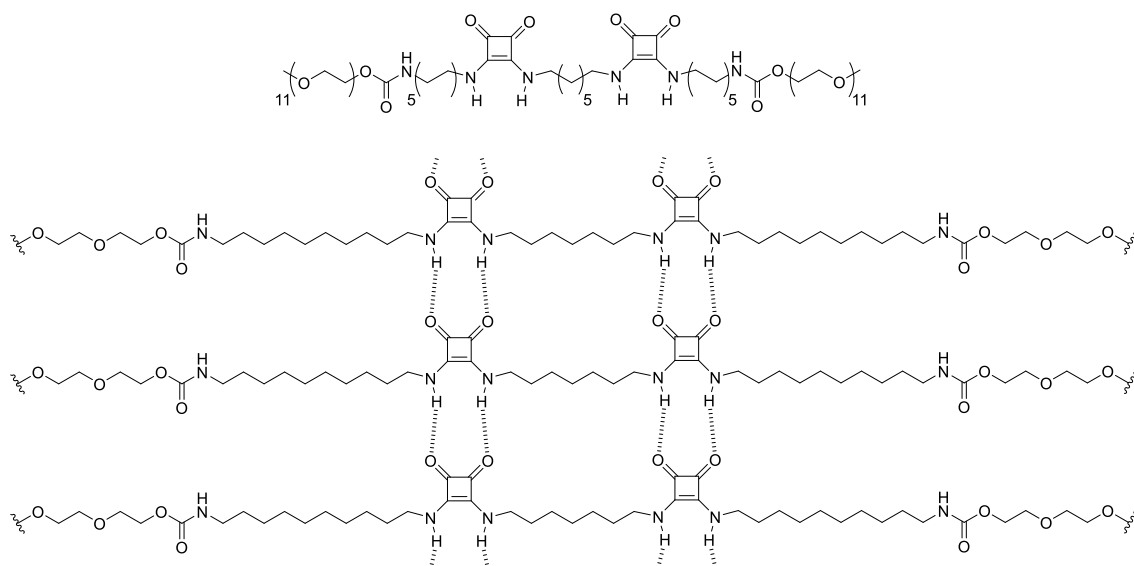


**Figura 1.18.** a) Estructura química de un receptor escuaramídico tripodal. (b,c) Vistas en perspectiva y axial de la estructura minimizada (MMFF) de un trímero de receptor. (d,e) Imágenes por AFM y SEM de la estructura de los agregados formados por el receptor obtenidas mediante la evaporación de una disolución de receptor  $5.0 \times 10^{-4}$  M en cloroformo.<sup>42</sup>

Otro ejemplo que resalta la capacidad de autoensamblaje de las escuaramidas es el polímero supramolecular formado a partir de un producto bolaanfílico, con dos unidades escuaramidas centrales (Figura 1.19).<sup>43</sup> La interacción por puentes de hidrógeno entre escuaramidas, unida al efecto hidrofóbico de las cadenas alifáticas, hace posible que en agua las moléculas se agreguen de forma cooperativa de tal manera que se formen fibras que son visibles mediante Cryo-TEM. Los autores proponen que la interacción aromática entre escuaramidas es un componente significativo en la energía de interacción total, lo que explica el aumento observado en la estabilidad termodinámica del polímero en relación con los monómeros por separado. Además, este efecto no puede conseguirse con grupos no aromáticos como ureas o amidas, comúnmente utilizadas para la construcción de polímeros supramoleculares.

<sup>43</sup> V. Saez Talens, P. Englebienne, T. T. Trinh, W. E. M. Noteborn, I. K. Voets, R. E. Kieltyka. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 10502–10506.



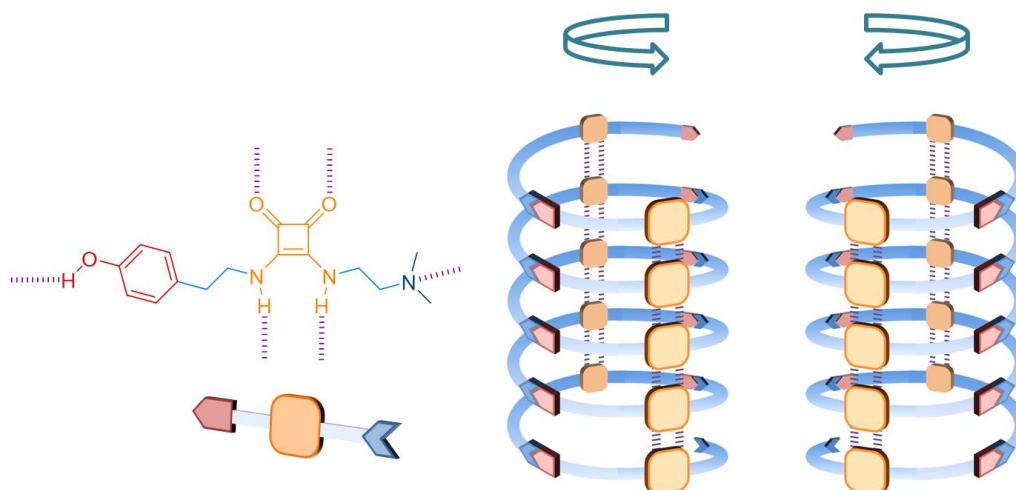


**Figura 1.19.** Estructura de un bolaanfílico con dos centros escuaramídicos con capacidad para autoensamblarse formando estructuras fibrilares.

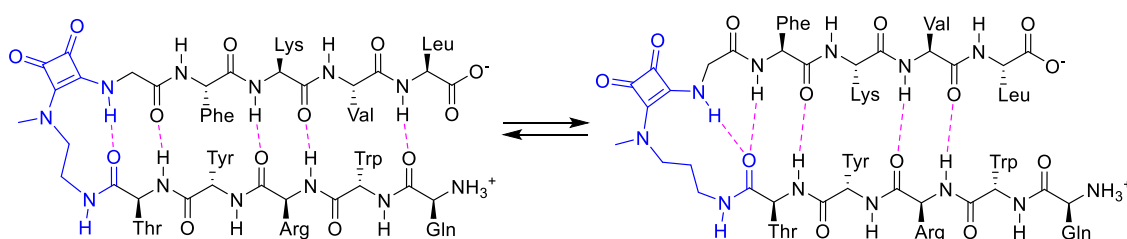
El mismo principio aplicado a pequeñas escuaramidas autocomplementarias da lugar a la formación de hélices.<sup>44</sup> La interacción por puentes de hidrógeno entre el grupo lateral de la primera molécula, una amina terciaria, con el otro grupo lateral de la siguiente molécula, un hidroxilo fenólico, produce la concatenación de los monómeros (Figura 1.20). La interacción cabeza-cola entre las escuaramidas centrales de cada monómero provoca el plegamiento de la cadena hacia la formación de una hélice.

Tal y como se muestra en los ejemplos hasta ahora expuestos, la conformación más habitual de las escuaramidas secundarias es la Z/Z, debido a la tendencia natural a autoagregarse unas con otras siguiendo los patrones de puentes de hidrógeno mostrados. Sin embargo, la conformación E/Z también puede tener lugar y, si esta conformación se estabiliza adecuadamente, puede convertirse en predominante. Esta característica se ha puesto de manifiesto en los trabajos publicados recientemente por el grupo de Química Supramolecular de la UIB. En concreto la sustitución de uno de los hidrógenos escuaramídicos por un grupo metilo favorece el cambio de conformación por formación de un enlace de hidrógeno de tipo CH $\cdots$ O intramolecular. De esta manera, se consigue la estabilización final de la conformación E/Z. Este fragmento se ha unido a dos cadenas peptídicas, sirviendo así como unidad de giro, de tal forma que imita la acción de la prolina en los giros  $\beta$ . El resultado por tanto es una estructura peptidomimética (Figura 1.21).

<sup>44</sup> A. Portell, R. Prohens. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 397–400.



**Figura 1.20.** A la izquierda, estructura de una escuaramida autocomplementaria y sus posibilidades de interacción. A la derecha, hélices formadas por agregación.



**Figura 1.21.** Representación del equilibrio conformacional de del peptidomimético con centro escuaramídico como unidad de giro  $\beta$ .

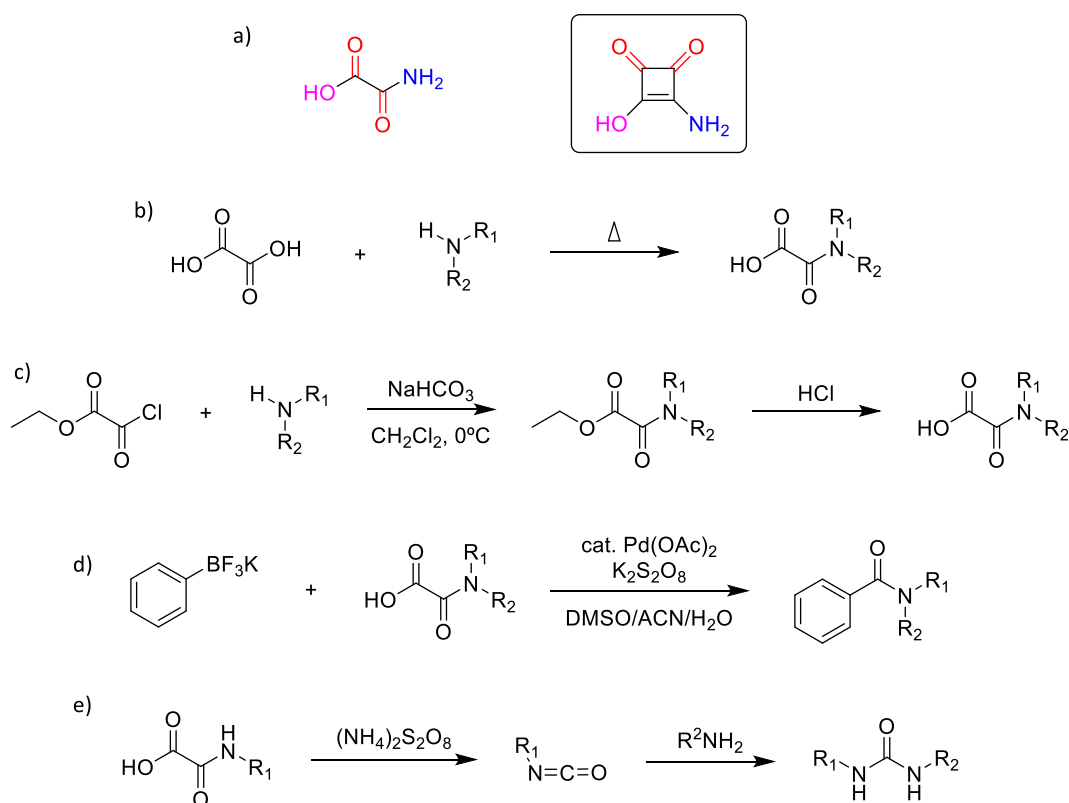
## 1.5. Ácidos oxámicos como alternativa estructural de los ácidos escuarámicos

El ácido oxálico es el diácido orgánico más simple, y está presente en multitud de seres vivos, incluyendo en humanos. De hecho, tanto el ácido oxálico como otros derivados  $\alpha$ -cetoácidos forman parte de muchas de nuestras rutas metabólicas. La sustitución de uno o de los dos hidroxilos por aminas da lugar a los ácidos oxámicos y las oxamidas respectivamente. Todo ello compone todo un conjunto de compuestos relacionados a los derivados del ácido escuárico en el sentido de que presentan dos grupos carbonílicos adyacentes. De hecho, algunas propiedades resultan similares al comparar análogos de ambas familias. Por ejemplo, el  $pK_a$  de la primera ionización del ácido oxálico es de 1.25, muy similar al del ácido escuárico ( $pK_{a1} = 1.5$ ).

La monocondensación de aminas con el ácido oxálico da lugar a los ácidos oxámicos, muy similares a los ácidos escuarámicos, objeto principal de esta Memoria, ya que presentan los

### 1.5. Ácidos oxámicos como alternativa estructural de los ácidos escuarámicos

mismos grupos funcionales (Figura 1.22a). Sin embargo, los ácidos oxámicos no presentan aromaticidad, lo que elimina la posibilidad de agregación por apilamiento aromático o "stacking", que sí se produce en el ácido escuarámico y sus derivados. Además, los grupos carbonilo del ácido oxálico y sus derivados se disponen de forma antiperiplanar, y no eclipsada como en los derivados del ácido escuarámico, lo que da lugar a patrones de agregación por enlace de hidrógeno de tipo donador-aceptor muy diferentes a los de los ácidos escuarámicos.



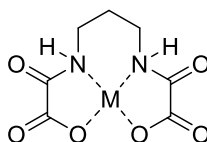
**Figura 1.22.** a) Estructura del ácido oxámico comparada con la del ácido escuarámico. b, c) Rutas sintéticas para la preparación de ácidos oxámicos. d) Uso de ácidos oxámicos para la síntesis de fenilamidas a partir de trifluorofenilborato potásico, y e) para la síntesis de ureas a partir de ácidos.

Los ácidos oxámicos, al tratarse de derivados de productos naturales, resultan mucho más conocidos, por lo que se han utilizado de forma mucho más recurrente. La elaboración de estos productos está perfectamente estudiada. Al no existir aromaticidad, el ácido oxálico puede tratarse desde un punto de vista sintético como un diácido, por lo que son válidas la mayoría de las rutas utilizadas para la funcionalización de ácidos carboxílicos. Comúnmente los ácidos oxámicos pueden prepararse a partir de la condensación directa de aminas y el ácido

oxálico (Figura 1.22b), o bien a partir del cloruro del ácido (Figura 1.22c).<sup>45</sup> A pesar de implicar más pasos sintéticos, el procedimiento más utilizado es el segundo, ya que con la reacción directa resulta difícil controlar la monoentrada de la amina y evitar la formación de la oxamida. Este hecho supone una diferencia clara en comparación a los ácidos escuarámicos, puesto que una segunda entrada de una amina para formar la escuaramida no se produce. Únicamente las aminas aromáticas dan productos de doble entrada, concretamente escuarainas.

Efectivamente, a pesar de presentar formalmente los mismos grupos funcionales, los ácidos oxámicos no presentan aromaticidad. Además, pueden sufrir reacciones de oxidación, lo que hace que se utilicen en muchos casos como productos intermedios para la obtención posterior de fenilamidas (Figura 1.22d)<sup>46</sup> o isocianatos (Figura 1.22e),<sup>45a</sup> por ejemplo.

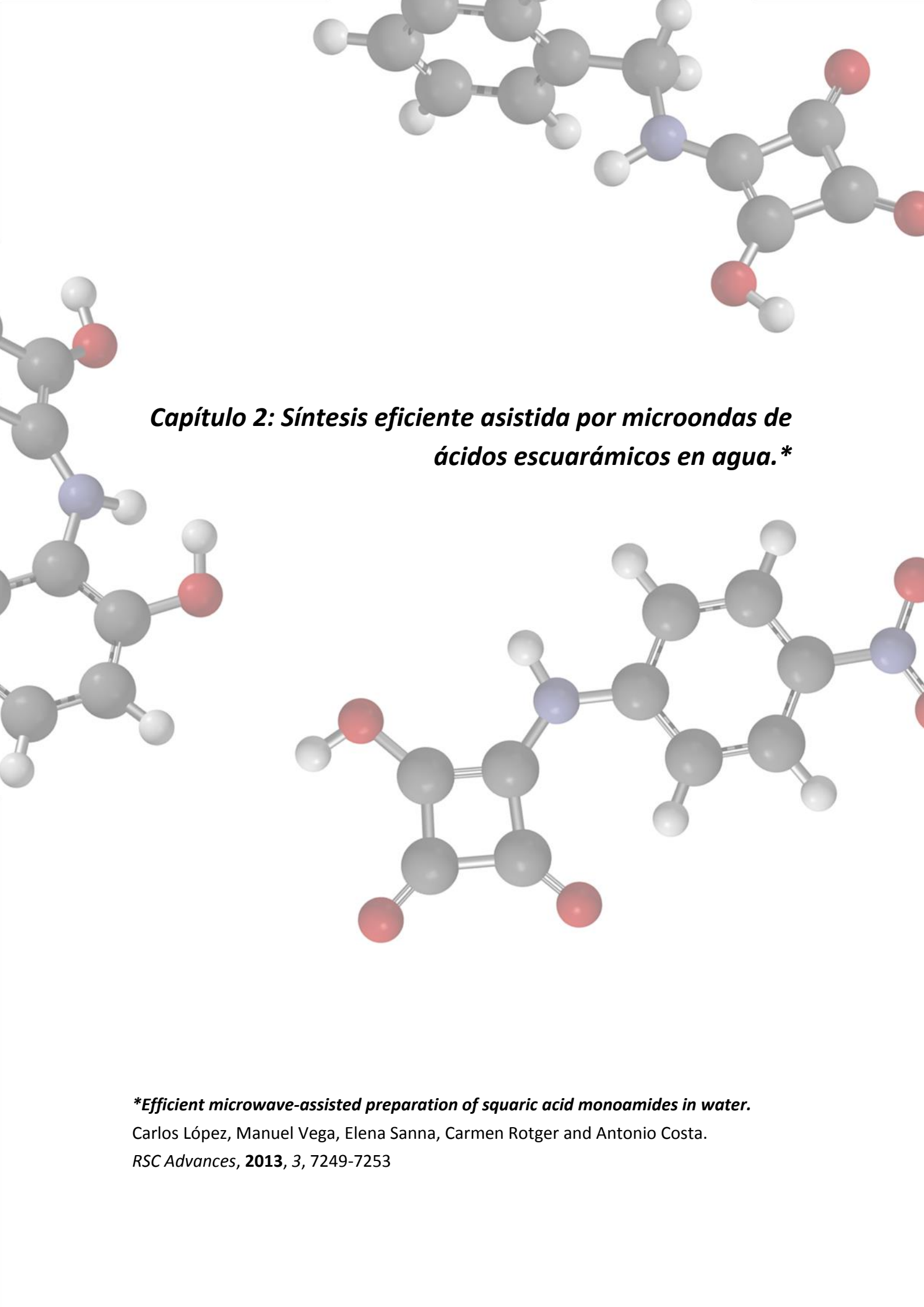
Los ácidos oxámicos son ampliamente utilizados como ligandos de metales de transición. En contraste con los derivados de ácido escuarámico, las estructuras de los ácidos oxámicos que actúan como ligandos admiten la reorientación de los grupos carbonilo. Ello facilita en muchos casos una mejor interacción con los metales, permitiendo a su vez la preparación de ligandos bidentados de pequeño tamaño. Todo ello da lugar a complejos donde la interacción del ligando con el metal es ciertamente distinta a la que presentan los complejos con ácidos escuarámicos, sobre los cuales se profundizará en el Capítulo 2.



**Figura 1.23.** a) Esquema de complejos de metales de transición con bisoxamatos como ligandos.

<sup>45</sup> (a) F. Minisci, F. Fontana, F. Coppa, Y. M. Yan, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5430–5433. (b) S. R. Choi, A. B. Beeler, A. Pradhan, E. B. Watkins, J. M. Rimoldi, B. Tekwani, M. A. Avery. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 292–300.

<sup>46</sup> M. Li, C. Wang, P. Fang, H. Ge, *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, *47*, 6587–9.



***Capítulo 2: Síntesis eficiente asistida por microondas de ácidos escuarámicos en agua.\****

***\*Efficient microwave-assisted preparation of squaric acid monoamides in water.***

Carlos López, Manuel Vega, Elena Sanna, Carmen Rotger and Antonio Costa.

*RSC Advances*, **2013**, 3, 7249-7253

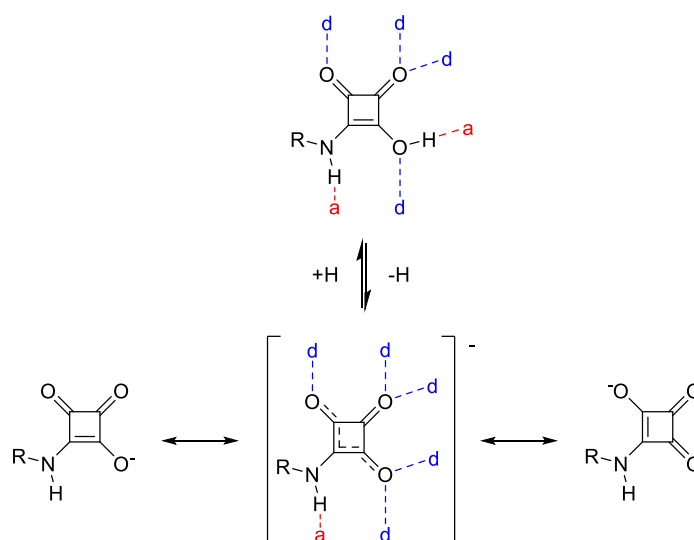


## 2.1. Introducción

### 2.1.1. Ácidos escuarámicos

Los ácidos escuarámicos, también llamados ácidos amidoescuarícos, y de aquí en adelante SQAs,<sup>47</sup> están constituidos por el mismo anillo de ciclobutendiona que las escuaramidas. Sin embargo, sólo uno de los hidroxilos se encuentra sustituido por una amina. De esta manera se mantienen la elevada acidez característica del ácido escuaríco original.

Los SQAs ofrecen nuevos patrones de enlace de hidrógeno (Figura 2.1) en comparación con los observados en escuaramidas (Figura 1.2), al mantener uno de los hidroxilos del ácido escuaríco precursor. En su forma ionizada, las posibilidades de interacción de los escuaramatos, de aquí en adelante SQMs,<sup>48</sup> con moléculas de agua incrementa su solubilidad en agua.

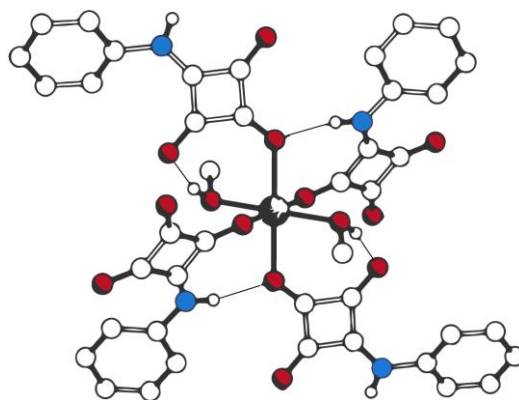


**Figura 2.1.** Esquema de ionización de los SQAs y representación de los patrones de formación de enlaces de hidrógeno de las distintas especies resultantes.

<sup>47</sup> Abreviatura utilizando las siglas del nombre que reciben en inglés, “squaric acid monoamides” (SQAs).

<sup>48</sup> Abreviatura utilizando las siglas del nombre que reciben en inglés, “squarate monoanion” (SQMs).

Los SQMs se han utilizado en varios trabajos como ligandos de una variedad de metales de transición.<sup>49</sup> La Figura 2.2 representa el esquema general de la formación de este tipo de complejos, repitiéndose el mismo patrón de interacciones para los distintos metales, sin apenas sufrir cambios cuando se modifica el grupo enlazado al nitrógeno escuarámico. Como se aprecia en la Figura 2.2, el enlace de coordinación con el metal puede tener lugar tanto con los oxígenos adyacentes al nitrógeno, equivalentes entre sí, como con el oxígeno opuesto. Los grupos NH aportan enlaces de hidrógeno que permiten la interacción entre ligandos próximos en el espacio, incrementando así la estabilidad de la estructura así como su ordenación, permitiendo en muchos casos la cristalización del compuesto.



**Figura 2.2.** Esquema del complejo polimérico de distintos metales de transición (Mn, Co, Cu y Zn) con fenilescuarinato como ligando.

De la misma manera que las escuaramidas se han utilizado como isómeros de distintos grupos funcionales, los SQAs o los SQMs, debido a sus características estructurales, se han utilizado como análogos de carboxilatos,<sup>50</sup> fosfatos<sup>51</sup> o incluso como biosíntesis de nucleótidos (Figura 2.3a).<sup>52</sup> Algunos de estos productos han mostrado actividad biológica. Tal es el caso del análogo fosfolípidídico de la Figura 2.3b, resistente a fosfolipasas, y que mantiene propiedades típicas de lípidos, como es la capacidad de formación de liposomas

<sup>49</sup> (a) B. D. Alleyne, L. S. Bernard, H. Jaggernauth, L. A. Hall, I. Baxter, A. J. P. White, D. J. Williams. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 3774–3778; (b) H.-A. Hosein, L. A. Hall, A. J. Lough, W. Desmarais, M. J. Vela, B. M. Foxman. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4184–4189; (c) P. M. T. Piggot, S. Seenarine, L. A. Hall. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5243–5251; (d) P. M. T. Piggot, L. A. Hall, A. J. P. White, D. J. Williams, L. K. Thompson. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 1167–1174.

<sup>50</sup> P. Lassalas, B. Gay, C. Lasfargeas, M. J. James, V. Tran, K. G. Vijayendran, K. R. Brunden, M. C. Kozlowski, C. J. Thomas, A. B. Smith, et al. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 3183–3203.

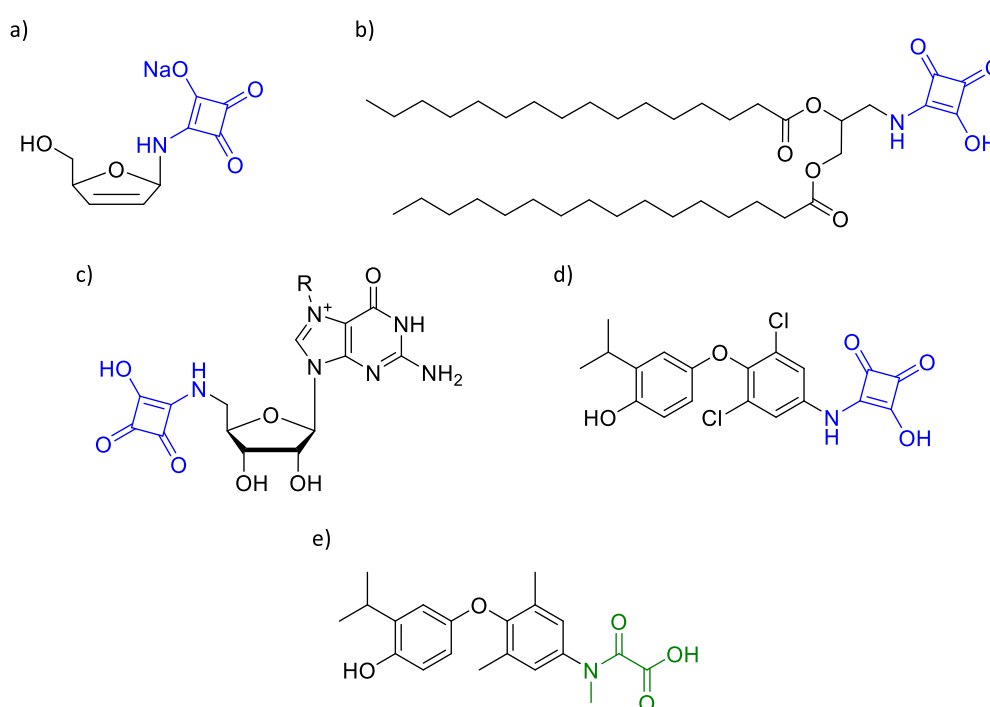
<sup>51</sup> (a) A. Saha, S. Panda, S. Paul, D. Manna. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9438–9441; (b) F. Soukarieh, M. W. Nowicki, A. Bastide, T. Pöyry, C. Jones, K. Dudek, G. Patwardhan, F. Meullenet, N. J. Oldham, M. D. Walkinshaw, et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 124, 200–217

<sup>52</sup> M. Lu, Q.-B. Lu, J. F. Honek. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 282–287.



estables en solución acuosa.<sup>51a</sup> Por otra parte, el ejemplo de la Figura 2.3c es un mimético de nucleótido con potencial anticancerígeno, al ser capaz de actuar como inhibidor del factor *eIF4E* de inicio de traducción de mRNAs oncogénicos.<sup>51b</sup>

A pesar de que la actividad de los compuestos mencionados en la mayoría de casos puede considerarse modesta, cabe destacar el ácido arilescurámico sintetizado por S. Raval y col.<sup>53</sup> (Figura 2.3d), que ha mostrado una elevada afinidad por el receptor  $\beta$  de la hormona tiroidea, mayor que otros productos sintetizados anteriormente para el mismo fin. Con un objetivo similar se ha descrito un compuesto muy parecido, en este caso derivado del ácido oxámico (Figura 2.3e),<sup>54</sup> lo cual concuerda con la similitud entre los dos grupos descrita en el Capítulo 1.



**Figura 2.3.** Ejemplos del uso de los SQAs o SQMs como bioisómeros de nucleótidos (a)<sup>52</sup> y del grupo fosfato (b, c).<sup>51</sup> d) SQA<sup>53</sup> y un análogo derivado del ácido oxámico (e)<sup>54</sup> con afinidad por el receptor  $\beta$  de la hormona tiroidea.

Con todo, desde las primeras publicaciones en las que se describe este tipo de compuestos en 1970,<sup>55</sup> y a pesar del potencial que presentan dadas sus características estructurales, son muy pocos los trabajos sobre este tipo de derivados de ácido escuárico. Una

<sup>53</sup> S. Raval, P. Raval, D. Bandyopadhyay, K. Soni, D. Yevale, D. Jogiya, H. Modi, A. Johrapurkar, N. Gandhi, M. R. Jain, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3919–3924.

<sup>54</sup> N. Yokoyama, G. N. Walker, A. J. Main, J. L. Stanton, M. M. Morrissey, C. Boehm, A. Engle, A. D. Neubert, J. M. Wasvary, Z. F. Stephan. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 695–707.

<sup>55</sup> J. Gauger, G. Manecke. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2696–2706.

de las principales dificultades a la hora de trabajar con ellos es la baja solubilidad que presentan. Debido a su elevada acidez en la mayoría de circunstancias se encontrarán en forma ionizada. Sin embargo la solubilidad en agua que puede aportar este grupo se contrarresta por la hidrofobicidad que presenta el resto de la molécula. Por otra parte, el anión SQM dificulta en gran medida la solubilidad de la molécula en disolventes orgánicos próticos y la imposibilita en disolventes apróticos.

### 2.1.1.1. Síntesis

La reacción directa entre ácido escuárico y aminas en metanol se ha descrito que rinde como único producto escuaráinas. En cambio, las mismas reacciones llevadas a cabo en DMF dan lugar a una mezcla de escuaráinas junto con pequeñas cantidades de escuaramidas y ácidos escuarámicos.<sup>55,56</sup> Si el disolvente utilizado es agua, con<sup>57</sup> o sin<sup>58</sup> catálisis ácidas se obtiene de forma significativa el ácido escuarámico. Así, hasta el momento la preparación de SQAs se ha llevado a cabo siguiendo principalmente dos rutas sintéticas distintas dependiendo de si la amina que se deseaba acoplar era aromática o alifática. Estos dos procedimientos se repiten en todos los trabajos mencionados hasta ahora (Esquema 2.1).

Si la amina requerida es alifática se lleva a cabo la síntesis del éster de alquilamidoescuarato a partir de la amina y un diéster del ácido escuárico. En una segunda etapa, la hidrólisis del éster da lugar al SQA deseado. Esta metodología no resulta en exceso compleja, pero implica la realización de dos pasos sintéticos con los correspondientes procesos de purificación. Para simplificar el método sería necesario poder llevar a cabo la condensación entre la amina y el ácido escuárico. Sin embargo, este procedimiento no se ha perfeccionado hasta la fecha debido principalmente a que, al estar compuesta la mezcla por un ácido y una base, ambas especies pierden reactividad en el intercambio protónico y producen la correspondiente sal amónica. Además, el ácido escuárico presenta escasa solubilidad en disolventes orgánicos, lo que obliga a llevar a cabo la reacción en agua, medio en el que no son solubles muchas aminas.

La metodología en dos etapas que se aplica a las aminas alifáticas no resulta viable con aminas aromáticas. Eso es debido a que el grupo amino de los derivados de anilina presenta una nucleofilia empobrecida en comparación con las aminas alquílicas. En 2010, Rostami y col. publicaron un método sintético que solventaba el problema mencionado con la adición a la

---

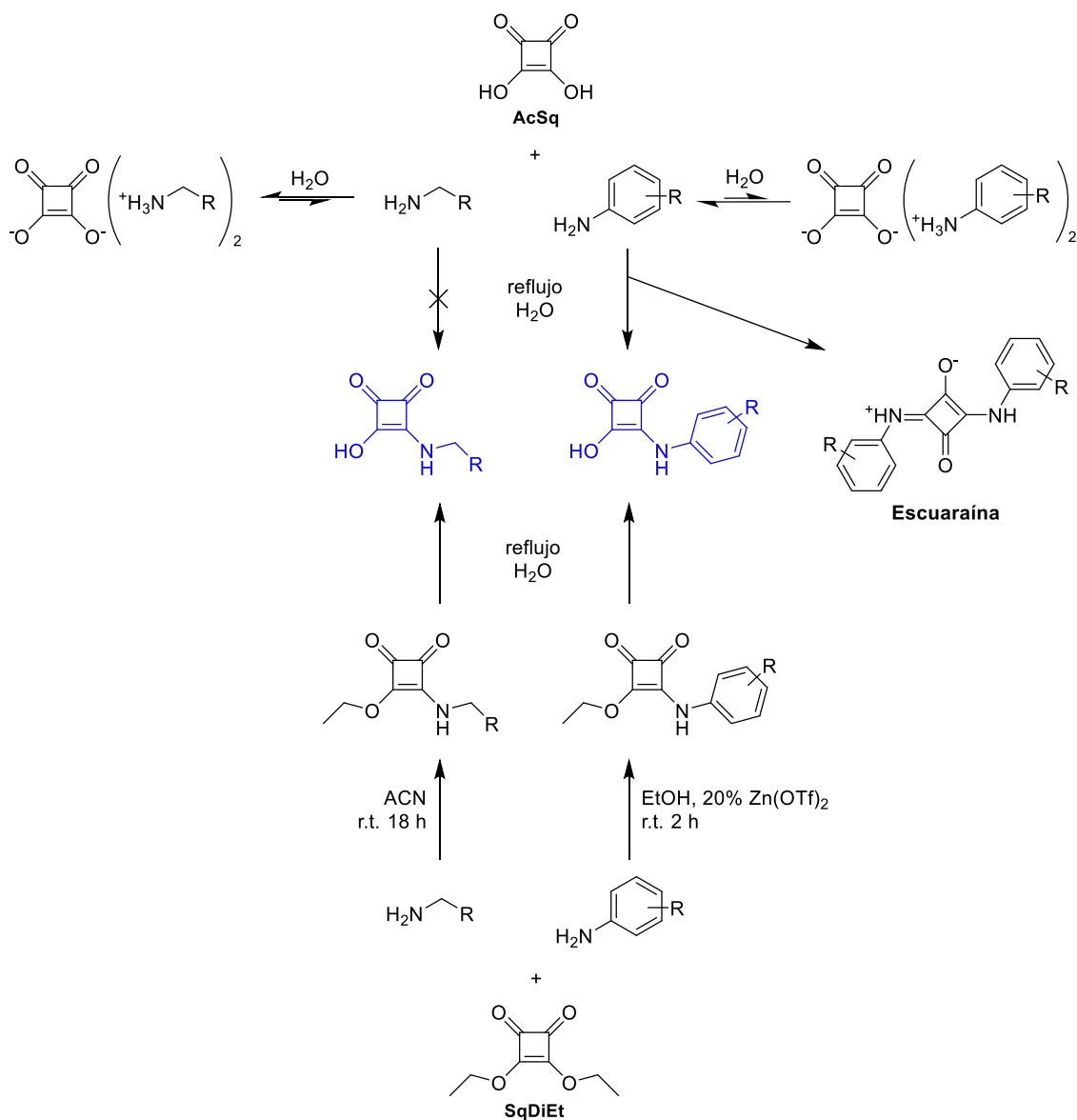
<sup>56</sup> (a) C. Prabhakar, K. Bhanuprakash, V. J. Rao, M. Balamuralikrishna, D. N. Rao. *J. Phys. Chem. C*, **2010**, *114*, 6077; (b) E. W. Neuse, B. R. Green. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3881-3887; (c) E. Neuse, B. Green, Justus Liebigs. *Ann. Chem.* **1973**, 633.

<sup>57</sup> (a) J. Li, H. Zhou, Y. Chen. *J. Sichuan Univ.* 1997, **34**, 833; (b) Y. Chen, J. Li, F. Huang, L. Chen. *Youji Huaxue*, 1998, **18**, 130.

<sup>58</sup> J. Xie, A. B. Comeau, C. T. Seto. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 83

mezcla de reacción de  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$  como catalizador.<sup>59</sup> Así, el amido-éster podría hidrolizarse siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado con aminas alifáticas.

**Esquema 2.1.** Esquema general de síntesis para la obtención de SQAs.



Por otra parte, en el caso de aminas aromáticas, la reacción directa con ácido escuárico sí que resulta factible. La diferencia radicaría en que la basicidad que presentan en comparación con las aminas alifáticas es menor. Sin embargo, el inconveniente de las distintas solubilidades de las especies implicadas en la reacción sigue existiendo. Además, este tipo de reacciones

<sup>59</sup> A. Rostami, A. Colin, X. Y. Li, M. G. Chudzinski, A. J. Lough, M. S. Taylor. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3983–3992.

puede conducir a escuarainas, productos de doble entrada con un elevado grado de aromaticidad. Este tipo de compuestos pueden resultar fluorescentes en algunos casos y suelen ser muy insolubles en general.<sup>60</sup>

Según lo expuesto anteriormente, el ácido escuárico y los SQAs se han utilizado como bioisómeros del grupo carboxilato dada su similitud estructural. Sin embargo, la reactividad entre ambos grupos funcionales es muy diferente. La reacción entre un ácido carboxílico y una amida no se produce sin la presencia de un agente de condensación adecuado. Sin embargo, tal y como se ha detallado en este apartado, las aminas aromáticas sí son capaces de reaccionar directamente con el ácido escuárico. Ello es debido a la adecuada electrofilia de los carbonos de las posiciones 3 y 4, por efecto de los grupos carbonilo de las posiciones 1 y 2 del ácido escuárico.

### 2.1.2. Síntesis asistida por microondas

#### 2.1.2.1. Características y ventajas

Los avances en química están ligados a la aparición de nuevos reactivos y nuevas formas de administrar energía a las reacciones químicas. Este es el caso de la utilización de radiación de microondas como fuente de energía. A partir de los experimentos realizados por Gedye<sup>61</sup> y Mejeticich y col.<sup>62</sup> se observó que era posible llevar a cabo reacciones orgánicas no sólo con agua, sino también con disolventes orgánicos, mediante calefacción dieléctrica por microondas, consiguiéndose una aceleración considerable de algunas reacciones. De esta manera se expandió rápidamente el uso del calentamiento dieléctrico por microondas a los campos de la química orgánica, inorgánica y organometálica. Actualmente se han desarrollado reactores de microondas cuya única finalidad es la de llevar a cabo síntesis químicas.

La región de microondas en el espectro electromagnético corresponde a las longitudes de onda de 1 cm hasta 1 m (de 30 GHz hasta 300 GHz). El rango de longitudes de onda que comprende de 1 a 25 cm se utiliza de manera extensa para radar y telecomunicaciones, por lo que, por acuerdo internacional sólo están permitidas las frecuencias de 2.45 GHz (21.2 cm) y 900 MHz (33.3 cm) para el calentamiento dieléctrico. Tanto los hornos de microondas domésticos y los comerciales para aplicaciones químicas operan por lo general a 2.45 GHz.

La radiación de microondas acelera el movimiento rotacional de las moléculas que tengan un momento dipolar permanente. Las moléculas alteradas por la radiación perturban a su vez

---

<sup>60</sup> Y. Imai, M. Shiratori, T. Inoue, M. A. Kakimoto. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2648–2655.

<sup>61</sup> R. Gedye, F. Smith, K. Westway, H. Ali, L. Balderisa, L. Laberge, J. Roasell. *Tet. Lett.* **1986**, *27*, 279.

<sup>62</sup> R. J. Giguere, T. L. Bray, S. N. Duncan, G. Majeticich. *Tet. Lett.*, **1986**, *28*, 4945.

los modos de rotación y translación de las moléculas vecinas unidas mediante fuerzas intermoleculares. Si las interacciones entre moléculas son enlaces de hidrógeno o fuerzas dipolo-dipolo fuertes, la perturbación se propagará con más intensidad. En disolución, la interacción entre la radiación de microondas y la solución de moléculas polares se describe adecuadamente utilizando modelos de mecánica clásica.

Las diferencias en el proceso de calentamiento usando microondas en comparación con los métodos de calentamiento convencional aportan ventajas al uso de los reactores de microondas a la hora de llevar a cabo síntesis. Estas ventajas son las que se exponen a continuación:

- La radiación de microondas, al incidir un medio de reacción cerrado con al menos un componente permeable a la radiación, produce ratios de calentamiento, de  $2-4\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ , mucho más elevados que los que se obtienen calentando convencionalmente. Un ratio similar solo sería asumible utilizando un baño de arena a más de  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- En un reactor de microondas, la fuente de radiación no se encuentra en contacto con el recipiente que contiene la mezcla de reacción. Este hecho, junto con la naturaleza del calentamiento por microondas y junto con lo mencionado en el punto (1), permite la obtención de rampas de temperatura mucho más pronunciadas; tanto el calentamiento como el enfriamiento se producen mucho más rápido de lo habitual, proporcionando un control sobre los productos que se forman.
- El fenómeno de la ebullición es un proceso tanto cinético como termodinámico, por lo que los disolventes calentados por microondas en un vial cerrado hierven a temperaturas superiores que las que presentan en condiciones normales, provocando por otra parte un aumento en la presión y por tanto una aceleración en la reacción. Por ejemplo, el etanol, con un punto de ebullición a presión atmosférica de  $79\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cuando se calienta dieléctricamente con microondas hierve a  $164\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a una presión de  $12\text{ atm}$ .

Actualmente, muchas síntesis orgánicas que requieren un suministro de energía se han optimizado por microondas,<sup>63</sup> consiguiendo disminuciones significativas de los tiempos de reacción y mejoras en los rendimientos.

Los parámetros a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo una síntesis asistida por microondas son fundamentalmente cuatro: tiempo de reacción, temperatura, presión del sistema y potencia del reactor. Los tres últimos parámetros están relacionados entre sí, de manera que, habitualmente, cuando se describe un procedimiento de este tipo sólo se especifica uno de ellos.

---

<sup>63</sup> P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9225-9283.

La mayoría de los trabajos que se encuentran publicados hasta poco después del año 2000 utilizan hornos de microondas de uso doméstico. De esta forma sólo se podía modificar la potencia del horno y el tiempo de reacción. La temperatura alcanzada únicamente era medible, no controlable, y la presión resultaba desconocida. Además, al no estar diseñados los hornos para este tipo de aplicaciones, en la mayoría de casos el medio de reacción no llegaba a superar los 150 °C. En la actualidad, los reactores de microondas permiten la modificación de cualquiera de los parámetros explicados, siendo más común trabajar con modificaciones de tiempos de reacción y temperatura, por analogía con los métodos clásicos de síntesis.

### 2.1.2.2. Síntesis de derivados de ácido escuárico asistida por microondas.

En este capítulo se describe la síntesis asistida por microondas de ácidos escuarámicos (SQAs) a partir de anilinas o bencilaminas y ácido escuárico. Este tipo de reacción requiere condiciones energéticas elevadas y tiempos largos de reacción, por lo que el calentamiento dieléctrico asistido por microondas puede ser un método adecuado para mejorar la eficiencia de la síntesis.

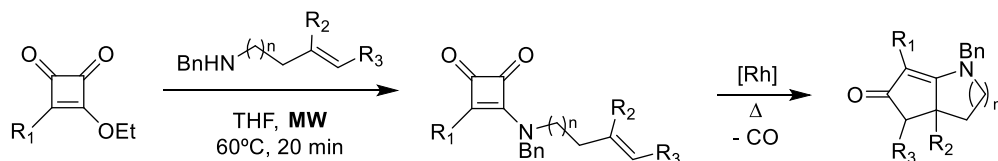


**Figura 2.4.** Reactor de microondas *Initiator* (Biotage®) utilizado para el trabajo expuesto en esta tesis.

Aún a pesar de no haberse realizado la síntesis por microondas de ácidos amidoescuáricos hasta ahora, pueden encontrarse en la bibliografía trabajos en los que se ha utilizado la activación por microondas para la obtención de otros derivados del ácido escuárico, principalmente escuaramidas. Un ejemplo de ello es el trabajo publicado por Yamamoto y col.<sup>64</sup> en el que sintetizan escuaramidas a partir de las cuales obtienen azabicycloalquenonas (Esquema 2.2).

<sup>64</sup> Y. Yamamoto, S. Kuwabara, H. Hayashi, H. Nishiyama. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2493 – 2500

**Esquema 2.2.** Síntesis de azabicicloalquenos a partir de escuaramidas realizada por Yamamoto y col.<sup>64</sup>



### 2.1.2.3. Síntesis de amidas asistida por microondas

El ácido escuárico y sus derivados tienen una gran utilidad para el diseño de bioisómeros del grupo amida. A pesar de que la síntesis de ambas familias pueda resultar muy diferente, los ejemplos de síntesis de amidas asistida por microondas ya descritos pueden servir como punto de partida para la optimización de unas condiciones de síntesis adecuadas para la elaboración de ácidos escuarámicos.

**Tabla 2.1.** Métodos de síntesis de amidas asistida por microondas a partir de ácido acético y aminas aromáticas y alifáticas.

Amina	Catalizador	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)
	-	6 - 8	150	67-98
	-	6 - 8	150	33-48
	Starbon®-400-SO <sub>3</sub> H	2 - 5	130	87-99
	Starbon®-400-SO <sub>3</sub> H	15	130	67-82

GD: grupo donador de electrones. GA: grupo atractor de electrones.

En la Tabla 2.1 se recogen algunos resultados descritos de la síntesis de amidas con asistencia de calentamiento dieléctrico en presencia<sup>65</sup> o ausencia<sup>66</sup> de catalizador. Como puede

<sup>65</sup> R. Luque, V. Budarin, J. H. Clark, D. J. Macquarrie. *Green Chem.* **2009**, *11*, 459.

## Capítulo 2

verse en la tabla, los rendimientos disminuyen cuando se hacen reaccionar anilinas sustituidas con grupos electroattractores, dado que en éstas el nitrógeno es menos nucleófilo. En el caso de aminas alifáticas el rendimiento es también menor debido a la mayor basicidad que presentan, protonándose casi cuantitativamente en presencia del ácido acético, con lo que ambas especies pierden gran parte de su reactividad. Todo ello ocurre de igual manera en la síntesis de SQAs, tal y como se explica en el Capítulo 1 y como se verá en el siguiente apartado.

---

<sup>66</sup> X. J. Wang, Q. Yang, F. Liu, Q. D. You. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 1028–1035.



## 2.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es el desarrollo de un método eficiente de síntesis de ácidos escuarámicos basado en la asistencia de calentamiento dieléctrico. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

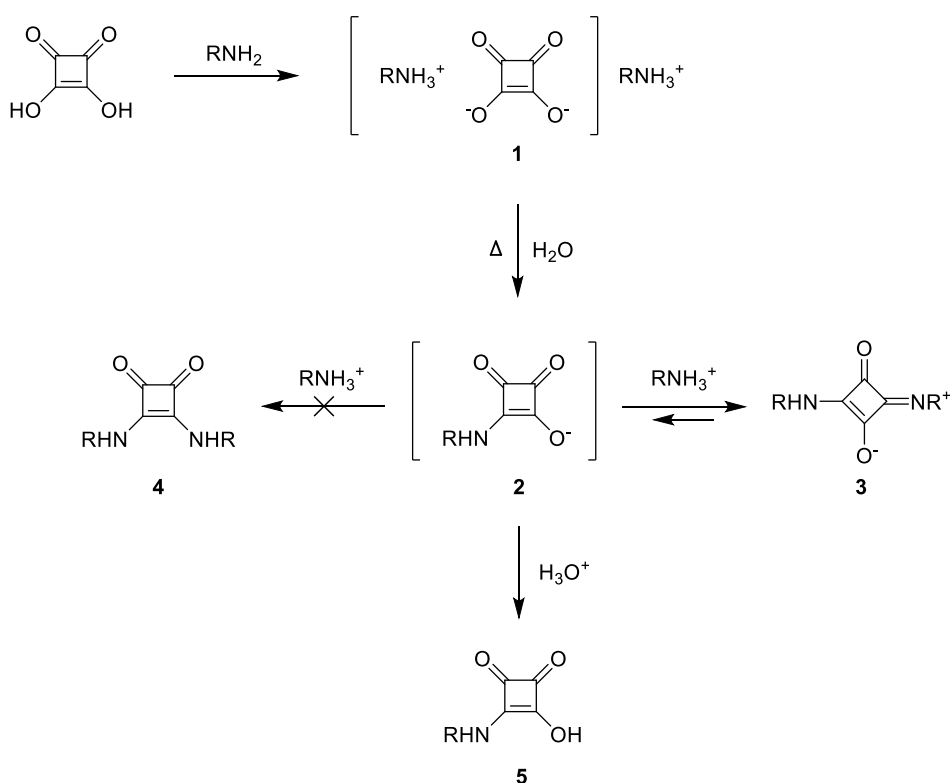
- En primer lugar, se sintetizarán mediante calentamiento dieléctrico por microondas un conjunto de ácidos escuarámicos, a partir de aminas alifáticas y aromáticas sustituidas con grupos funcionales diferentes. Se optimizarán las condiciones de tiempo y temperatura de reacción para cada producto, de manera que pueda definirse el efecto producido por los distintos grupos funcionales en los requerimientos energéticos de la reacción.
- Como parte del estudio, se determinarán los valores de las constantes de ionización de los ácidos escuarámicos más representativos, hasta ahora desconocidos.



## 2.3. Resultados y discusión

En este trabajo se ha aprovechado la ventaja que proporciona el calentamiento dieléctrico para sintetizar ácidos escuarámicos (SQAs) de forma expeditiva mediante la condensación directa asistida por microondas de ácido escuárico con aminas primarias en agua (Esquema 2.3). Teniendo en cuenta la gran acidez del ácido escuárico, al combinarse con la amina correspondiente da lugar a la sal intermedia de escuarato de amonio o anilinio **1**.<sup>56</sup> Estas sales orgánicas se comportan como agregados de pares iónicos que permanecen en suspensión dentro del poco volumen de agua utilizado. Todo ello compone un escenario idóneo para la utilización del calentamiento dieléctrico asistido por microondas, beneficiándose así tanto de su elevada eficiencia como del efecto de aceleración de la reacción al utilizar agua como disolvente.<sup>67,68</sup>

Esquema 2.3. Síntesis de ácidos escuarámicos llevada a cabo en agua.

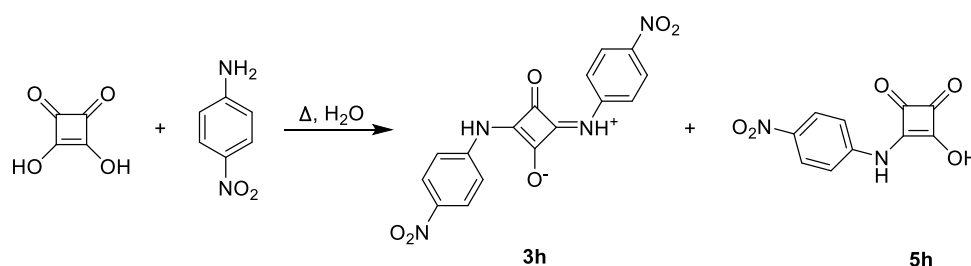


<sup>67</sup> (a) S. Narayan, J. Muldoon, M. G. Finn, V. V. Fokin, H. C. Kolb, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 3275; (b) B. Soberats, L. Martínez, M. Vega, C. Rotger, A. Costa, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1727.

<sup>68</sup> Las reacciones se han llevado a cabo en la escala de 1.0 mmol en 1.5 mL de agua.

Como primer ejemplo de las mejoras que ofrece este método sintético, la reacción entre la anilina y el ácido escuárico en agua con una relación molar de 2:1, calentando a 120°C mediante irradiación de microondas durante 15 minutos, da lugar a la formación del ácido **5a** con un rendimiento del 83%. La misma reacción llevada a cabo con un reflujo convencional durante 3 horas tan solo aporta un 46% de rendimiento (Tabla 2.2, reacción 1).

**Tabla 2.2.** Efecto de las condiciones de reacción en la condensación de p-nitroanilina con ácido escuárico.<sup>a</sup>



Reacción	Ratio molar <sup>b</sup>	Aditivo	3h (%) <sup>c</sup>	5h (%) <sup>c</sup>
1	2	-	87	12
2	1	-	44	50
3	0.5	-	22	74
4	0.3	-	5	89
5	0.2	-	<5	90
6	0.5	NaOH (2 mmol)	0	4
7	0.5	TEACl (1.5 mmol)	22	38
8	0.5	AcOH (2.5 mmol)	84	11

<sup>a</sup> Reacciones a escala de 1 mmol asistidas por microondas en un sistema cerrado a 120°C durante 30 min, repitiendo cada reacción tres veces. <sup>b</sup> Amina/ácido escuárico.

<sup>c</sup> Mediana de los rendimientos de producto aislado.

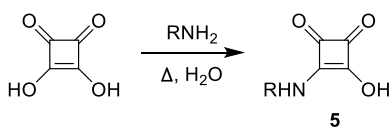
La condensación entre el ácido escuárico ( $pK_{a1} = 1.54$ ;  $pK_{a2} = 3.48$ ) y la nitroanilina ( $pK_a = 0.98$ ) se ha tomado como reacción modelo. Los resultados obtenidos en función de las condiciones de síntesis utilizadas se resumen en la Tabla 2.2. En medio acuoso, la formación de los productos **3** y **5** se produce de forma competitiva, y la proporción relativa de ambos compuestos depende de las condiciones experimentales. Sin embargo, la formación de la escuaraina **3** es parcialmente reversible.<sup>57b</sup> La existencia de este equilibrio se demuestra al calentar una disolución de **3** en agua en presencia de un equivalente de ácido escuárico. Así, siguiendo el procedimiento experimental habitual se observa la formación de mezclas que contienen **5** y **3** en proporciones variables dependiendo de la relación amina-ácido escuárico. Este resultado concuerda con el efecto favorable que produce la adición de un exceso de ácido

escuárico en el rendimiento de final de **5h** obtenido con la *p*-nitroanilina (Tabla 2.2, reacción 1-5). Además, el uso de un exceso de ácido escuárico sobre la amina no sólo favorece la formación del par iónico de escuarato de monoanilinio y por tanto del subsiguiente producto de monocondensación, sino que también desplaza el equilibrio competitivo que conduce a la escuaraína **3h** hacia la formación del SQA **5h**. Este efecto se observa de forma generalizada en otros productos, y en algunos casos se establece una clara relación entre la relación amina/ácido escuárico y los rendimientos de obtención de SQAs **5** (Tabla 2.3, reacciones 4, 5, 9, y 12).

Por otra parte, además de la condensación previamente descrita de la sal aislada de escuarato de anilinio a 200°C,<sup>49d</sup> se han encontrado nuevas evidencias que indican que este tipo de condensación entre ácido escuárico y anilina requiere la formación previa de pares iónicos. En primer lugar, en la mezcla inicial de 4-nitroanilina y ácido escuárico, la destrucción del par iónico por la adición de dos moles de hidróxido sódico por mol de ácido escuárico inhibe casi completamente la reacción de condensación, obteniéndose una cantidad despreciable de **5h** junto con la amina sin reaccionar (Tabla 2.2, reacción 6). En segundo lugar, la reducción de la concentración activa de par iónico mediante la adición de cloruro de tetrametilamonio como formador de pares iónicos no activos redujo de forma significativa el rendimiento de obtención de **5h** de un 77 a un 38% (Tabla 2.2, reacción 8). En tercer lugar, y siguiendo el razonamiento anterior, la adición de ácido acético como anión competitivo da lugar a la obtención de la escuaraína **3h** con un rendimiento del 89%, junto con un 13% del ácido escuarámico **5h** (Tabla 2.2, reacción 8).

Con el objetivo de estudiar las posibilidades y limitaciones de este método de síntesis, se ha llevado a cabo la condensación de ácido escuárico con una serie de anilinas sustituidas y aminas alifáticas, estableciendo en cada caso las condiciones óptimas de tiempo, temperatura y relación molar de los reactivos. Así, las reacciones llevadas a cabo con la asistencia de calentamiento dieléctrico por microondas utilizando anilinas con grupos donadores de electrones, tales como Me<sub>2</sub>N, HO y MeO (Tabla 2.3, reacciones 1-6), y grupos atractores como I, F, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>Et, SO<sub>3</sub>H (Tabla 2.2, reacción 5 y Tabla 2.3, reacciones 7-10), presentes en posiciones variables del anillo, han dado buenos resultados, obteniéndose los correspondientes SQAs **5** con rendimientos moderados en unos casos y excelentes en otros. Los productos se han purificado en la mayoría de casos mediante extracciones del crudo de reacción obtenido para así eliminar reactivos sin reaccionar o en exceso. Asimismo, se ha observado que la formación de escuaraínas **3** depende en gran medida de la temperatura de reacción. Además de las reacciones descritas en la Tabla 2.2, en el conjunto de experimentos indicados en la Tabla 2.3 sólo se ha detectado la formación de la escuaraína en la síntesis del ácido **5k** (reacción 10) con un rendimiento del 10%. Asimismo, cabe resaltar que en ningún caso se ha observado la formación de escuaramidas **4** como productos de doble entrada.

Tabla 2.3. Síntesis asistida por microondas de SQAs 5.<sup>a</sup>



Reacción	Amina; R=	tiempo / min	Temp. / °C	SQA	ratio molar <sup>b</sup>	Rendimiento / % <sup>c</sup>
1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	15	120	<b>5a</b>	2	83
2	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub>	30	120	<b>5b</b>	0.5	64
3	p-Me <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	20	150	<b>5c</b>	2	66
					0.5	56
4	p-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	15	130	<b>5d</b>	2	55
					0.5	74
					0.2	82
5	o-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	15	130	<b>5e</b>	2	48
					1	53
					0.5	78
6	8-AQ <sup>d</sup>	15	120	<b>5f</b>	1	95
7	2-MeO-5-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	30	120	<b>5g</b>	2	63
8	p-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	20	120	<b>5i</b>	2	58
9	C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	40	120	<b>5j</b>	2	37
					1	27
10	p-EtO <sub>2</sub> CC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	20	120	<b>5k<sup>e</sup></b>	2	55
					0.5	73
					0.3	83
11	p-HO <sub>3</sub> SC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	30	120	<b>5l<sup>e</sup></b>	0.5	70
12	p-H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	20	120	<b>5m</b>	2	40
					0.8	85
					0.6	92
13	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	20	200	<b>5n</b>	2	60
					1	26
14	p-IC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	20	200	<b>5o</b>	2	51
					1	36
15	3,4,5-triMeOC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	50	200	<b>5p</b>	2	58
16	nBu	60	200	<b>5q</b>	3	30

<sup>a</sup> Ver Información en la Sección Experimental. <sup>b</sup> Amina/ácido escuárico. <sup>c</sup> Rendimiento de los productos aislados espectroscópicamente puros. <sup>d</sup> 8-aminoquinoleína. <sup>e</sup> La escuaraina **3** se ha obtenido con un 10% de rendimiento, ver texto.

En términos generales, las reacciones con anilinas se han llevado a cabo entre 120 y 150°C durante 15-30 minutos, con relaciones molares de amina sobre ácido escuárico entre 2 y 0.2. La reacción con 2,4-dinitroanilina, fuertemente desactivada ( $pK_a = -4.4$ ), con una relación molar de 0.2 dio lugar al correspondiente SQA **5** con tan solo un 18% de rendimiento, demasiado bajo para poder utilizarse de forma práctica. En este caso, el bajo rendimiento se puede atribuir a una combinación de factores: por una parte la débil basicidad de esta anilina, que inhibe la formación del par iónico activo, y por otro lado su baja nucleofilia.

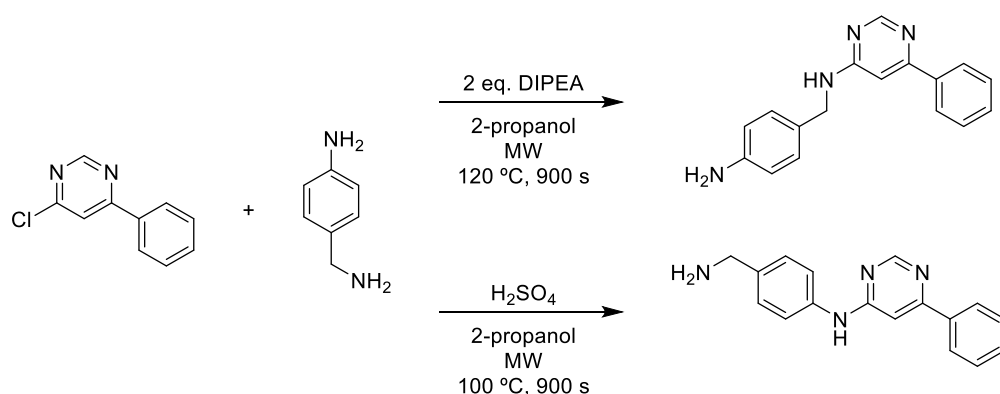
Al utilizar aminas más básicas, sin embargo, queda patente que la formación del par iónico no es el único requisito para llevar a cabo este tipo de reacciones. En el caso de aminas alifáticas, y teniendo en cuenta la diferencia de  $pK_a$  entre el ácido escuárico y la amina, la formación del par iónico con el ácido escuárico en agua es completa. Sin embargo, las sales de amonio resultantes no reaccionan mediante calentamiento convencional a reflujo, ni siquiera tras tiempos prolongados. Con la asistencia de microondas, estas reacciones tienen lugar únicamente utilizando un exceso de amina a altas temperaturas, obteniéndose así los SQAs de **5n** a **5q** con rendimientos moderados del 30 al 60% (Tabla 2.3, reacciones 13-16). En este caso, el exceso de amina adicionado es necesario para mantener la concentración necesaria de amina nucleófila. Afortunadamente, a pesar de las altas temperaturas utilizadas, los SQAs han sido los únicos productos obtenidos junto con el exceso de amina sin reaccionar. Los intentos de llevar a cabo la condensación con aminas alifáticas térmicamente lábiles han sido insatisfactorios. Los ensayos realizados con aminoácidos desprotegidos a 200°C han dado lugar a una mezcla inseparable de SQAs con otros productos derivados de la descomposición térmica de los propios aminoácidos.<sup>69</sup>

Las diferencias de reactividad observadas entre aminas aromáticas y alifáticas han permitido llevar a cabo reacciones quimioselectivas. Por ejemplo, la 4-aminometilanilina conduce al correspondiente ácido **5m** con un rendimiento excelente (Tabla 2.3, reacción 12). En este caso, la amina alifática permanece totalmente bloqueada al protonarse *in situ*, mientras que la amina aromática actúa libremente como nucleófila. Un caso similar de funcionalización preferente de una amina aromática frente a una alifática ocurre en la aminación asistida por microondas de cloropirimidinas con 4-aminometilanilina (Esquema 2.4).<sup>70</sup>

<sup>69</sup> M. Sohn, Ch-T. Ho. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 3001.

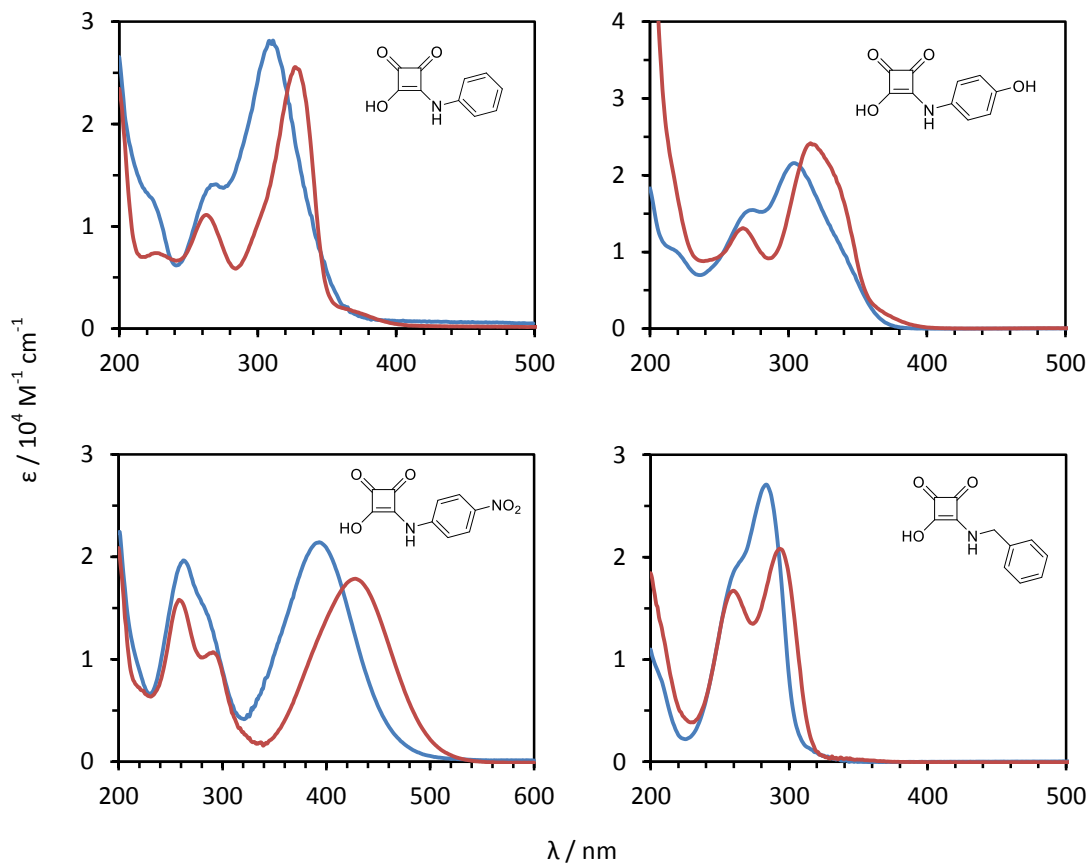
<sup>70</sup> C. G. Hartung, A. C. Backes, B. Felber, A. Missio, A. Philipp. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10055.

Esquema 2.4. Aminación selectiva de 4-cloro-6-fenilpirimidina con 4-aminometilanilina.



Los SQAs presentan grupos OH y NH que pueden interaccionar con grupos aceptores de enlace de hidrógeno, pudiendo actuar por ejemplo como catalizadores supramoleculares. Además, los SQAs son ácidos relativamente fuertes y potencialmente útiles como ligandos para la formación de complejos metálicos. En ambos casos, el conocimiento de sus constantes de ionización es clave para el mejor entendimiento de estas propiedades. Sin embargo, el valor de estas constantes ha sido hasta ahora desconocida. Por ello, el comportamiento como ácidos/bases de Brønsted se ha investigado utilizando un método espectrofotométrico (Figura 2.5). En el espectro de UV-vis de los SQAs **5n-5q** obtenidos a partir de aminas alifáticas se observa una banda intensa característica ( $\log \epsilon = 4.2 - 4.6$ ) en la región de 278 - 288 nm. En el caso de SQAs derivados de aminas aromáticas, esta banda de absorción CT se desplaza hacia la región del rojo debido a la conjugación  $\pi$  del anillo aromático extendida con el anillo del escuaramato. Además, los espectros de estos SQAs muestran solvatocromismo, evidenciado por el desplazamiento hipsocrómico ( $\Delta\lambda = -11$  a  $-35$  nm) de la banda ancha de transferencia de carga al incrementar la polaridad del disolvente desde acetonitrilo a agua (Figura 2.5 y Figura E2.1). Este efecto se produce tanto en SQAs derivados de aminas alifáticas como aromáticas, independientemente de la naturaleza electrodonadora o electroattractora del sustituyente del anillo.

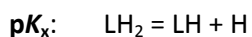
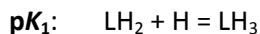




**Figura 2.5.** Espectros de UV-vis de los ácidos escuarámicos **5a**, **5d**, **5h** y **5n** en agua (línea azul) y MeCN (línea roja).

Las valoraciones ácido-base de varios SQAs representativos, llevadas a cabo mediante espectroscopia de UV-vis en agua y cubriendo un rango de pH de 1 a 13, muestran la existencia de varios equilibrios de ionización. El análisis de los datos de absorción en función del pH se ha realizado mediante el software HypSpec (Figura 2.6 y Figura E2.2 – E2.6),<sup>71</sup> ajustándose a los equilibrios de protonación siguientes:

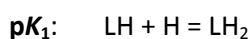
Con sustituyentes ionizables:



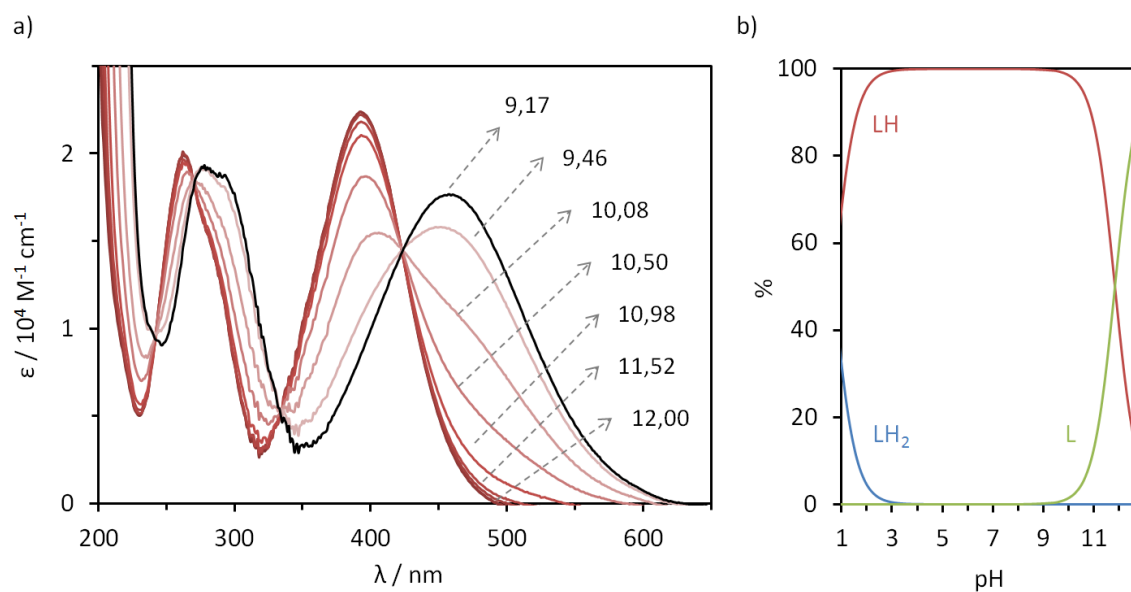
<sup>71</sup> HypSpec 2008 program (Protonic Software. <http://www.hyperquad.co.uk>); (a) C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi, A. Vacca. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 374; (b) C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, S. Ghelli. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1041.

donde  $LH_3$  = ácido escuarámico totalmente protonado  
 $LH_2$  = primera ionización (pérdida del protón escuárico)  
 $LH$  = segunda ionización (pérdida del protón del sustituyente)  
 $L$  = tercera ionización (pérdida del protón escuaramídico)

Sin sustituyentes protonables:



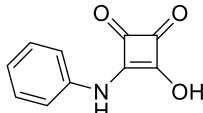
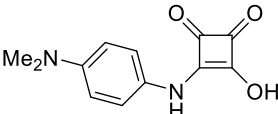
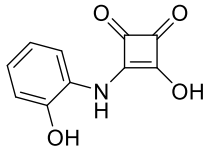
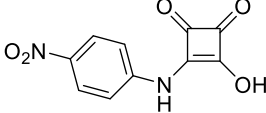
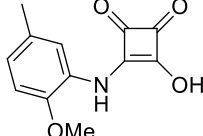
donde  $LH_2$  = ácido escuarámico totalmente protonado  
 $LH$  = primera ionización (pérdida del protón escuárico)  
 $L$  = segunda ionización (pérdida del protón amídico)



**Figura 2.6.** a) Valoración ácido-base del SQA **5h** ( $2.43 \times 10^{-5}$  M) con NaOH 1 M desde pH 9.17 hasta 13.01. b) Distribución de las especies ionizadas del SQA **5h** extraída de los valores experimentales obtenidos de la valoración anterior (a) y de la valoración con HCl 1M desde pH 4.56 hasta 1.01 (Figura E2.5).

Los valores de  $pK_a$  obtenidos se muestran en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Valores de  $pK_a$  de SQAs representativos determinados mediante valoraciones espectrofotométricas a 25°C.<sup>a</sup>

SQA	$pK_{OH}$	$pK_x$	$pK_{NH}^d$	
	<b>5a</b>	1.55(1)	-	12.90(1)
	<b>5c</b>	0.89(1)	5.33(1) <sup>b</sup>	11.54(1)
	<b>5e</b>	1.31(1)	9.18(1) <sup>c</sup>	13.00(3)
	<b>5h</b>	0.98(1)	-	11.83(1)
	<b>5g</b>	2.01(1)	-	12.30(2)

<sup>a</sup> Los números entre paréntesis representan las desviaciones estándar de la última cifra significativa. <sup>b</sup>  $pK_a$  de  $ArNMe_2$ . <sup>c</sup>  $pK_a$  de  $ArOH$

En resumen, se ha demostrado que los SQAs son ácidos fuertes cuya primera constante de ionización es comparable a la de otros ácidos fuertes estructuralmente comparables, como pueden ser los ácidos escuárico ( $pK_{a1} = 1.54$ ), oxálico ( $pK_{a1} = 1.38$ ), o el difenilfosfórico ( $pK_a = 1.85$ ).<sup>72</sup> En todos los casos estudiados el crecimiento de una banda de transferencia protónica resulta evidente a valores básicos de pH ( $pH > 10$ ). Estas bandas sirven como diagnóstico del proceso de transferencia de protones de los grupos NH de los escuaramatos.<sup>73</sup> Los valores de  $pK_a$  extraídos de estas bandas y correspondientes a la ionización de los NHs se encuentran en el rango de 11.5 a 13.0. Estos valores son inferiores a los que se encuentran típicamente en amidas secundarias ( $< 15$ ). Este hecho puede atribuirse al carácter aromático que adquieren los dianiones de escuaramato resultantes. Los grupos ácidos adicionales situados en los anillos aromáticos convierten estos SQAs en ácidos orgánicos tripróticos. Los valores de  $pK_a$  del SQA zwitteriónico **5c**, que presenta un grupo dimetilamino, y del **5e**, con un grupo hidroxilo (Tabla

<sup>72</sup> (a) L. M. Schwartz, L. O. Howard. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4374; (b) R. A. Scherrer, S. F. Donovan. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2768.

<sup>73</sup> V. Amendola, L. Fabbrizzi, L. Mosca, F. -P. Schmidtchen. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5972

2.4), obtenidos a 5.33 y 9.18 respectivamente, concuerdan con los valores esperados. Como resultado, se han obtenido tres ácidos tripróticos que presentan constantes de ionización crecientes comparables a las de ácidos inorgánicos como el ácido fosfórico.

### 2.4. Conclusiones

En conclusión, se ha desarrollado un método expeditivo de síntesis de ácidos escuarámicos que permite una gran variedad de sustituyentes. Estos compuestos, además, mantienen las propiedades fuertemente ácidas del ácido escuárico precursor, a la vez que presentan un descenso del  $pK_a$  de ionización de los hidrógenos escuaramídicos. Con todo, este estudio aporta información muy valiosa sobre un tipo compuestos derivados de las escuaramidas muy poco investigados hasta el momento.

## 2.5. Sección Experimental

### 2.5.1. Información general

Todos los reactivos se han adquirido comercialmente y se han utilizado sin ningún tipo de tratamiento previo. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) MICROMASS Autospec3000, provisto de una entrada de muestra por electrospray (ESI) (en el caso del ácido escuarámico **5o** se ha utilizado un módulo de impacto electrónico). Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300 en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm, y están referenciados a la señal residual del disolvente. Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz. Las síntesis asistidas por microondas se han realizado en viales de 0.5-2 mL mediante un reactor Biotage Initiator (potencia aplicable de 0-400 W con incrementos de 1 W, sensor de temperatura por IR, rango de presiones de 0-20 bar). La determinación de valores de pH se ha realizado mediante un pH-Meter 766 Calimatic de Knick. Los espectros de absorción de UV-Vis se han registrado en un espectrofotómetro Varian Cary 300Bio. Los espectros de IR se han registrado en un espectrofotómetro de FT-IR Bruker IFS66.

### 2.5.2. Procedimiento general para la síntesis asistida por microondas de ácidos escuarámicos

Una mezcla de ácido escuaríico (0.5 mmol) y de la amina correspondiente (la relación molar depende de la amina utilizada) en 1.5 mL de agua (milliQ) se adiciona en un vial de 0.5-2 mL con un agitador magnético y se sella. La mezcla de reacción se calienta en el reactor de microondas, dependiendo el tiempo y la temperatura de reacción de la amina utilizada. Después de enfriar el sistema a 50°C mediante una corriente de gas (aire comprimido), el vial se retira del reactor de microondas y el producto se aísla y purifica siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

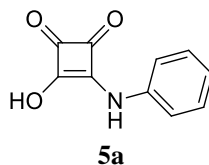
#### 3-fenilamino-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (**5a**).<sup>55,56 b-c,49d</sup>

Condiciones de reacción: ácido escuaríico (57 mg, 0.5 mmol) y anilina (91  $\mu\text{L}$ , 1.0 mmol) a 120 °C durante 15 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se transfiere a un Erlenmeyer donde se diluye con 25 mL de agua. Se adiciona gota a gota y con agitación magnética NaOH 1 M hasta pH 10. La disolución se extrae tres veces con 15 mL de éter dietílico, descartando la fase orgánica. A continuación la fase acuosa se acidifica a pH 1 mediante la adición gota a gota de HCl 1M. La cristalización del producto tiene lugar al cabo de unas horas, siendo necesario a

## Capítulo 2

veces reducir el volumen de disolvente. El sólido se filtra y se seca. El producto **5a** se obtiene en forma de agujas de color amarillo pálido (79 mg, 83%).

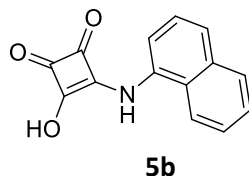


La caracterización espectroscópica ya se ha descrito previamente.<sup>55,56 b-c,49d</sup>

### 3-(1-naftilamino)-4-hidroxiclobut-3-en-1,2-diona (**5b**).<sup>58</sup>

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 1-naftilamina (24 mg, 0.25 mmol) a 120 °C durante 30 minutos.

Purificación del producto: La mezcla de reacción se diluye con NaOH 0.5 M (20 mL) y se extrae cuatro veces con 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, descartando el conjunto de fases orgánicas. La disolución acuosa se filtra y se acidifica con HCl 3M (8 mL). La suspensión resultante se extrae con acetato de etilo (3x15 mL). La combinación de fases orgánicas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5b** (41 mg, 64%) se obtiene en forma de sólido ocre.

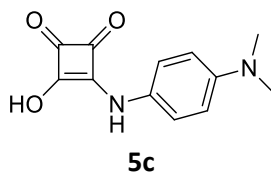


PF 214-217 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 216, 273 y 324 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  28000, 11700 y 11000).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 220, 260 y 355 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  44100, 15000 y 15100). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3266 (NH), 2684br (OH), 1829 y 1808 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 10.58 (1H, s, NH), 8.14 (1H, br m, Ar), 7.96 (1H, br m, Ar), 7.77 (1H, d, Ar), 7.57 (2H, m, Ar), 7.50 (1H, t, Ar), 7.36 (1H, d, Ar). <sup>13</sup>C NMR<sup>2</sup>:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 190.4, 187.6, 184.8, 172.3, 133.6, 133.2, 128.1, 127.1, 126.4, 126.0, 125.5, 125.4, 122.8, y 120.3. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 501.1080; experimental 501.1063.

### 3-(4-(N,N-dimetilamino)fenilamino)-4-hidroxiclobut-3-en-1,2-diona (**5c**).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y N,N-dimetilamino-1,4-fenilendiamina (136 mg, 1.0 mmol) a 150 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye con 10 mL de agua y se filtra. El sólido resultante se lava 3 veces con 5 mL de agua. El producto **5c** se obtiene como un sólido verde oscuro (103 mg, 88%).

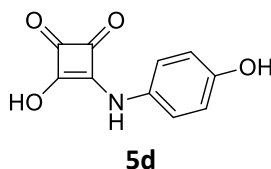


La caracterización espectroscópica ya se ha descrito previamente.<sup>74</sup>

### 3-(p-hidroxifenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (**5d**).<sup>57b</sup>

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 4-aminofenol (11 mg, 0.1 mmol) a 130 °C durante 15 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 15 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% y se extrae con dietiléter (3x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (5 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (5x15 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5d** se obtiene como un sólido marrón (17 mg, 82%).



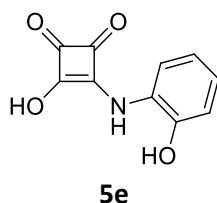
PF 255-260 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 217, 274 y 304 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  10300, 15500 and 21600).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 267, y 316 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  13 100, y 24 200). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3341 (NH), 2652br (ArOH), 2652br (OH), 1818 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 10.24 (1H, br s, NH), 7.20 (2H, d, *J* = 4.5, Ar(o)H), 6.71 (2H, d, *J* = 4.5, Ar(m)H). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 190.4, 186.0, 184.0, 170.3, 154.0, 130.1, 120.9 y 115.4. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 433.0649; experimental 433.0648.

### 3-(o-hidroxifenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (**5e**).<sup>57b</sup>

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 2-aminofenol (27 mg, 0.25 mmol) a 130 °C durante 15 minutos.

<sup>74</sup> E. Sanna, L. Martínez, C. Rotger, S. Blasco, J. González, E. García-España, A. Costa. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3840.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 15 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% y se extrae con dietiléter (3x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (5 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (5x15 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5e** se obtiene como un sólido marrón (40 mg, 78%).

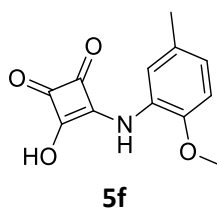


PF >225 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 275 y 313 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 16800 y 20400). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3300 (NH), 3200-2800br (ArOH), 2800-2550br (OH), 1813 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*6) 9.90 (1H, br s, NH), 9.31 (1H, s, OH), 7.48 (1H, d, *J* = 8.1, Ar(o)H), 6.94+6.87+6.78 (3H, m, ArH). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 186.6, 184.3, 171.4, 148.2, 125.9, 125.0, 121.6, 119.1, y 115.5. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 433.0648; experimental 433.0656.

### 3-(2-metoxi-5-metilfenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (**5f**).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 2-metoxi-5-metilaminina (137 mg, 1.0 mmol) a 120 °C durante 30 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% y se extrae con dietiléter (5x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (10 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (4x20 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5f** se obtiene como un sólido blanco (73 mg, 63%).



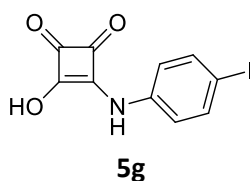
PF >220 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 205, 285 y 322 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  20000, 10600 and 14900).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 205, 251, 265, 293, y 338 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  19400, 8100, 8500, 7600, y 22500). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3234 (NH), 2360br (OH), 1804 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 9.44 (1H, s, NH), 7.28 (1H, s, Ar(o)H), 6.92 (2H, dd, *J* = 8.4, Ar(m,p)H), 3.78 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.22 (3H, s, ArCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 190.1, 186.8, 184.3, 171.4, 148.4, 129.3, 126.4, 125.5, 122.4, 111.4, 55.8, y 20.3. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [2M+H]<sup>+</sup> 467.1454; experimental 467.1446.



**3-hidroxi-4-((4-yodofenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5g).**

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 4-iodoanilina (219 mg, 1.0 mmol) a 120 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 30 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5%, se filtra y se descarta el sólido. La disolución acuosa se extrae con dietiléter (4x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (10 mL), y el precipitado formado se filtra y se lava con 10 mL de agua. El producto **5g** se obtiene como un sólido blanco (92 mg, 58%).

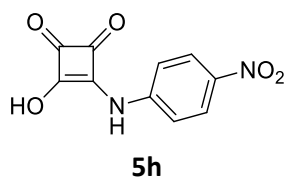


PF >280 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 233, 268, y 320 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  12700, 13700, y 34800). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3239 br (NH), 2641 br (OH), 1817 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 10.44 (1 H, s, NH), 7.64 (1 H, d, *J* = 8.7, Ar(o)H), 7.25 (2 H, d, *J* = 8.7, Ar(m)H). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 188.3, 184.8, 170.9, 138.7, 137.6, 121.1, y 86.8. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>INO<sub>3</sub>Na [MNa]<sup>+</sup> 337.9290; experimental 337.9279.

**3-(p-nitrofenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5h).**

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 4-nitroanilina (14 mg, 0.1 mmol) a 120 °C durante 30 minutos.

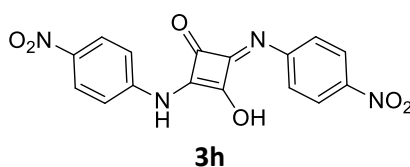
Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 10 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5%. El sólido formado se filtra y se lava 10 veces con 3 mL de agua. El sólido resultante es la escuaraína **3h**. En conjunto de las fracciones acuosas se extraen con dietiléter (5x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (10 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (4x20 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5h** se obtiene como un sólido amarillo (21 mg, 90%).



PF >260 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 262 y 393 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  19600 y 21400).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 258, 291, y 428 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  15800, 10700, y 17900). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3222 (NH), 2634br (OH), 1825 (CO), 1696 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 10.44 (1 H, br s, NH), 8.14 (2 H, d,  $J = 7.8$ , Ar(o)H), 7.74 (2 H, d,  $J = 9$ , Ar(m)H). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 192.4, 189.9, 185.9, 171.7, 145.6, 141.3, 125.4, y 117.9. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 491.0451; experimental 491.0455.

### 3-hidroxi-2-((4-nitrofenil)amino)-4-((4-nitrofenil)imino)ciclobut-2-enona (3h).

Este producto se obtiene como producto secundario en la síntesis del ácido escuarámico **5h** en forma de sólido amarillo.

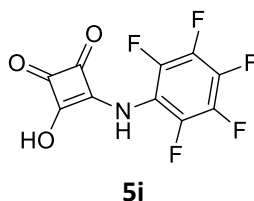


IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3417 (NH), 1586 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; DMSO-*d*6) 9.39 (1 H, br s, NH), 9.25 (1 H, br s, NH), 7.78 (2 H, br s, Ar(o)H), 7.09 (2 H, br s, Ar(m)H). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; DMSO-*d*6): 166.2, 165.3, 164.8, 164.4, 144.2, 139.5, 125.3, 121.2. HRMS MALDI-TOF(+), calc. para C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [MH]<sup>+</sup> 355.06786; experimental 355.06683.

### 3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5i).

Condiciones de reacción: ácido escuarámico (57 mg, 0.5 mmol) y 2-metoxi-5-metilánilina (183 mg, 1.0 mmol) a 120 °C durante 40 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5% y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (10 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (5x10 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5i** se obtiene como un sólido marrón pálido (52 mg, 37%).

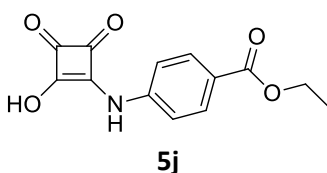


PF 209-211 °C.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 258 y 296 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  20500 y 23100).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 253 y 312 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  17600 y 16700). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3226 (NH), 2648br (OH), 1815 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 10.66 (1 H, s, NH), 8.68 (1 H, br, OH). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 190.0, 189.1, 185.2, 172.4, 143.9 (m), 140.6 (m), 138.9 (m), 137.2 (m), 135.6 (m), 113.8 (m). HRMS ESI(+), calc. para C<sub>20</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>F<sub>10</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 580.9803; experimental 580.9807.

#### 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)benzoato de etilo (5j).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y etil-4-aminobenzoato (25 mg, 0.15 mmol) a 120 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 5%, se filtra y se descarta el sólido remanente. La disolución acuosa se extrae con dietiléter (4x20 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (10 mL), y se extrae con dietiléter (10x20 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5j** se obtiene como un sólido blanco (33 mg, 83%).

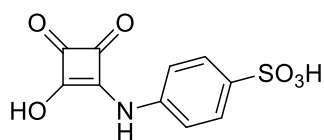


PF >230 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 241, 268 y 337 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  13500, 12900 and 33000).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 249, 268 y 353 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  15100, 10000 y 30600). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3233 (NH), 2673br (OH), 1804 (CO), 1699 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 10.60 (1 H, s, NH), 7.89 (2 H, d, *J* = 8.7, Ar(o)H), 7.56 (2 H, d, *J* = 8.7, Ar(m)H), 4.27 (2 H, q, *J* = 6.8, CH<sub>2</sub>), 1.29 (3 H, t, *J* = 6.9, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 189.9, 185.2, 171.2, 165.3, 143.3, 130.6, 130.4, 123.5, 118.0, 60.3, y 14.2. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [2M+H]<sup>+</sup> 523.1353; experimental 523.1346.

#### Ácido 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)benzenosulfónico (5k).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y etil-4-aminobenzoato (43 mg, 0.25 mmol) a 120 °C durante 30 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 5 mL de HCl 1M y se concentra a sequedad. El sólido resultante se extrae con acetato de etilo (10x10 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El sólido resultante se lava con diisopropil éter (3x5 mL) y se seca al vacío. El producto **5k** se obtiene como un sólido blanco (47 mg, 70%).



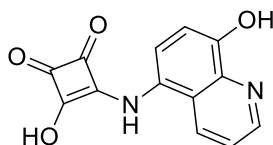
**5k**

PF >200 °C desc. IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3418br (NH), 2635br (OH), 1800 (CO).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 10.52 (1 H, s, NH), 7.52 (2 H, d,  $J = 8.1$ , Ar(*o*)H), 7.32 (2 H, d,  $J = 8.4$ , Ar(*p*)H).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 189.9, 187.0, 184.7, 170.5, 142.7, 138.9, 126.6, y 118.3. HRMS ESI(+), calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}_2$  [2M+H] $^+$  539.0066; experimental 539.0073.

### 3-hidroxi-4-((8-hidroxiquinolein-5-il)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5l).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y diclorhidrato de 5-amino-8-hidroxiquinoleina (117 mg, 0.5 mmol) a 120 °C durante 15 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 10 mL de agua y se filtra. El sólido resultante se lava tres veces con 10 mL de agua y se seca al vacío. El producto **5l** se obtiene como un sólido rojo oscuro (122 mg, 95%).



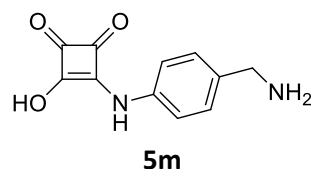
**5l**

PF >210 °C desc. IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3419 (NH), 2635br (OH), 1800 (CO).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 10.36 (1 H, s, NH), 8.92 (1 H, d,  $J = 3.9$ , CH[2]), 8.64 (1 H, d,  $J = 8.7$ , CH[4]), 7.26 (2 H, m, CH[3]), 7.38 (1 H, d,  $J = 8.1$ , CH[6]), 7.14 (1 H, d,  $J = 8.1$ , CH[7]).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 189.8, 185.2, 173.4, 149.8, 147.4, 136.0, 134.3, 124.9, 123.5, 122.3, 121.6 y 111.7. HRMS ESI(+), calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$  [MH] $^+$  257.0562; experimental 257.0570.

### 3-((4-(aminometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5m).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 4-amino-benzilamina (38  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol) a 120 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 10 mL de agua y se filtra. El sólido resultante se lava tres veces con 10 mL de agua y se seca al vacío. El producto **5k** se obtiene como un sólido amarillo (60 mg, 92%).

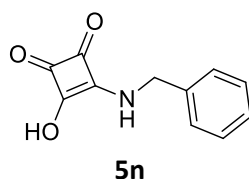


PF >270 °C desc. IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3226 (NH), 3188 (NH<sub>2</sub>), 2644br (OH), 1788 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 9.37 (1 H, s, NH), 7.98 (3 H, br s, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 7.67 (2 H, d, *J* = 8.4, Ar(o)H), 7.26 (2 H, d, *J* = 8.4, Ar(m)H), 3.91 (2 H, d, *J* = 5.4, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6,): 202.3, 187.8, 177.4, 141.6, 129.6, 124.9, 117.2 y 42.1. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>11</sub>H<sub>01</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 467.1454; experimental 467.1446.

### 3-bencilamino-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5n).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y benzilamina (109  $\mu\text{L}$ , 1.0 mmol) a 200 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 20 mL de HCl 3M y se extrae con dietiléter (5x20 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5n** se obtiene como un sólido amarillo pálido (61 mg, 60%).



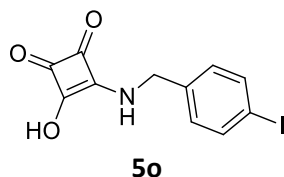
PF 200 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 283 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  17100).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 260 y 293 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  16700 y 20800). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3260br (NH), 2585br (OH), 1809 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.82 (1 H, s, NH), 7.33 (5 H, m, ArH), 4.59 (2 H, d, *J* = 6.3, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6,): 192.6, 185.0, 184.0, 173.8, 138.7, 128.6, 127.4, y 46.9. HRMS ESI(+), calc. para C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [2M+Na]<sup>+</sup> 429.1063; experimental 429.1097.

### 3-(4-yodobencilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5o).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (29 mg, 0.25 mmol) y 4-iodo-benzilamina (117 mg, 0.5 mmol) a 200 °C durante 20 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 10 mL de NaOH 1M y 10 mL de agua y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5x12 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 1M (12 mL) y se extrae con acetato de etilo (5x15 mL). La combinación de

las fases orgánicas se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5m** se obtiene como un sólido blanco (68 mg, 41%).

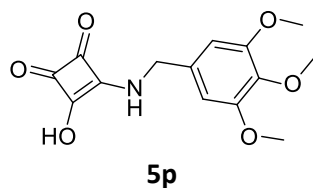


PF >205 °C desc.  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ )/nm 234 y 285 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  12000 y 29100).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeCN)/nm 230, 259 y 295 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  15600, 19000 y 29600). IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3238br (NH), 2643br (OH), 1818 (CO).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$ (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.81 (1 H, s, NH), 7.73 (2 H, d,  $J = 8.4$ , Ar(o)H), 7.11 (2 H, d,  $J = 8.1$ , Ar(m)H), 4.53 (2 H, d,  $J = 6$ ,  $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 184.89, 184.10, 183.48, 137.29, 129.65, 93.27, y 46.32. HRMS ESI(+), calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{INO}_3\text{Na}$  [MNa] $^+$  351.9447; experimental 351.9438.

### 3-(3,4,5-trimetoxibencilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5p).

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y 3,4,5-trimetoxibencilamina (178  $\mu\text{L}$ , 1 mmol) a 200 °C durante 50 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye con  $\text{NaHCO}_3$  5% (10 mL) y 10 mL de agua y se extrae cinco veces con 15 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , descartando el conjunto de fases orgánicas. La disolución acuosa se filtra y se acidifica con HCl 3M (5 mL). La fase acuosa resultante se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5x20 mL). La combinación de fases orgánicas se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5n** se obtiene en forma de sólido blanco (85 mg, 58%).

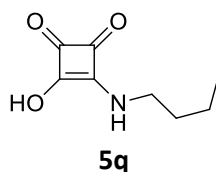


PF >205 °C dec.  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ )/nm 202 y 284 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  23600 y 16800).  $\lambda_{\text{max}}$  (MeCN)/nm 204, 260 y 294 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  34500, 13900 y 18700). IR:  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3262br (NH), 2604br (OH), 1825 (CO).  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.81 (1 H, t,  $J = 5.7$ , NH), 6.62 (2 H, s, ArH), 4.51 (2 H, d,  $J = 6$ ,  $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6): 184.8, 184.4, 173.6, 152.9, 136.7, 134.1, 104.8, 60.0, 55.8, y 47.2. HRMS ESI(+), calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{Na}$  [MNa] $^+$  316.0797; experimental 316.0812.

**3-(butilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5q).**

Condiciones de reacción: ácido escuárico (57 mg, 0.5 mmol) y butilamina (110 mg, 1.5 mmol) a 200 °C durante 60 minutos.

Purificación del producto: la mezcla de reacción se diluye en 10 mL de NaOH 1M y 10 mL de agua y se extrae con dietiléter (3x10 mL), descartando las fases orgánicas. La disolución acuosa se acidifica con HCl 3M (12 mL), se satura con NaCl y se extrae con acetato de etilo (6x20 mL). La combinación de las fases orgánicas se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentra a sequedad. El producto **5n** se obtiene como un sólido blanco (25 mg, 30%).

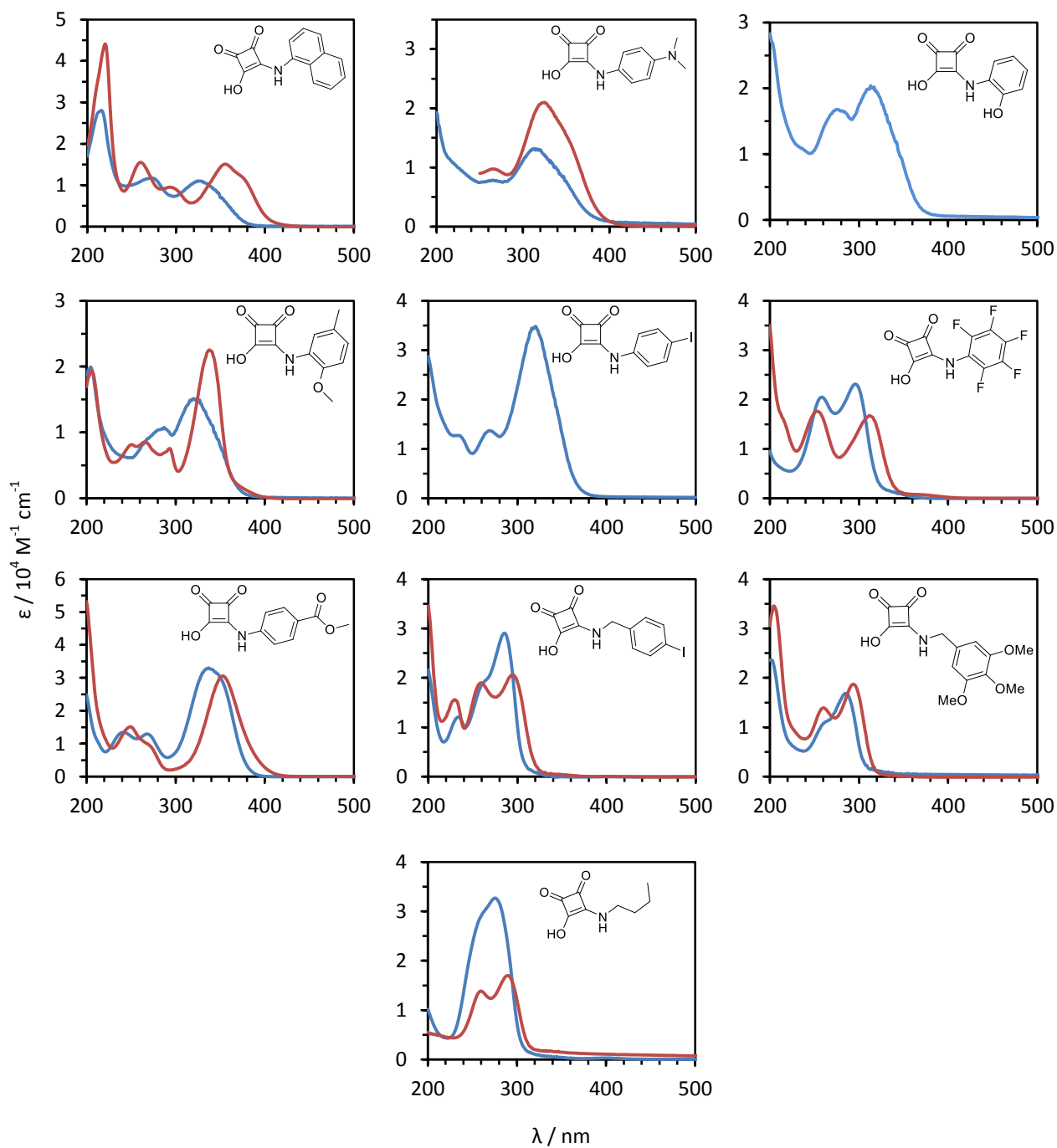


PF >205 °C desc.  $\lambda_{\max}$  (H<sub>2</sub>O)/nm 276 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  32700).  $\lambda_{\max}$  (MeCN)/nm 260 y 292 ( $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  13800 y 16700). IR:  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3210br (NH), 2587br (OH), 1817 (CO). <sup>1</sup>H NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 8.40 (1 H, br s, NH), 3.38 (2 H, q, *J* = 6.6, But(C1-H)), 1.49 (2 H, m, But(C2-H)), 1.289 (2 H, m, But(C3-H)), 0.87 (3 H, t, *J* = 7.0, But(C4-H)). <sup>13</sup>C NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 192.10, 184.87, 174.37, 43.72, 32.91, 19.52, y 13.98. HRMS EI(+), calc. para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> [M] 169.0739; experimental 169.0731.

### 2.5.3. Valoraciones espectrofotométricas

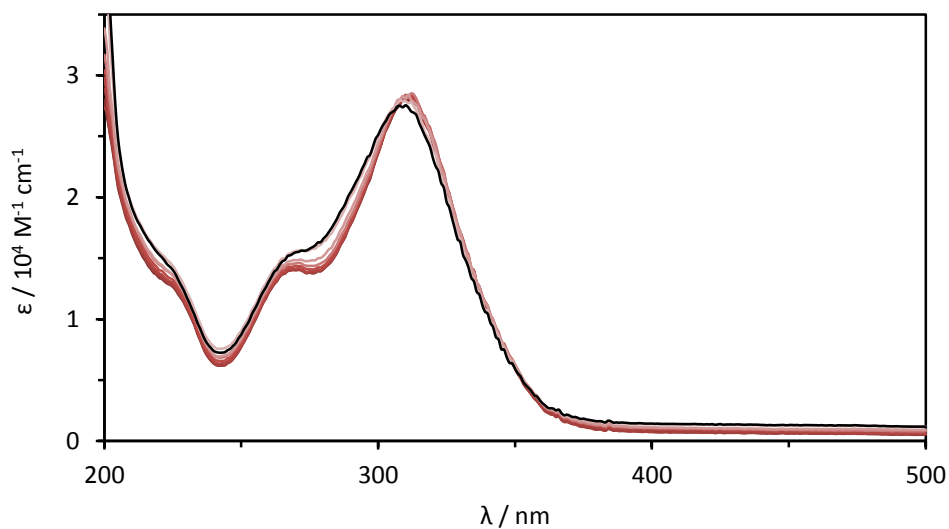
Los valores de  $pK_a$  aparentes de los ácidos escuarámicos **5a**, **5c**, **5e**, **5f** y **5h** se han determinado mediante el registro de los espectros de absorción en UV-vis en el rango de 200 a 600 nm en función del pH calculado, abarcando de pH 13 a 1 en dos etapas. En primer lugar, se ha registrado el espectro de UV-vis de una disolución acuosa  $5 \cdot 10^{-5}$  M del ácido escuarámico en cuestión (2.0 mL) y 0.01 M de NaCl a un pH de 4.5. Mediante la adición de cantidades conocidas de HCl 1.0 M estandarizado se ha ido disminuyendo el pH en intervalos de  $\Delta pH = 0.1$ , registrando el espectro de UV-vis después de cada adición. En segundo lugar, se ha seguido un procedimiento similar empezando a un pH 9 y adicionando NaOH 1.0 M estandarizado hasta pH 13. Los resultados se han analizado mediante el software HypSpec (Protonic Software).<sup>71</sup> En el caso de **5c** ( $R = p\text{-Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ ), la valoración con HCl se ha llevado a cabo empezando desde pH 6.3. De forma similar, para la valoración de **5e** ( $R = o\text{-OHC}_6\text{H}_4$ ) con NaOH, el pH inicial ha sido de 6.7. Cada valoración se ha repetido un mínimo de dos veces.



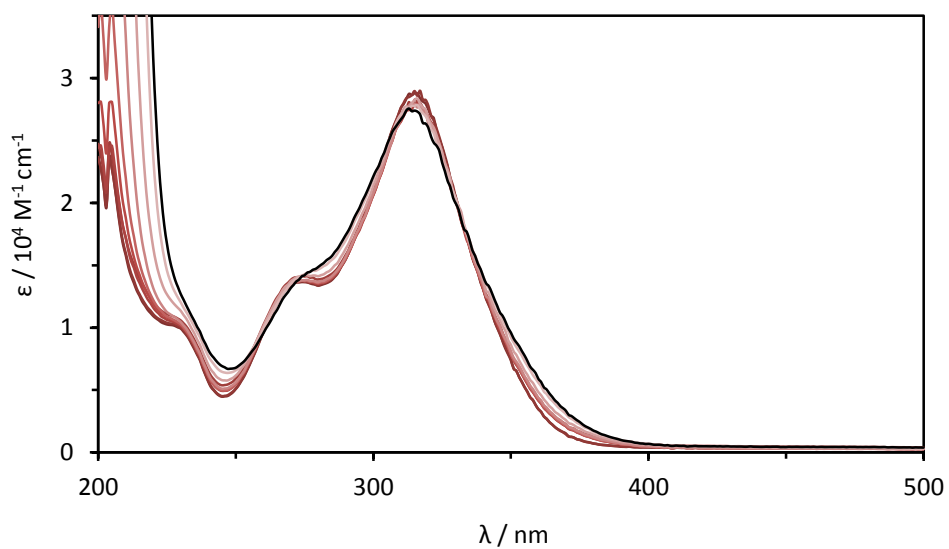


**Figura E2.1.** Espectros de UV-vis de los ácidos escurámicos **5a-o** en agua (línea azul) y MeCN (línea roja).

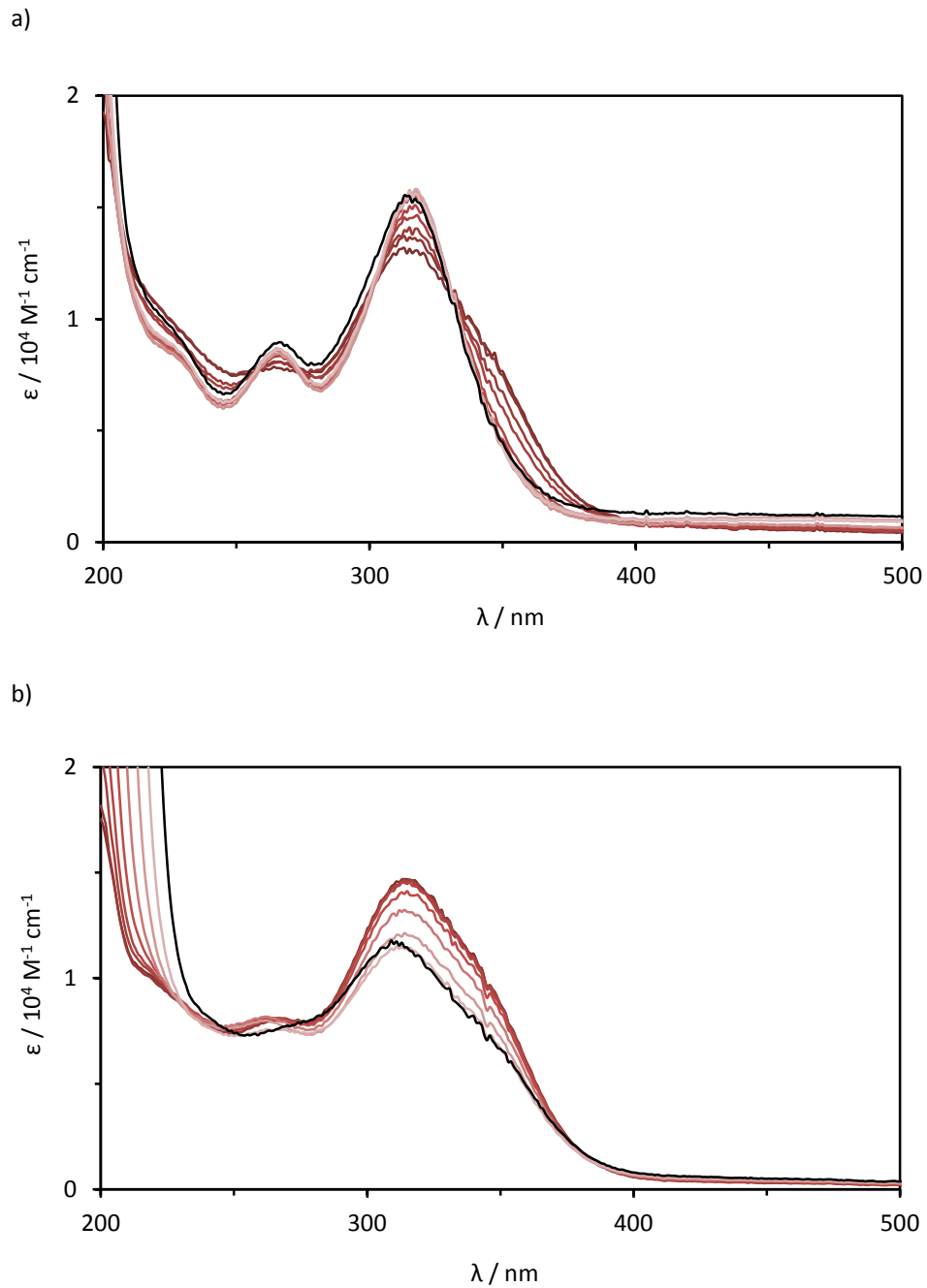
a)



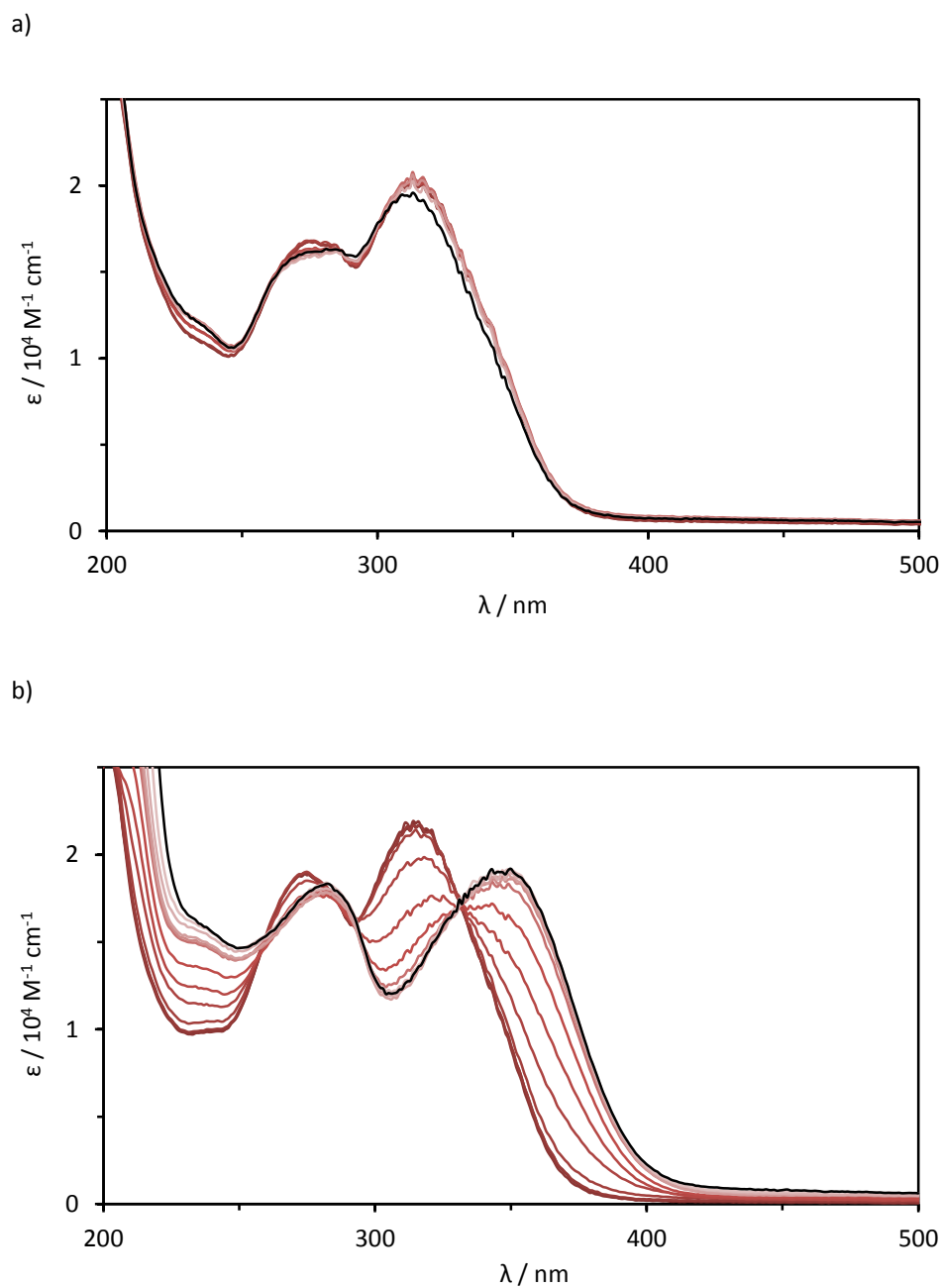
b)



**Figura E2.2.** Valoración por espectroscopia de UV-Vis del SQA **5a** ( $4.19 \times 10^{-5}$  M) (a) con HCl 1M en el intervalo de pH de 4.56 hasta 1.01 y (b) con NaOH 1M en el intervalo de pH de 9.09 hasta 12.86. Los espectros de color rojo oscuro y de color negro de cada valoración son los correspondientes a los valores de pH inicial y final, respectivamente.

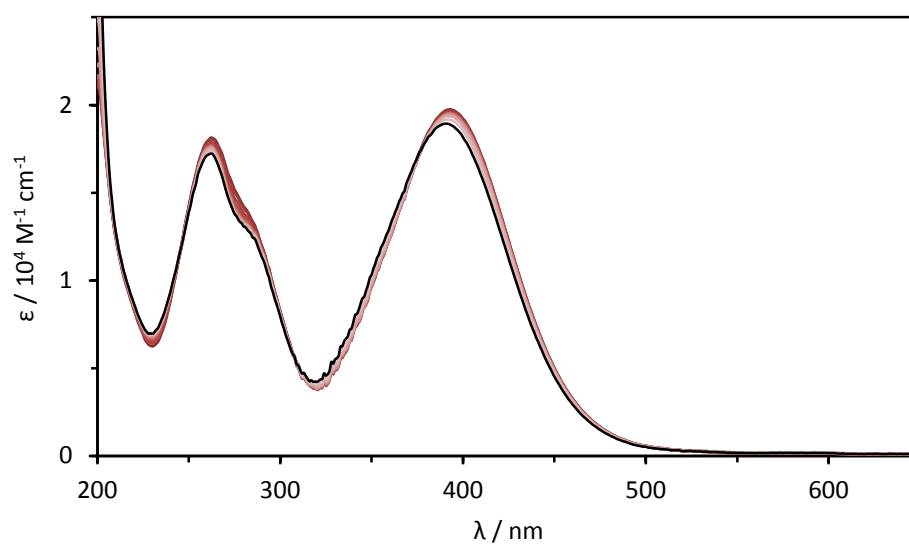


**Figura E2.3.** Valoración por espectroscopia de UV-Vis del SQA 5c ( $4.90 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) (a) con HCl 1M en el intervalo de pH de 6.38 hasta 1.01 y (b) con NaOH 1M en el intervalo de pH de 9.07 hasta 12.92. Los espectros de color rojo oscuro y de color negro de cada valoración son los correspondientes a los valores de pH inicial y final, respectivamente.



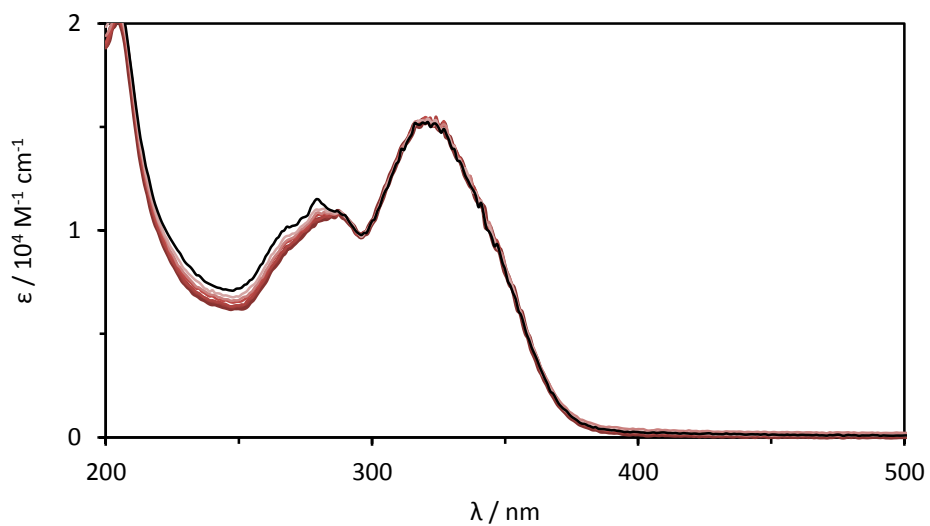
**Figura E2.4.** Valoración por espectroscopia de UV-Vis del SQA **5e** ( $4.13 \times 10^{-5}$  M) (a) con HCl 1M en el intervalo de pH de 4.61 hasta 1.00 y (b) con NaOH 1M en el intervalo de pH de 9.07 hasta 12.92. Los espectros de color rojo oscuro y de color negro de cada valoración son los correspondientes a los valores de pH inicial y final, respectivamente.

a)

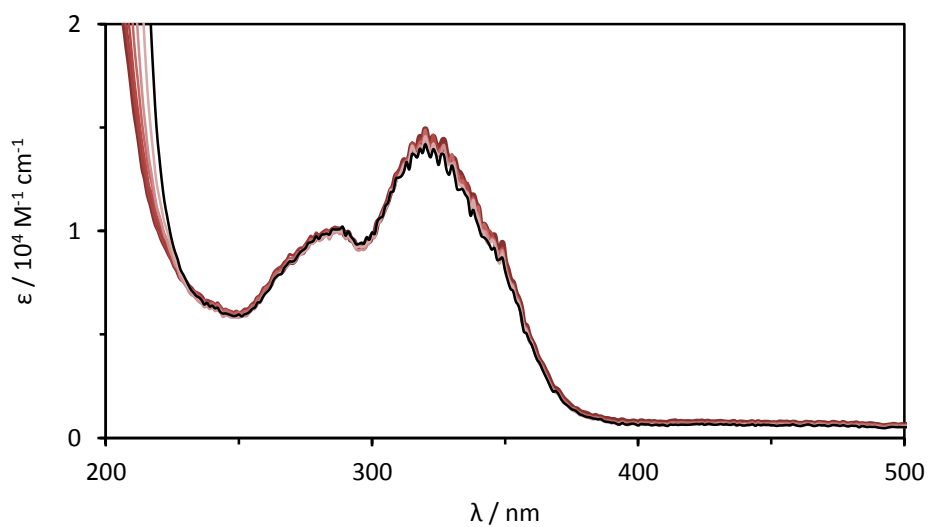


**Figura E2.5.** Valoración por espectroscopia de UV-Vis del SQA **5h** ( $4.13 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) con HCl 1M en el intervalo de pH de 4.56 hasta 1.01. Los espectros de color rojo oscuro y de color negro de cada valoración son los correspondientes a los valores de pH inicial y final, respectivamente.

a)



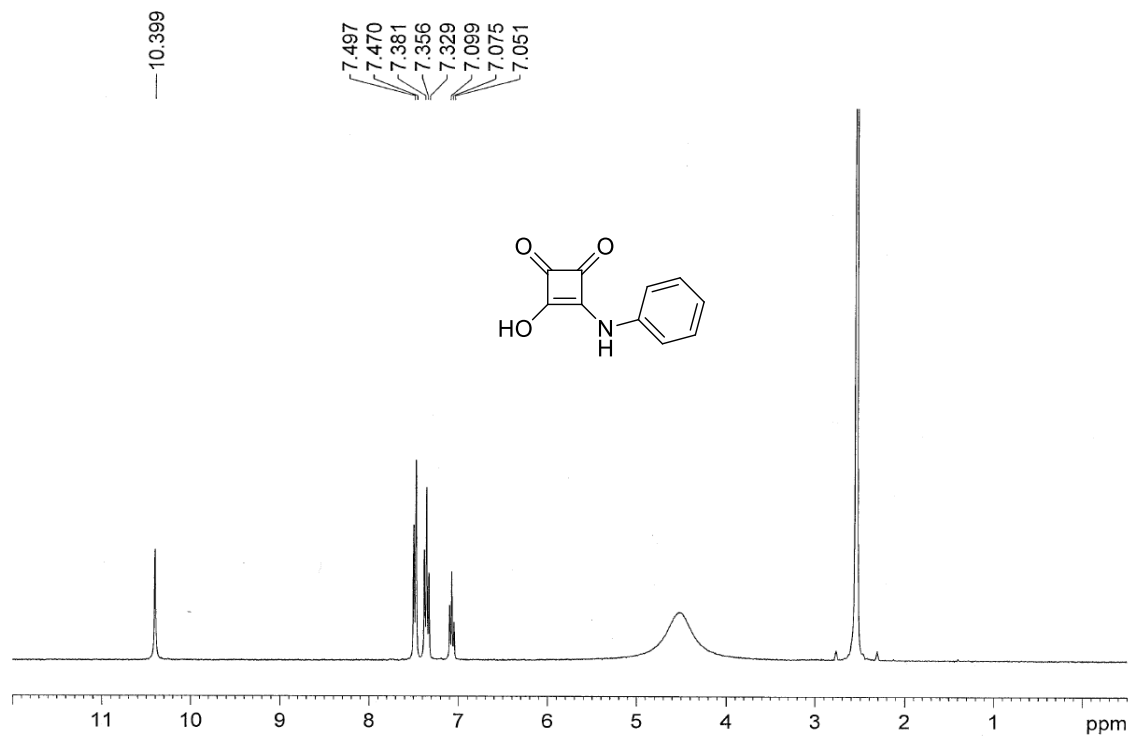
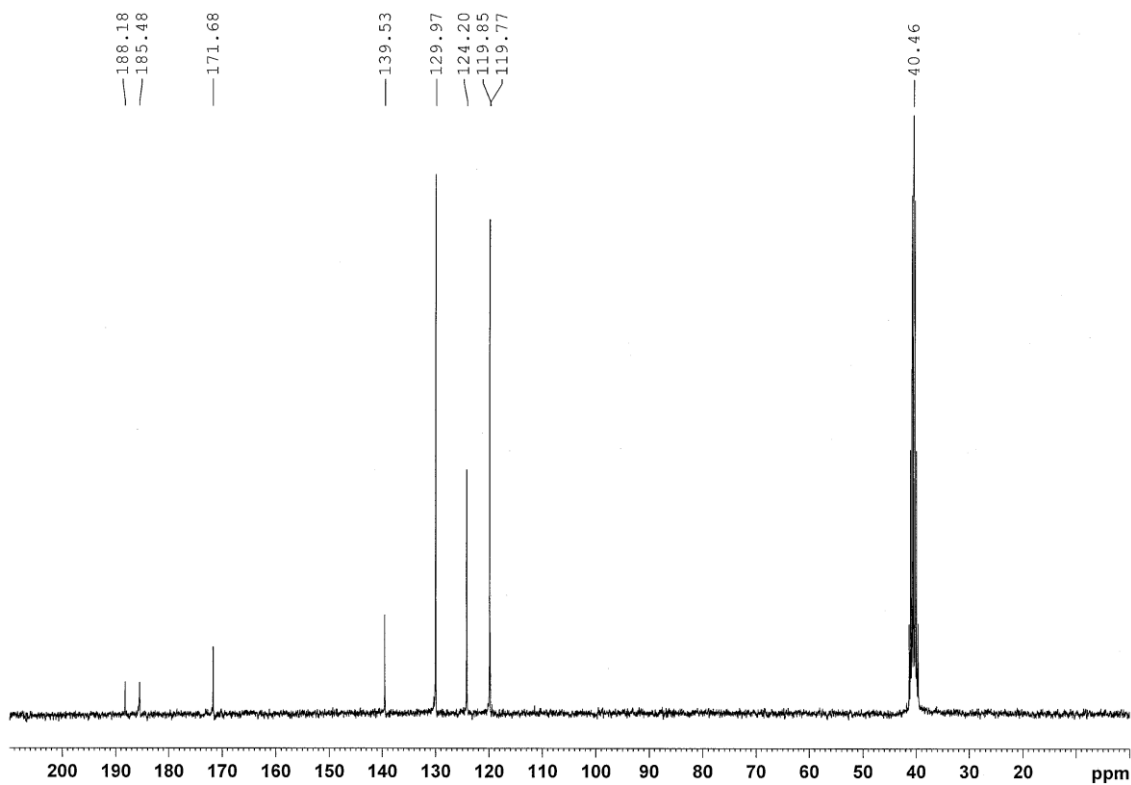
b)



**Figura E2.6.** Valoración por espectroscopia de UV-Vis del SQA 56 ( $4.04 \times 10^{-5}$  M) (a) con HCl 1M en el intervalo de pH de 4.83 hasta 2.01 y (b) con NaOH 1M en el intervalo de pH de 8.60 hasta 12.00. Los espectros de color rojo oscuro y de color negro de cada valoración son los correspondientes a los valores de pH inicial y final, respectivamente.

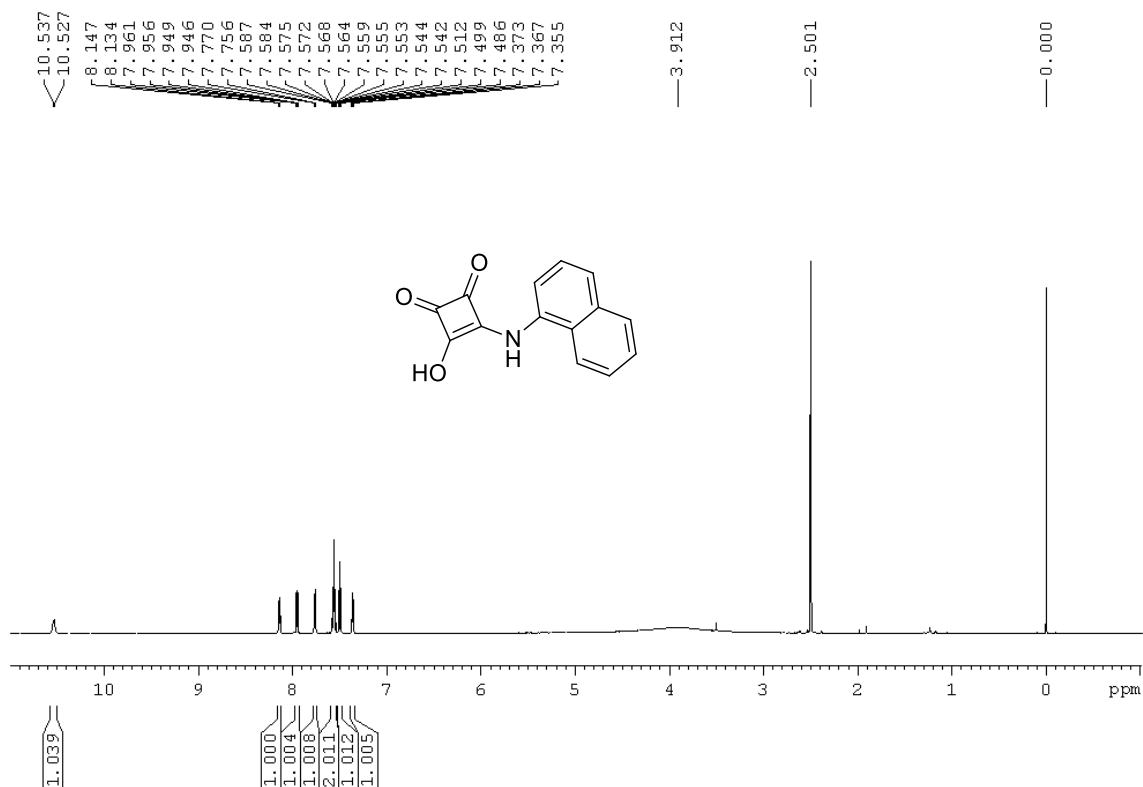
2.5.4. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR.

## 3-fenilamino-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5a).

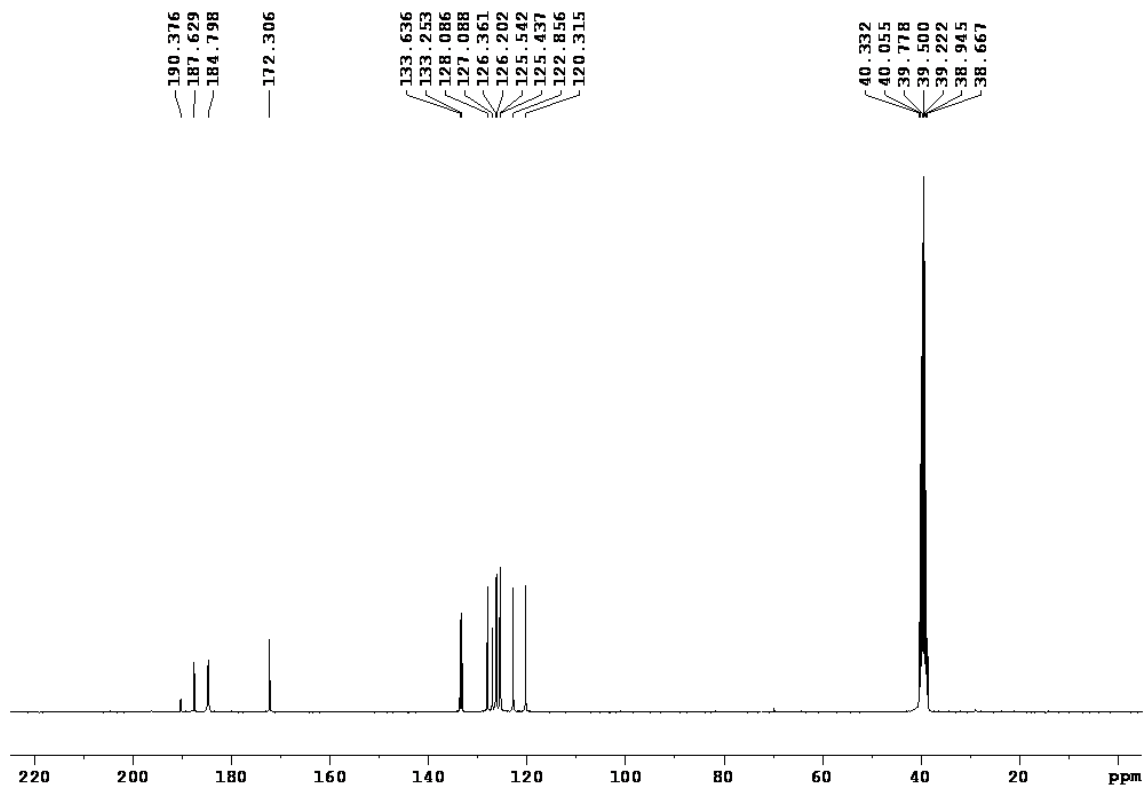
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

**3-(1-naftilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5b).**

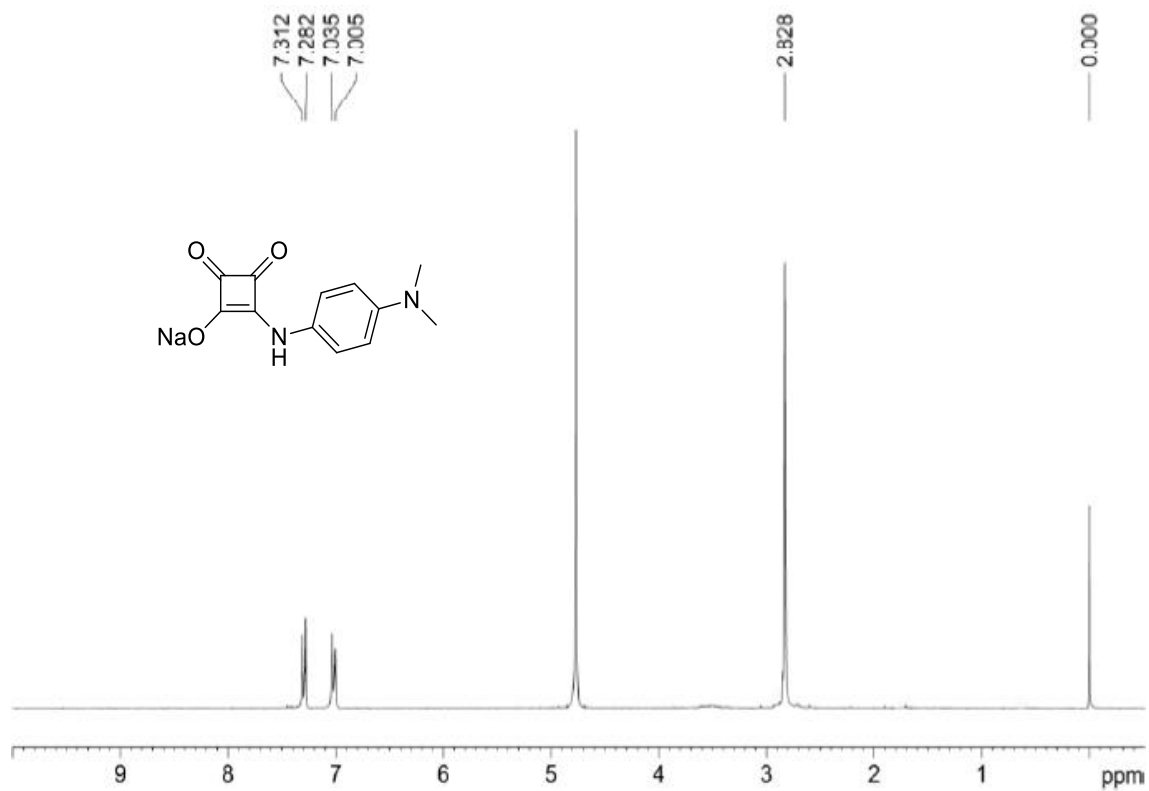
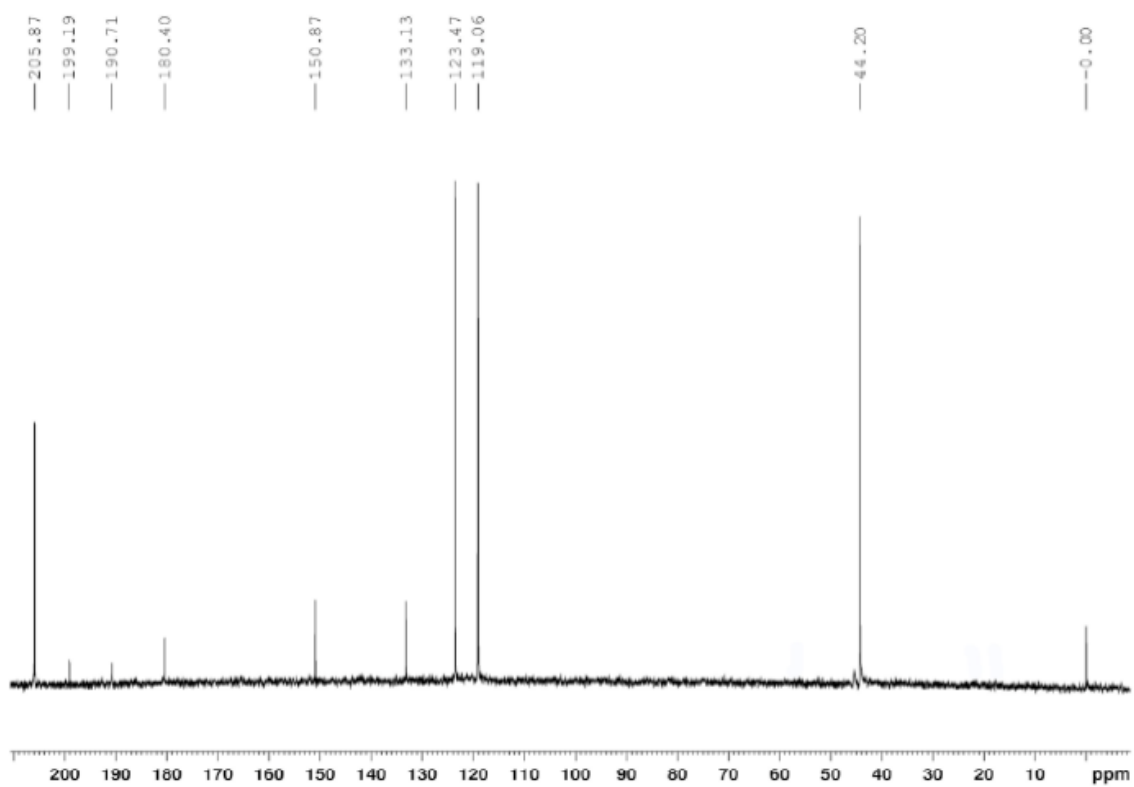
<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

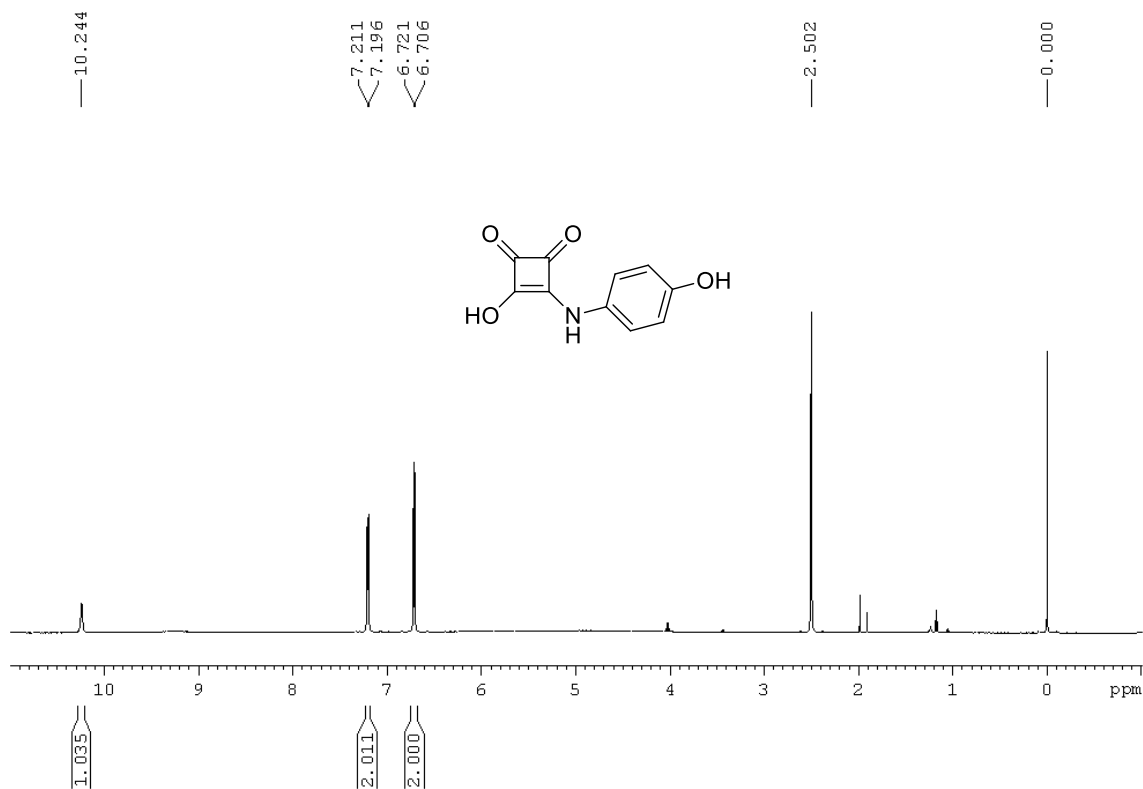




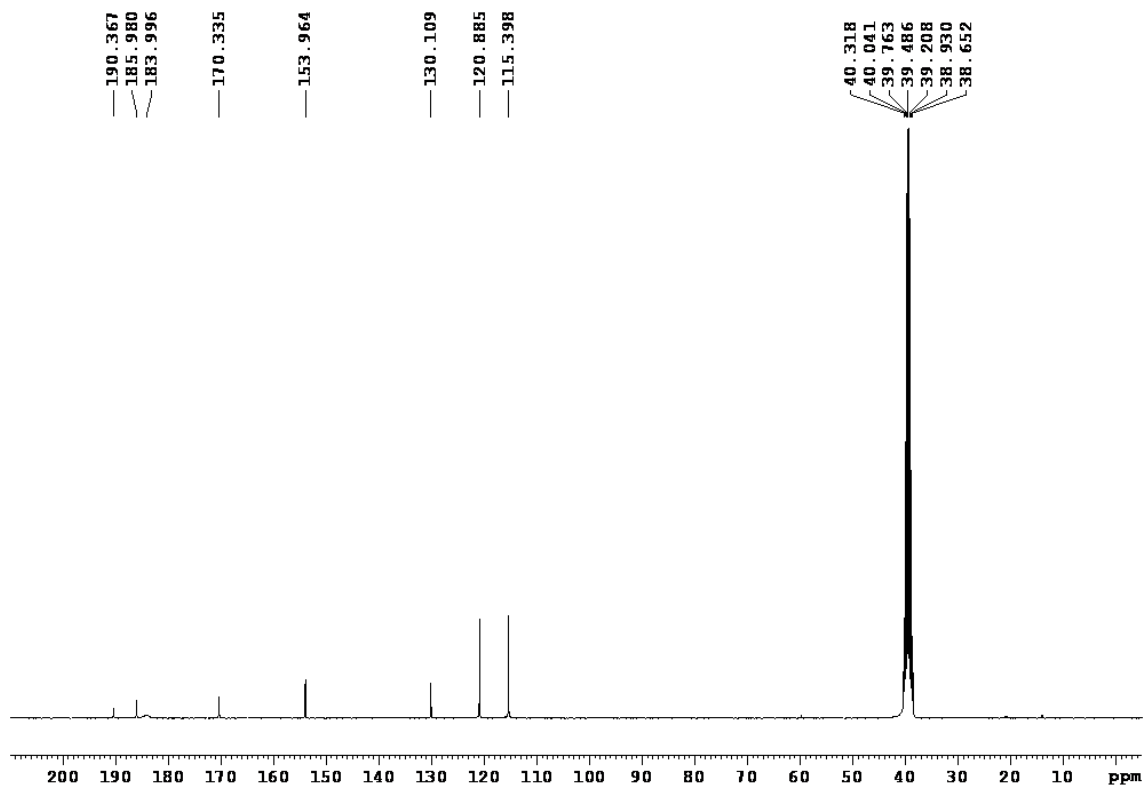
**3-(4-(N,N-dimetilamino)fenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5c).** $^1\text{H}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz, 298 K

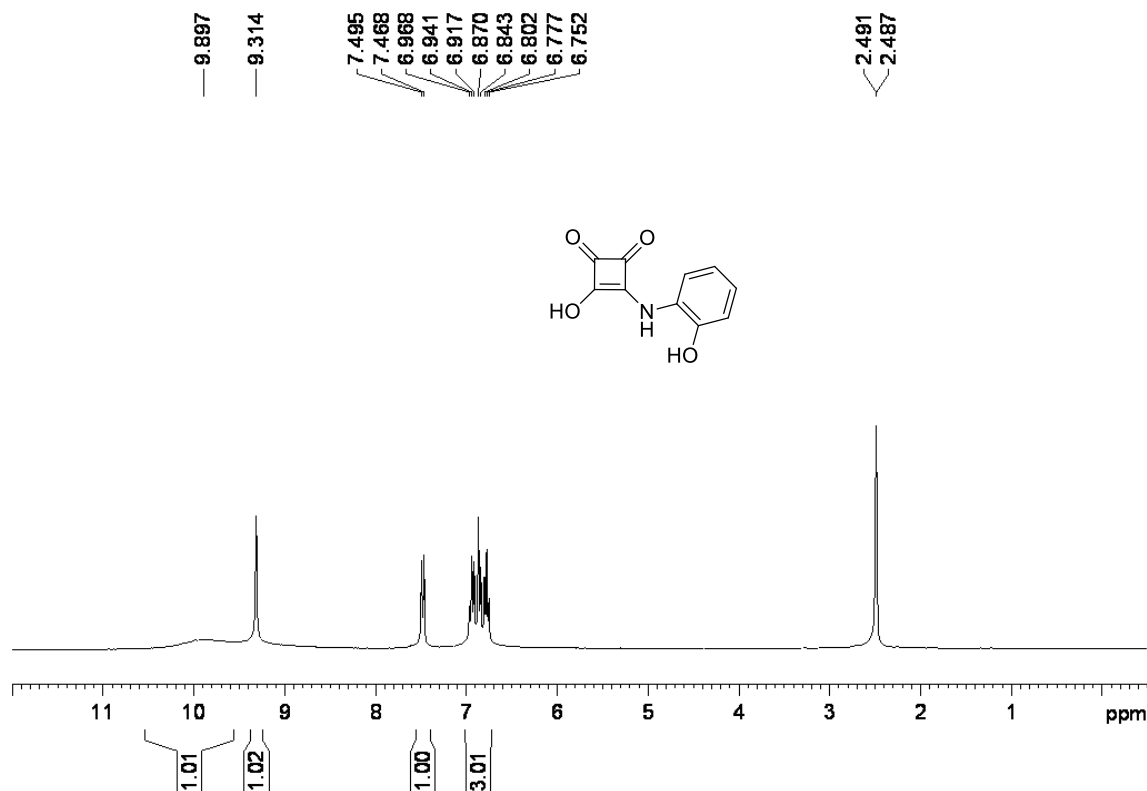
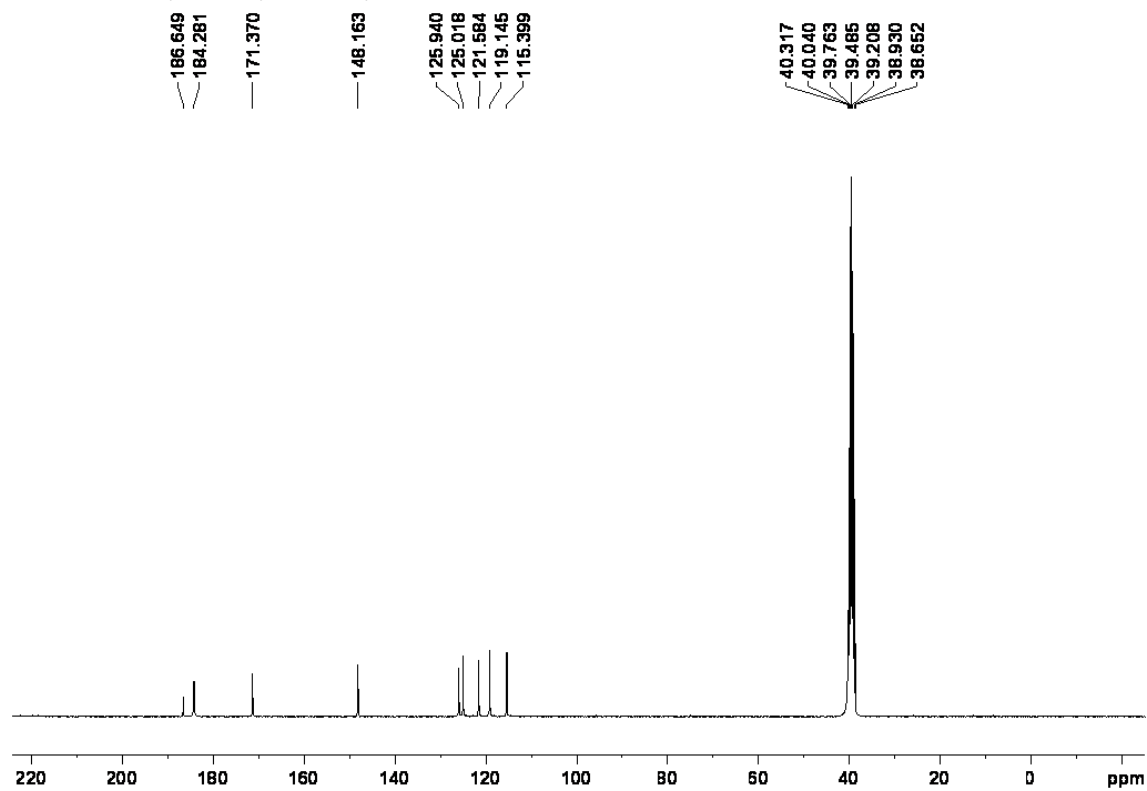
**3-(*p*-hidroxifenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5d).**

<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



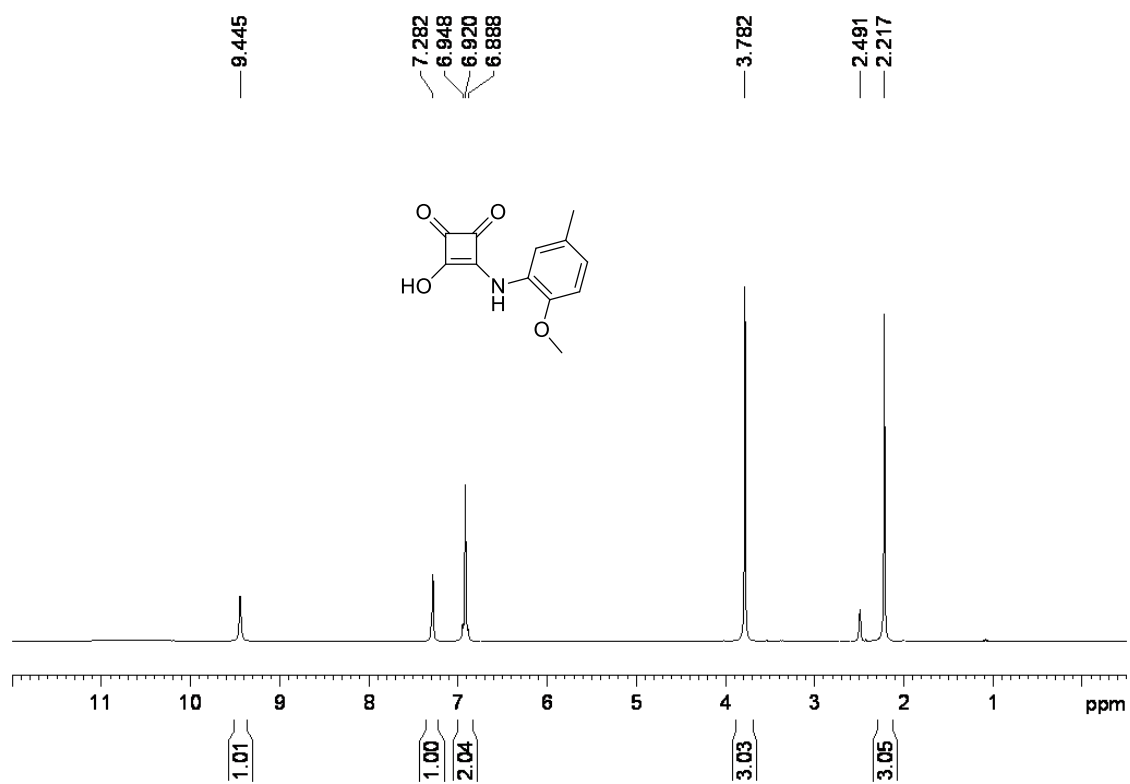
<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K



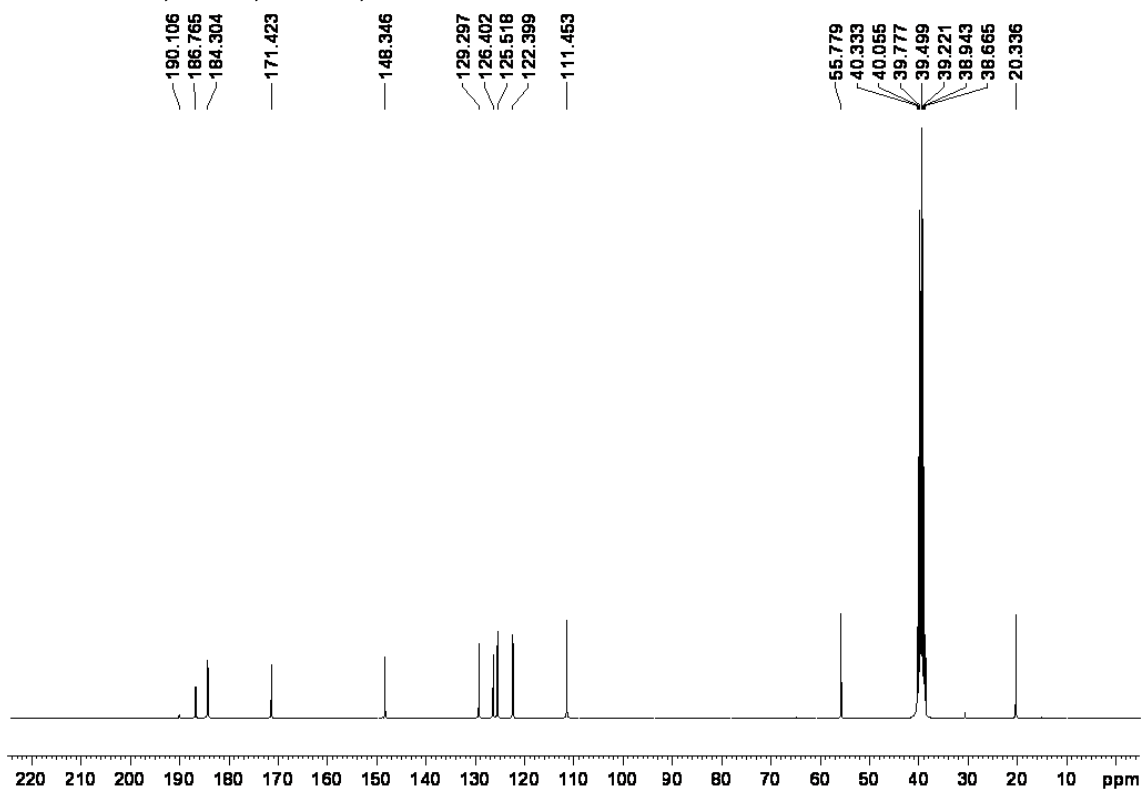
3-(*o*-hidroxifenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5e). $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

**3-(2-metoxi-5-metilfenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5f).**

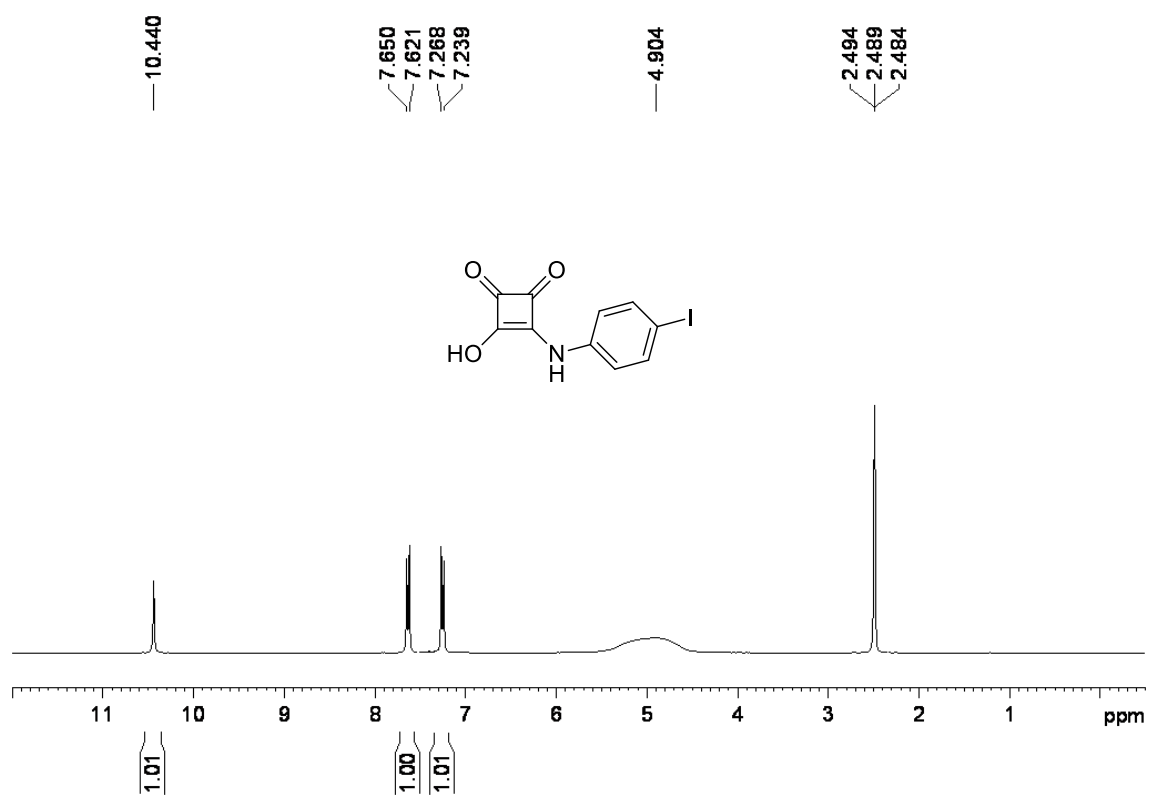
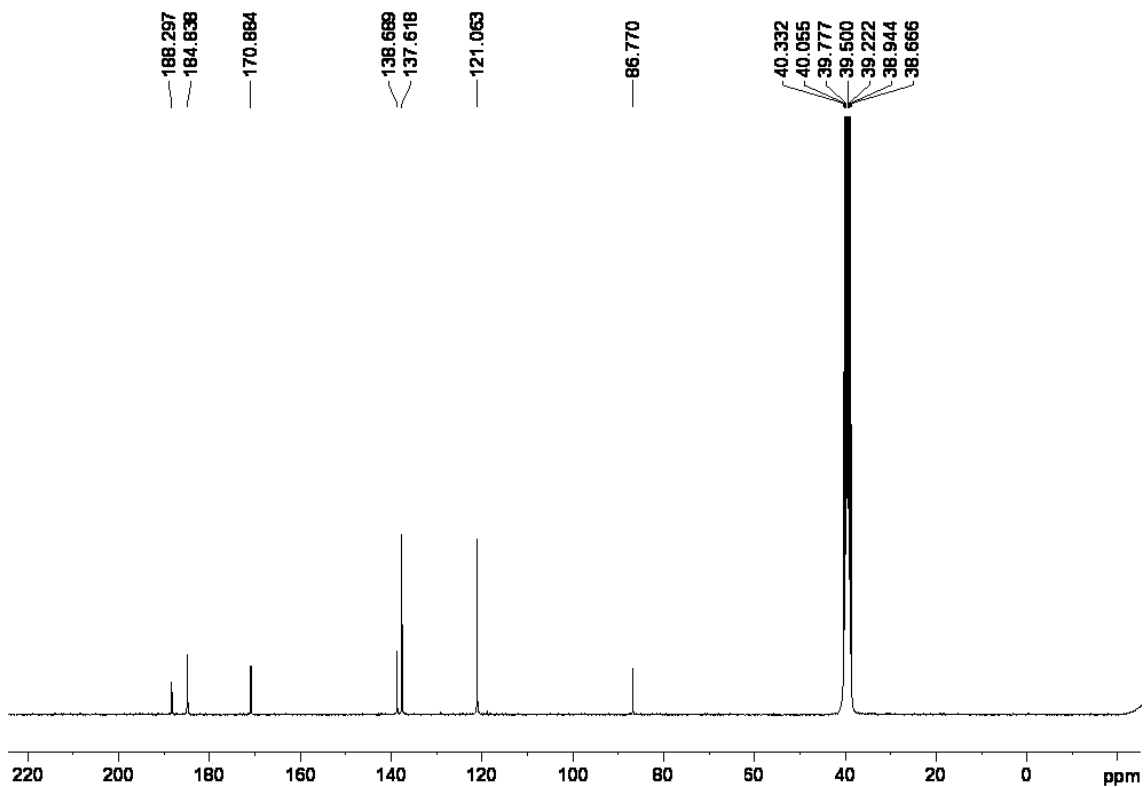
<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

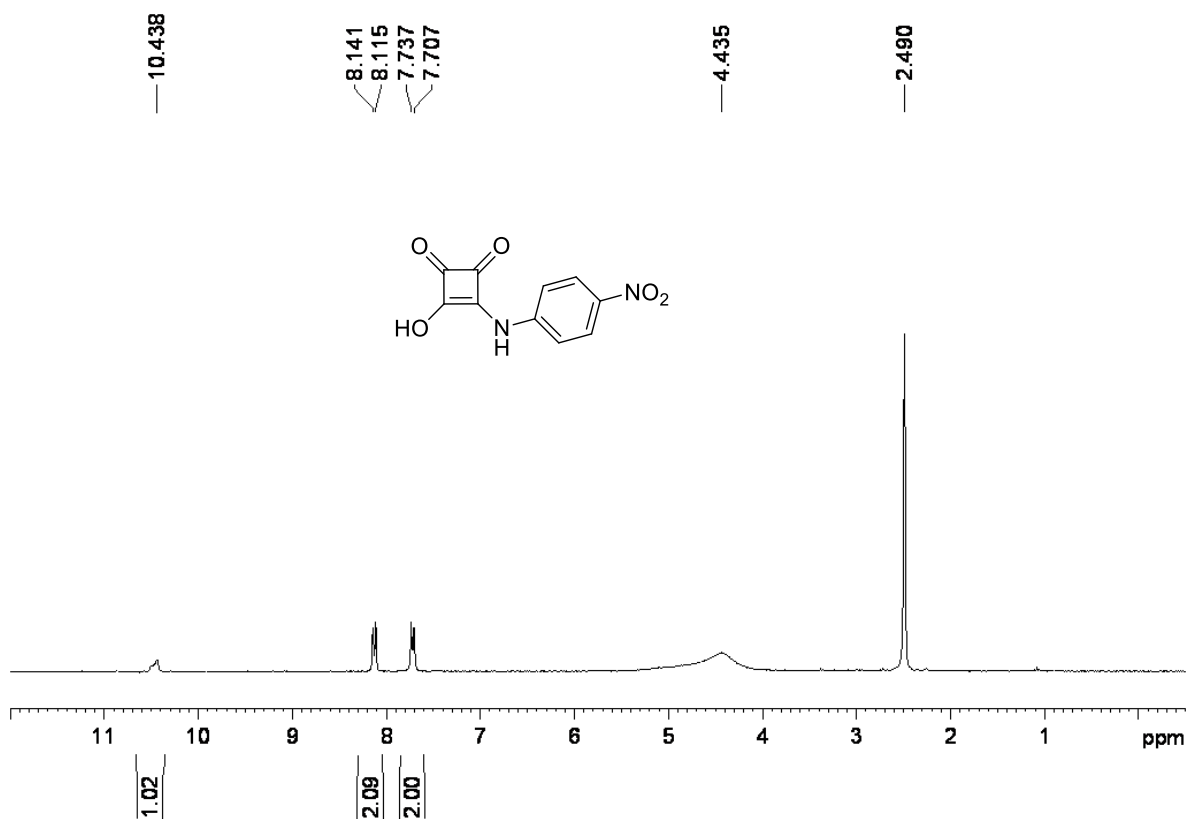


## 3-(p-Iodofenilamino)-3-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5g).

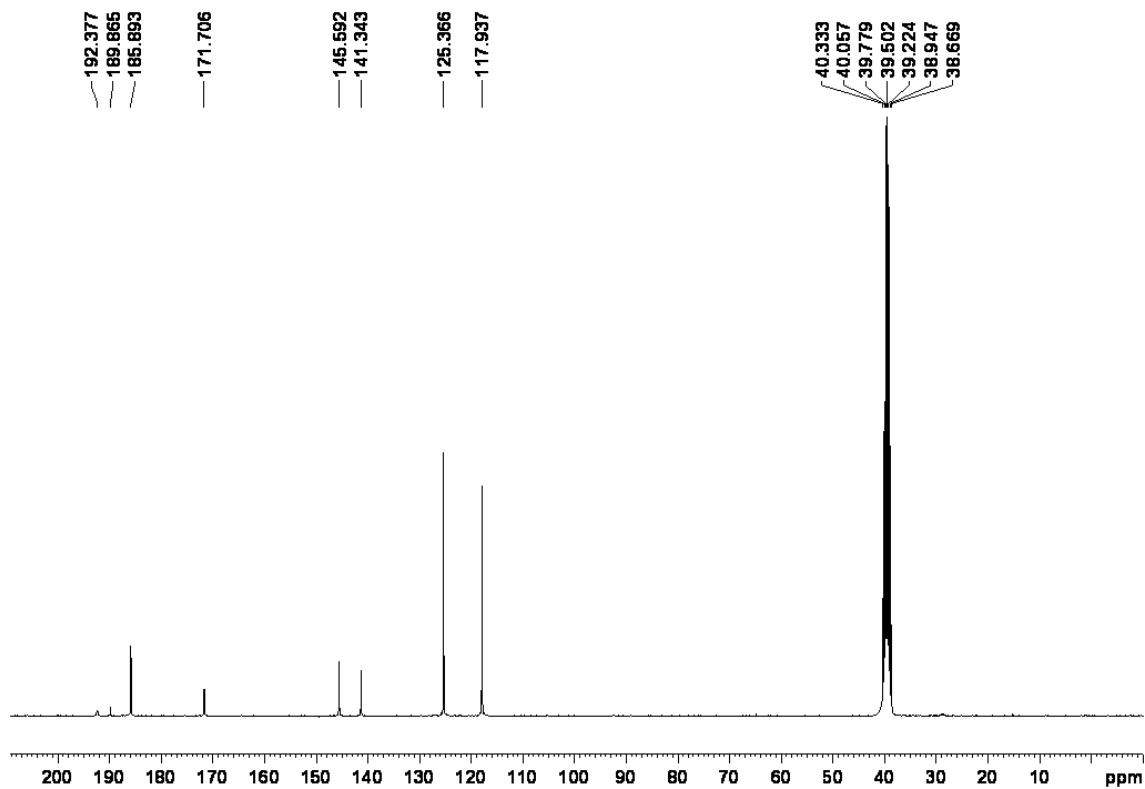
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

3-(*p*-nitrofenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5h).

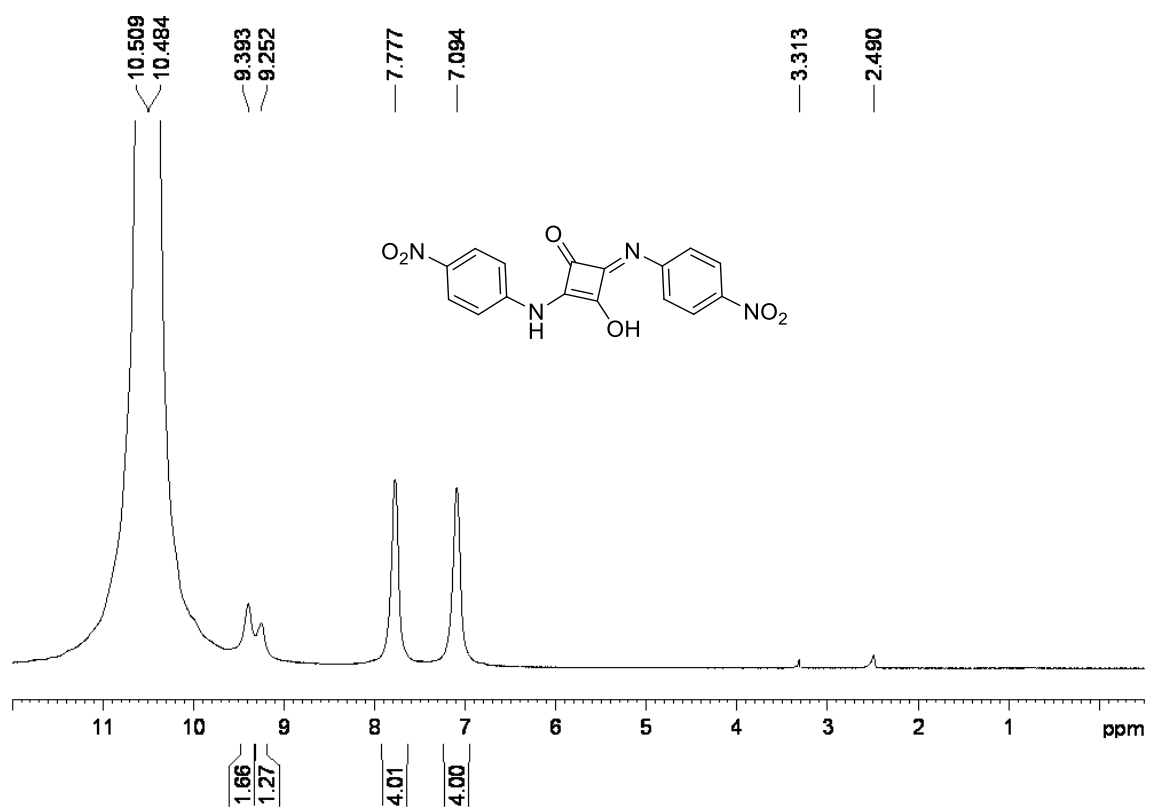
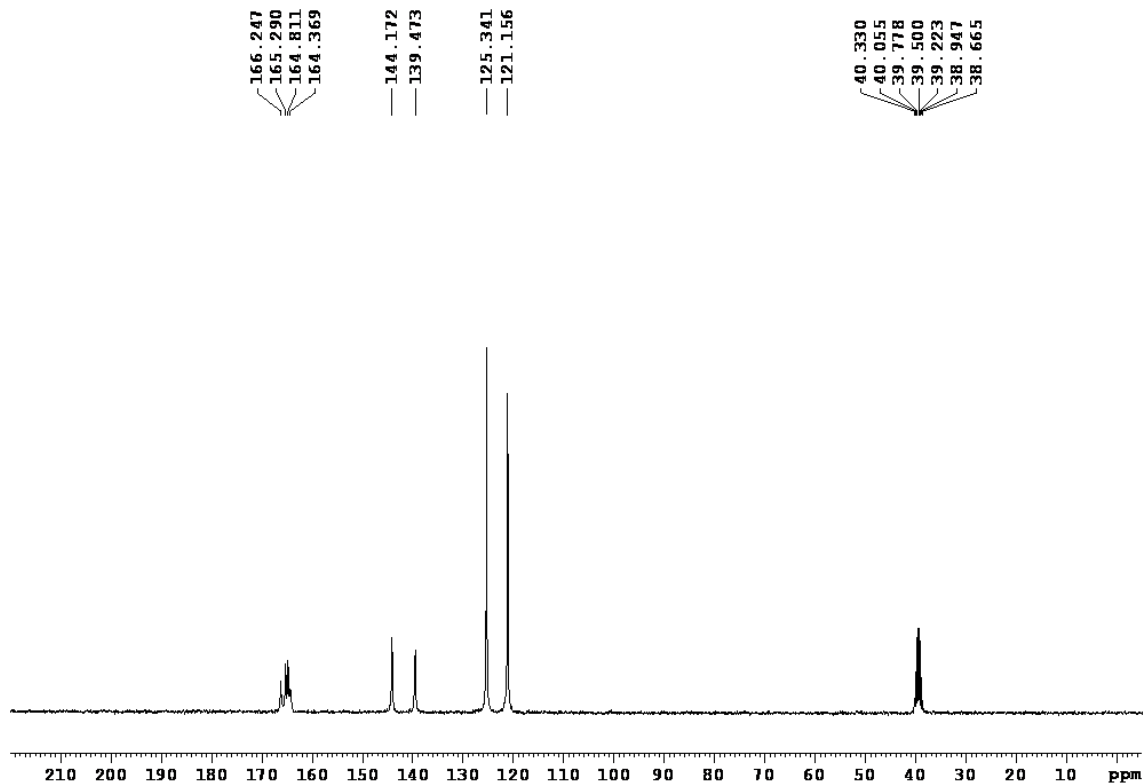
<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

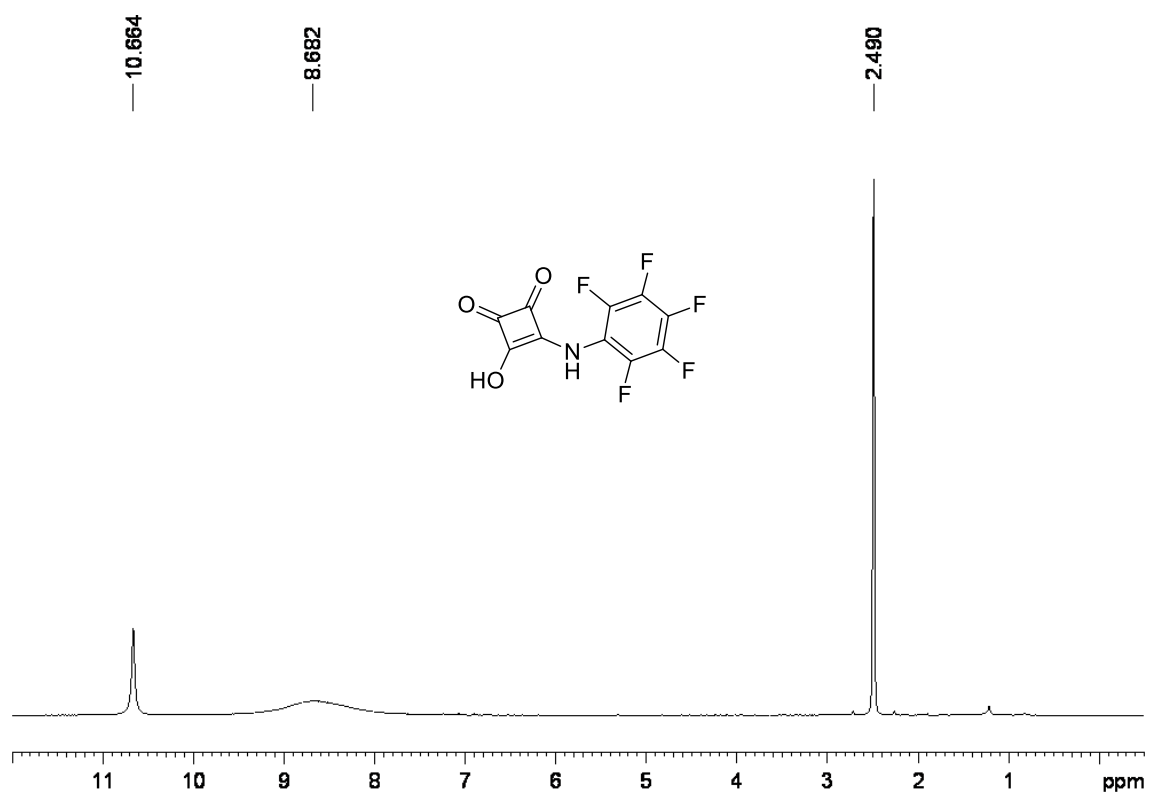


## 3-hidroxi-2-((4-nitrofenil)amino)-4-((4-nitrofenil)imino)ciclobut-2-enona (3h).

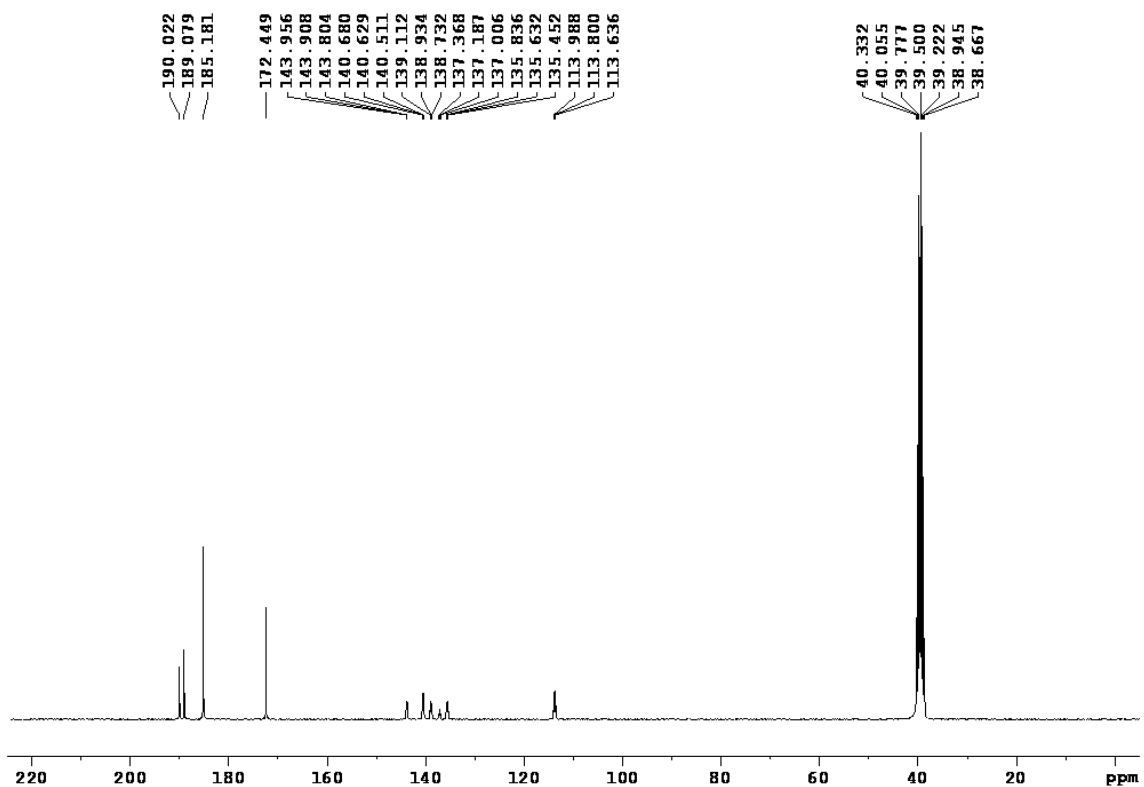
 $^1\text{H}$  NMR,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{DMSO-}d_6$ , 75 MHz, 298 K

3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5i).

$^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K

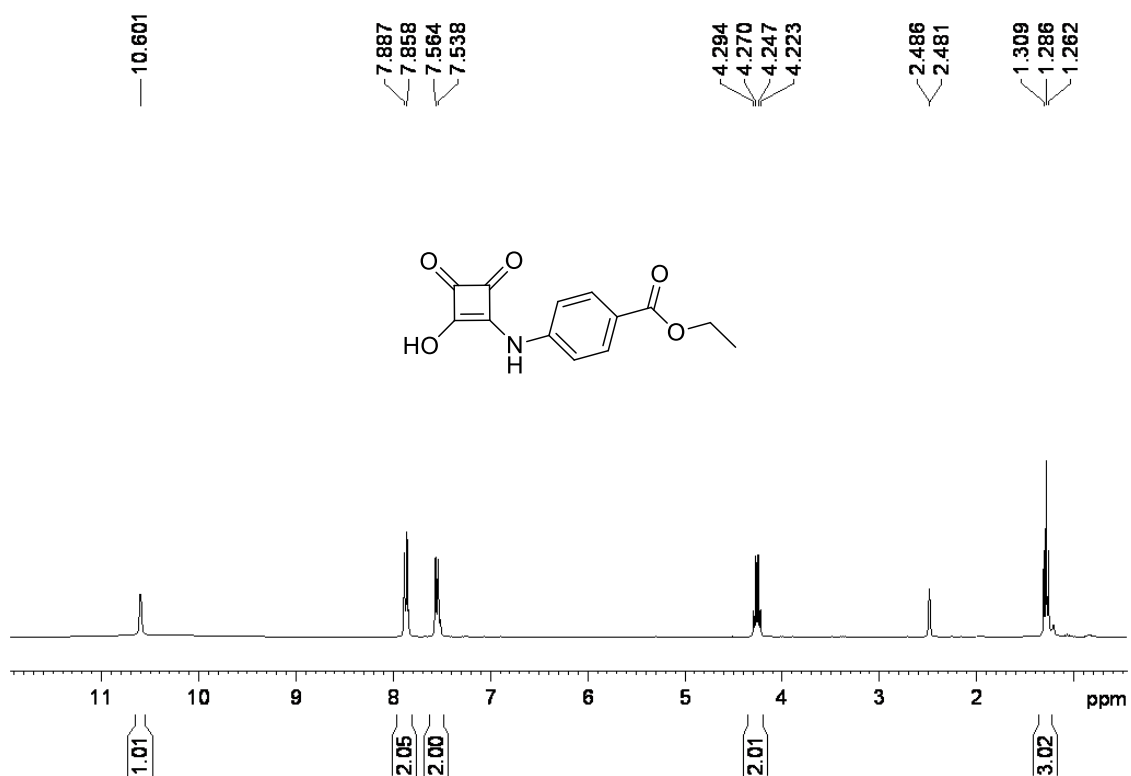
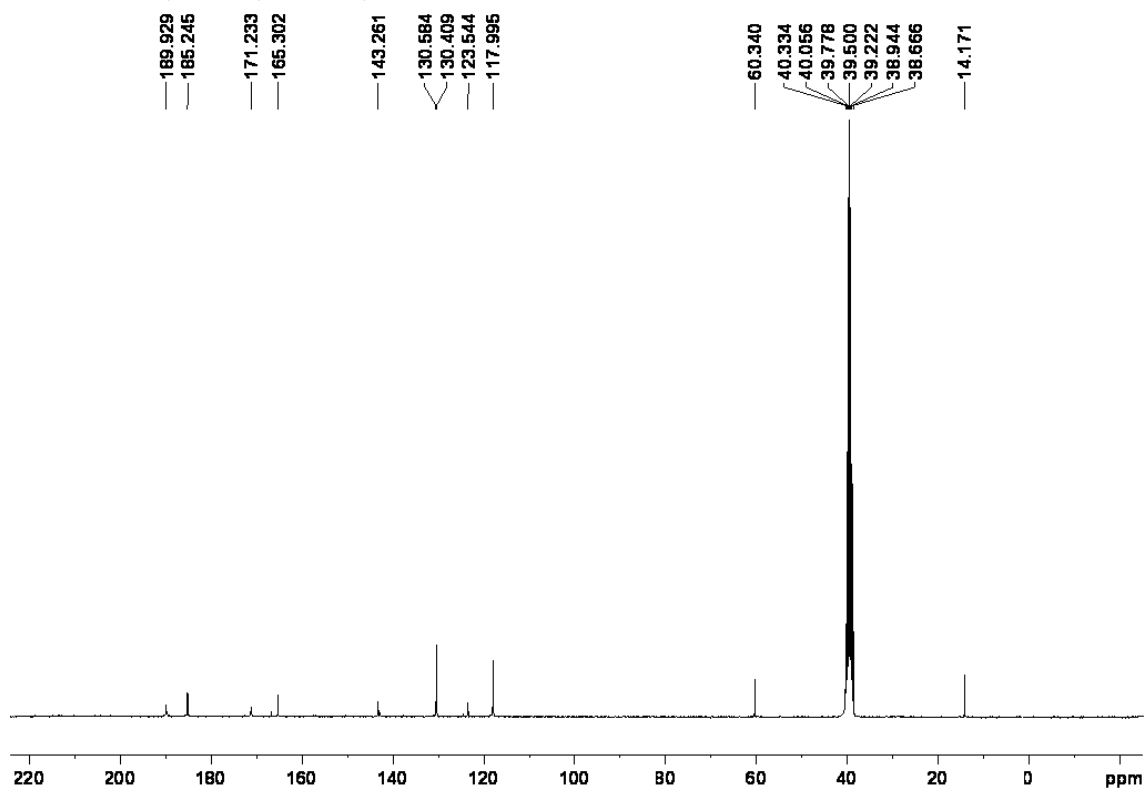


$^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K



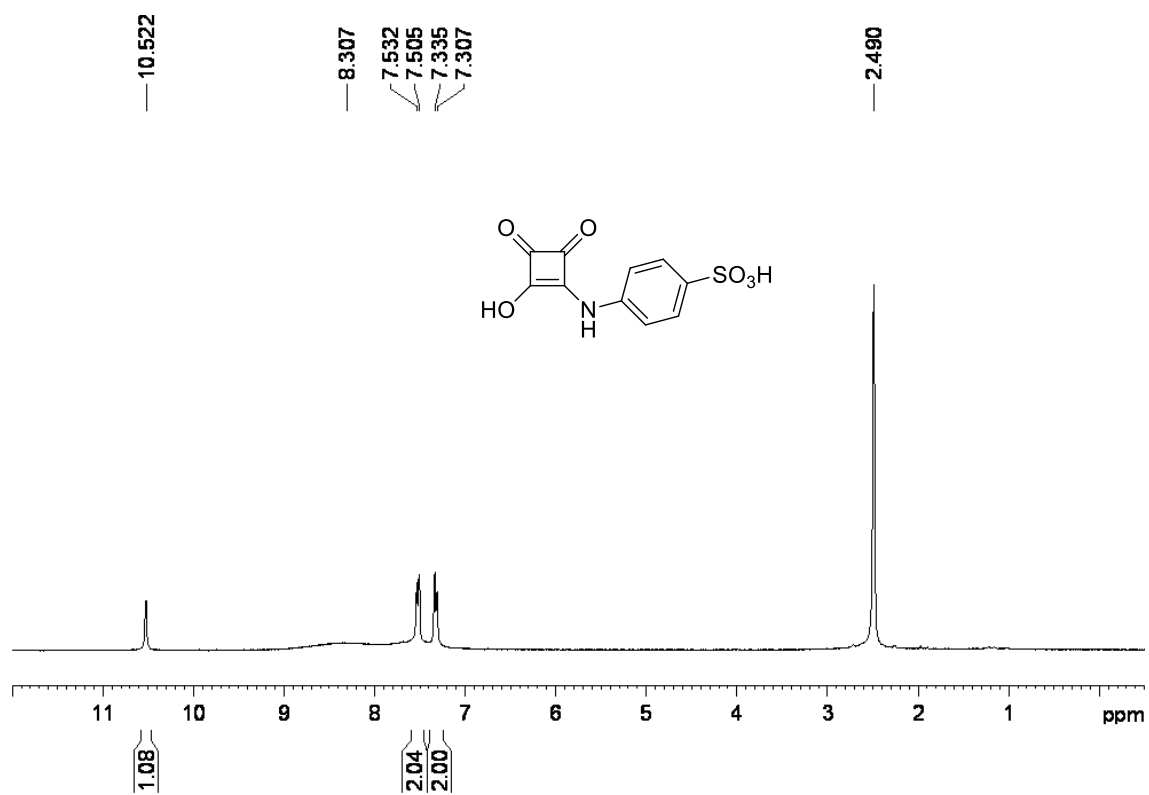


## 3-(4-carboxietilfenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5j).

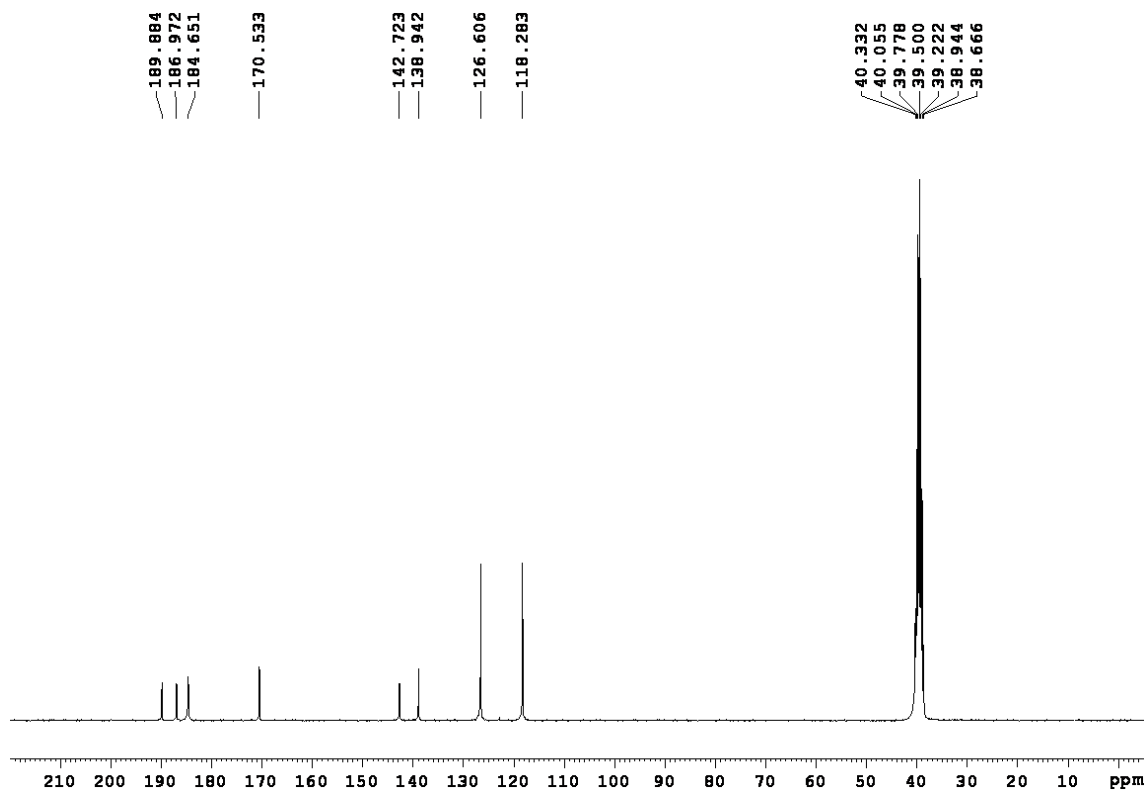
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

Ácido 4-((2-hidroxi-3,4-dioxociclobut-1-en-1-il)amino)benzenosulfónico (5k).

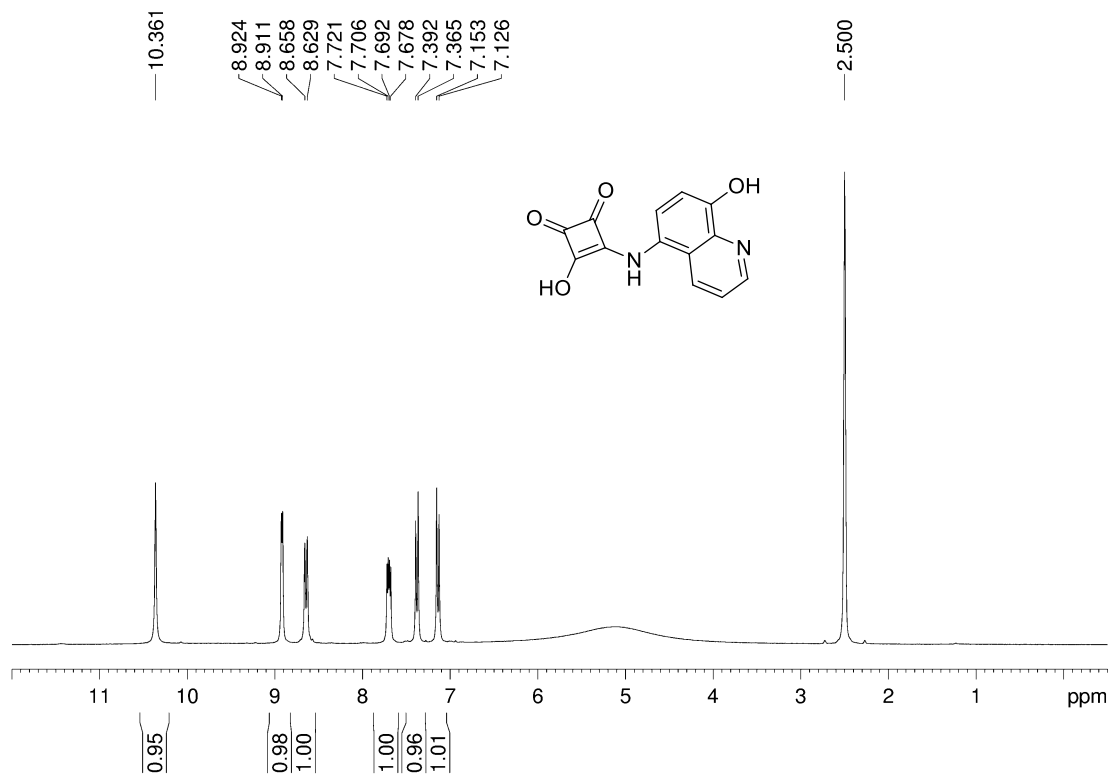
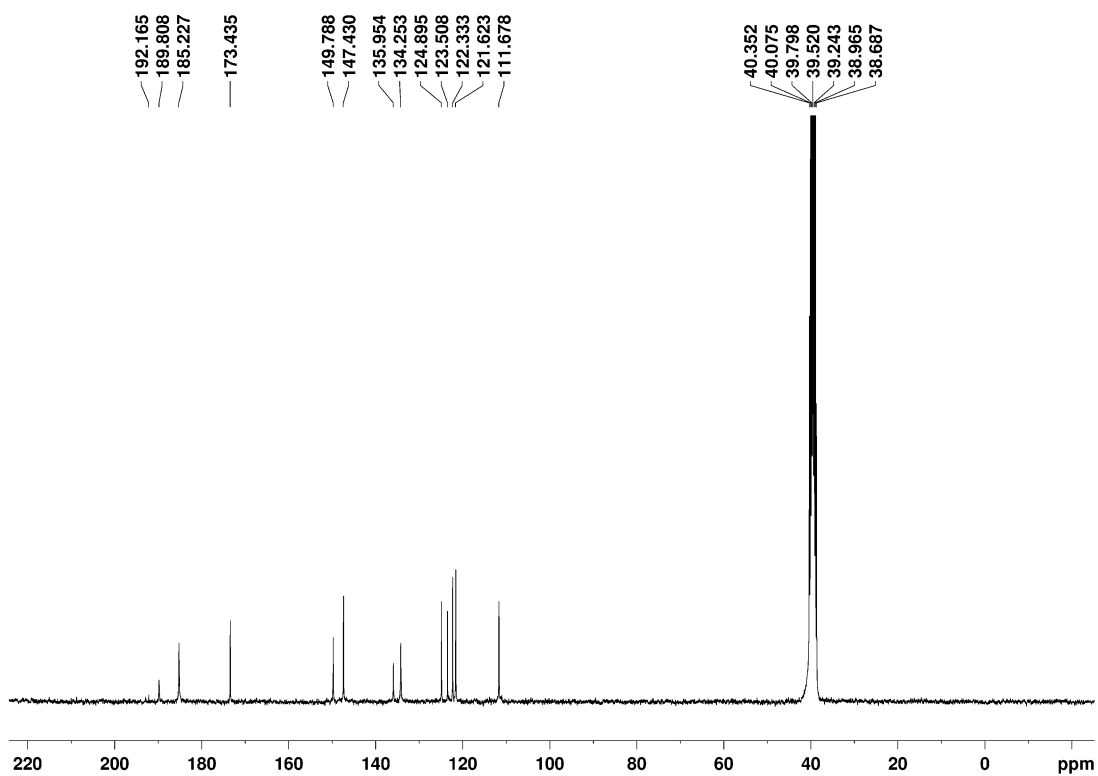
$^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



$^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

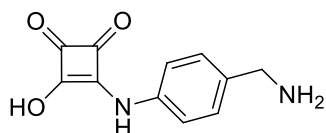
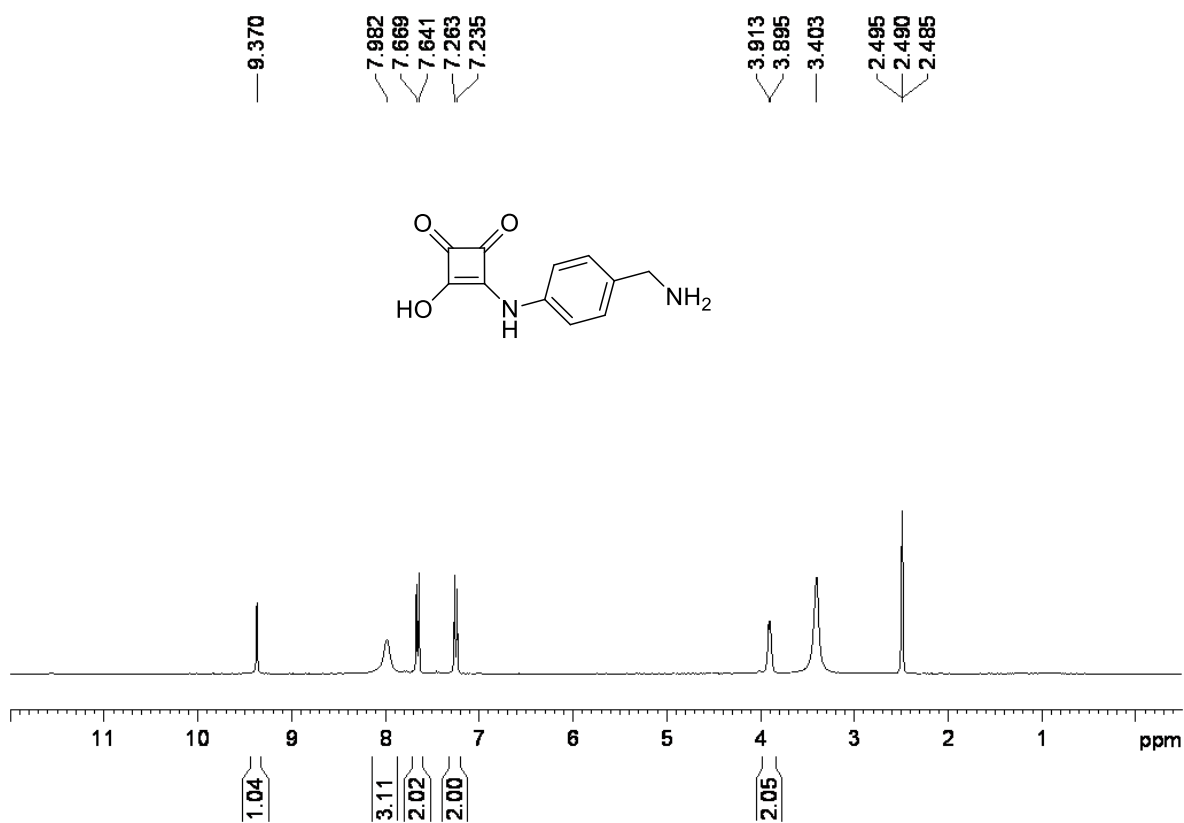


## 3-hidroxi-4-((8-hidroxiquinolein-5-il)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5I).

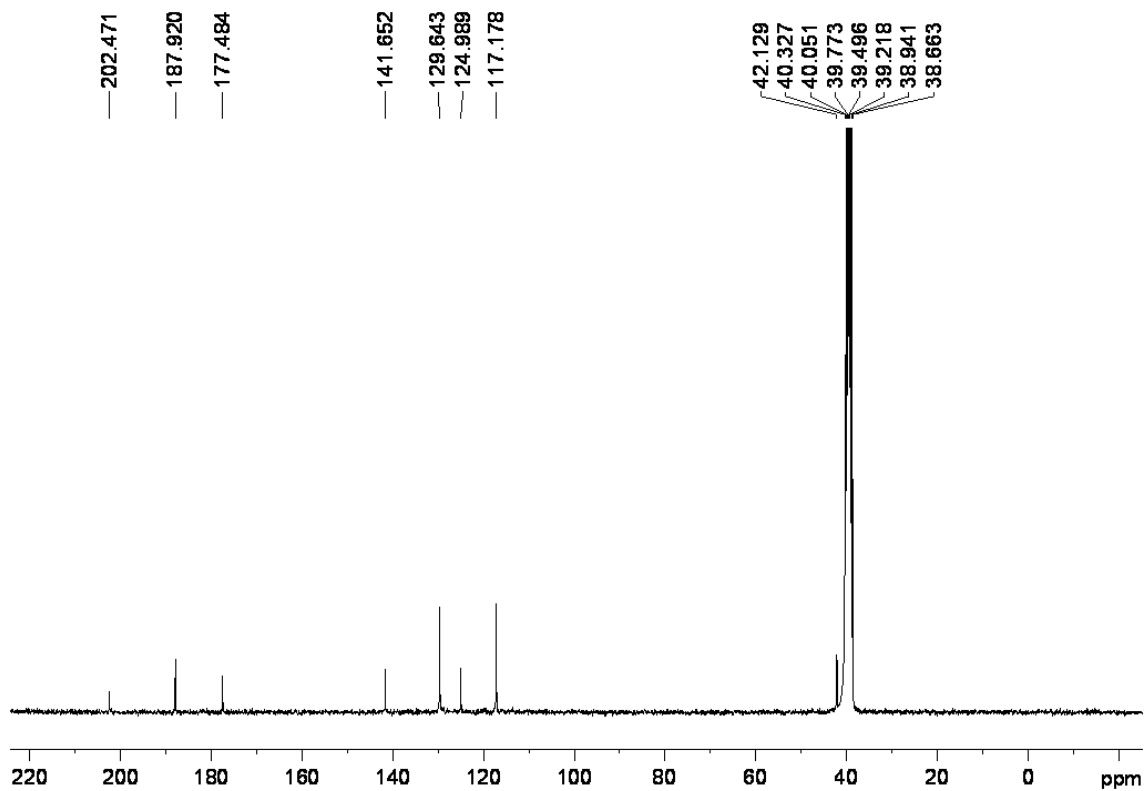
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

3-(4-(etilamino)fenilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5m).

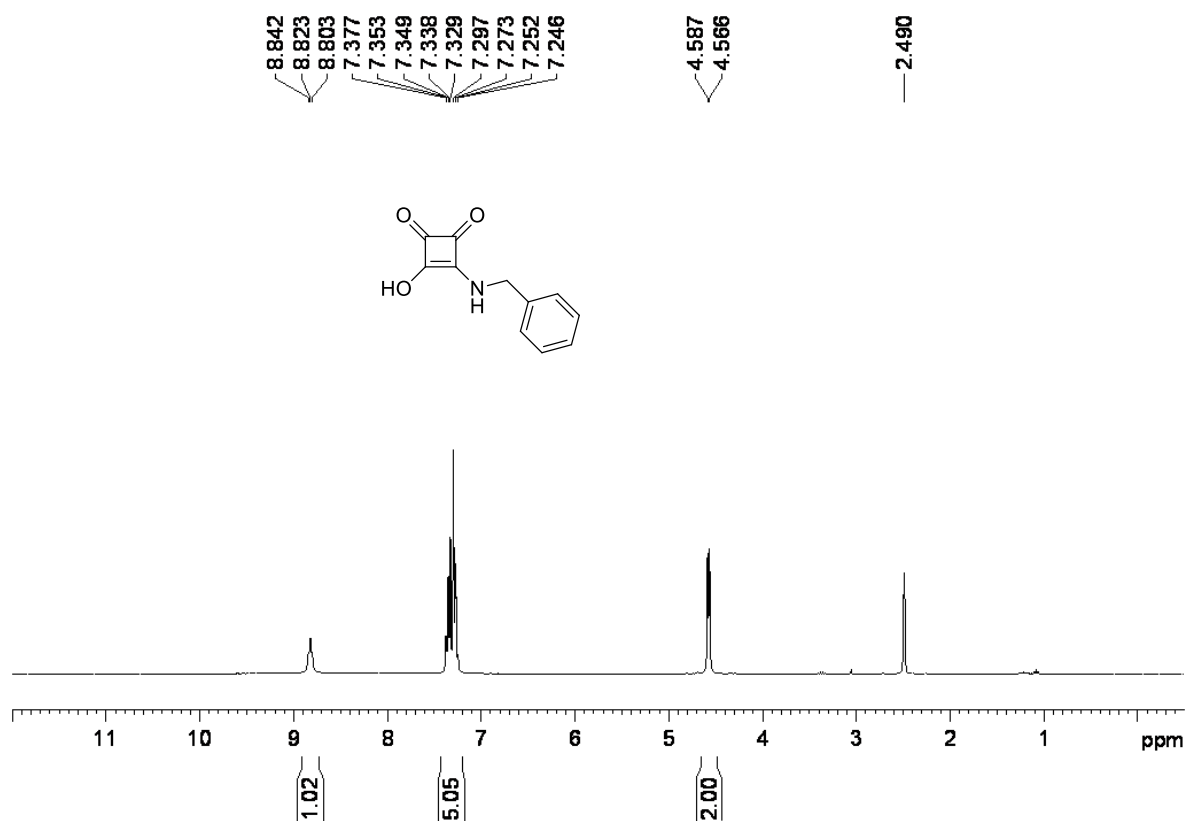
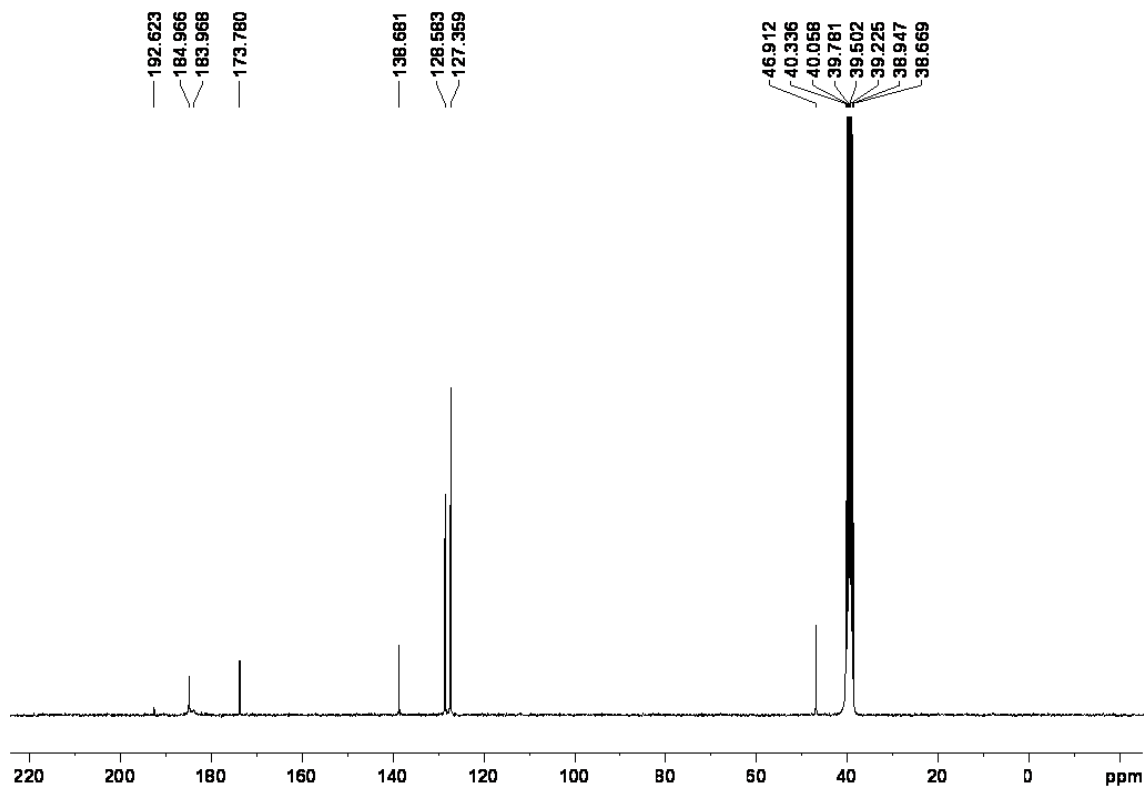
$^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



$^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

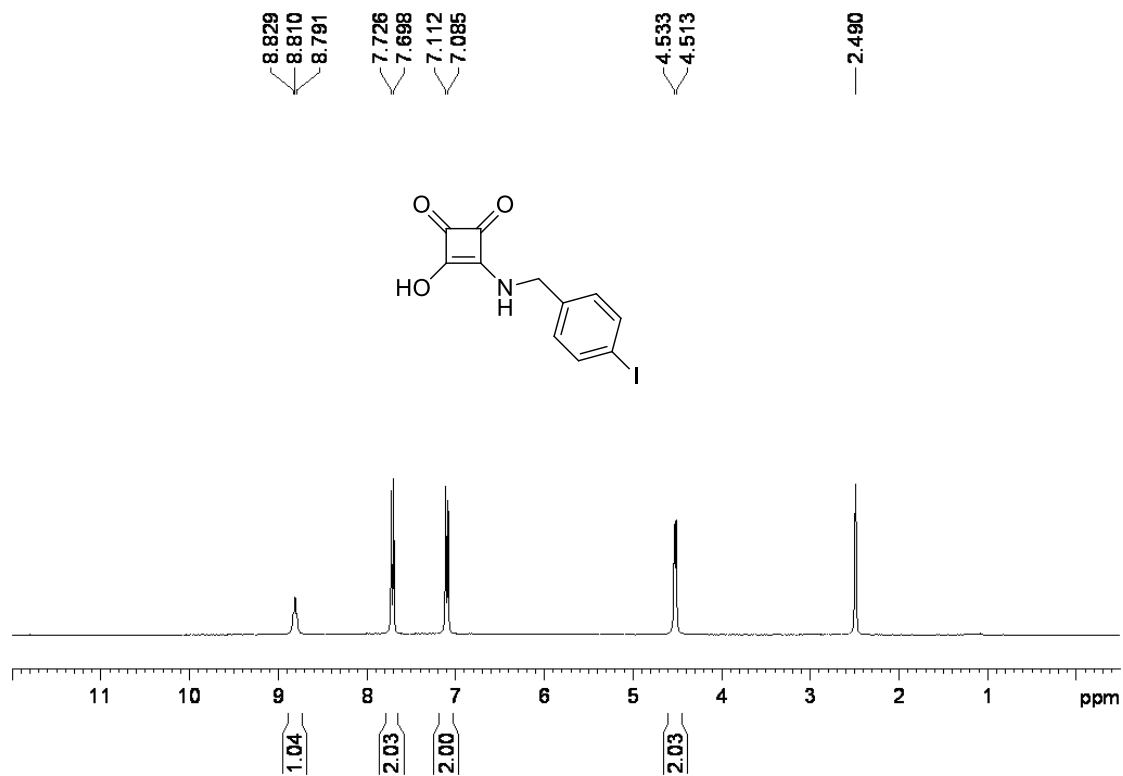


## 3-benzilamino-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5n).

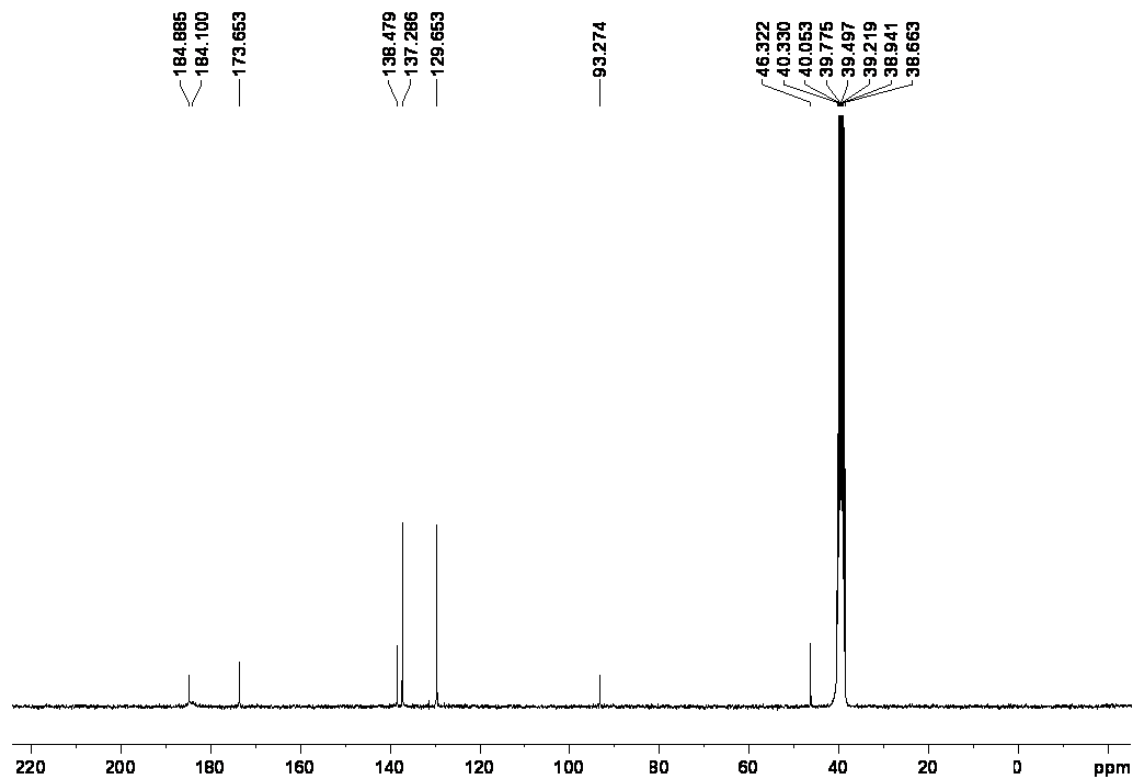
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

3-(4-iodobenzilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5o).

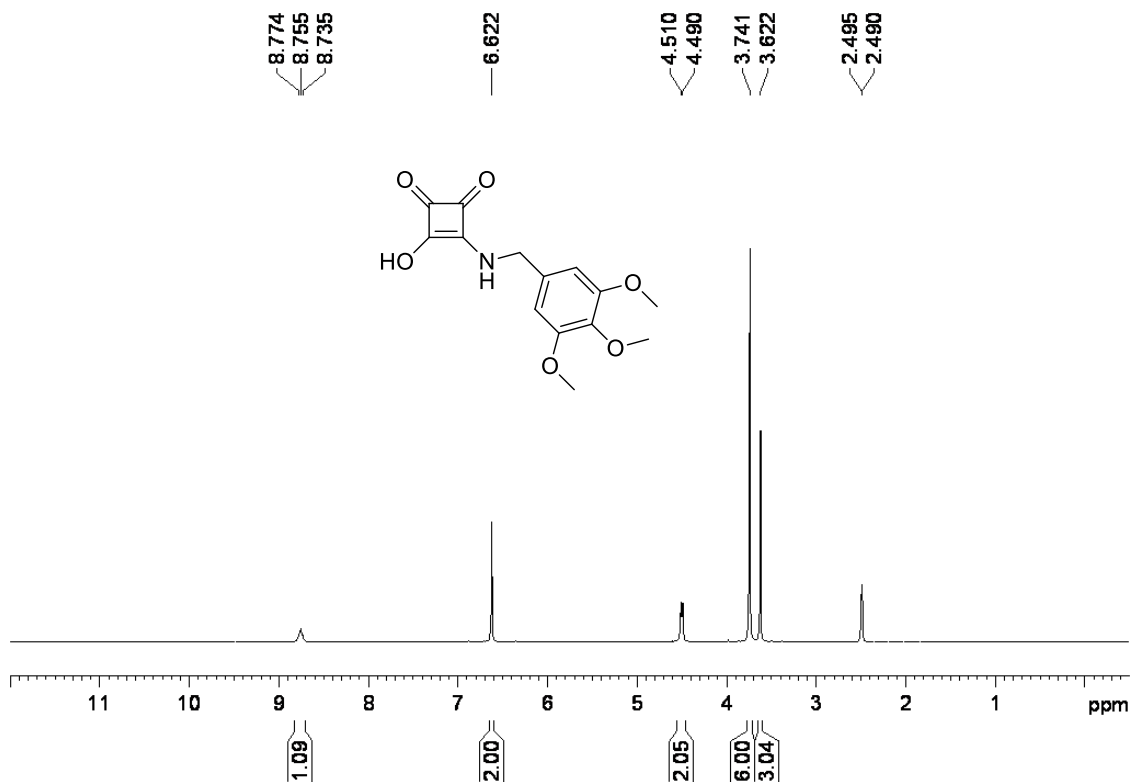
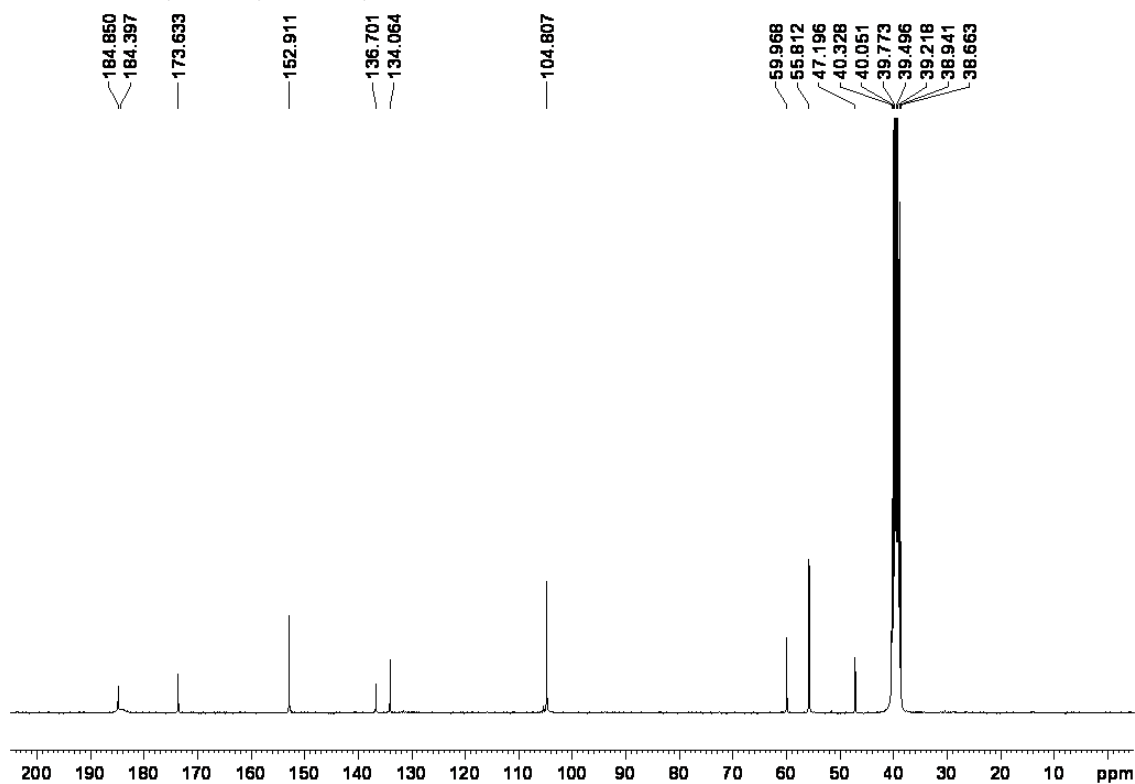
<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

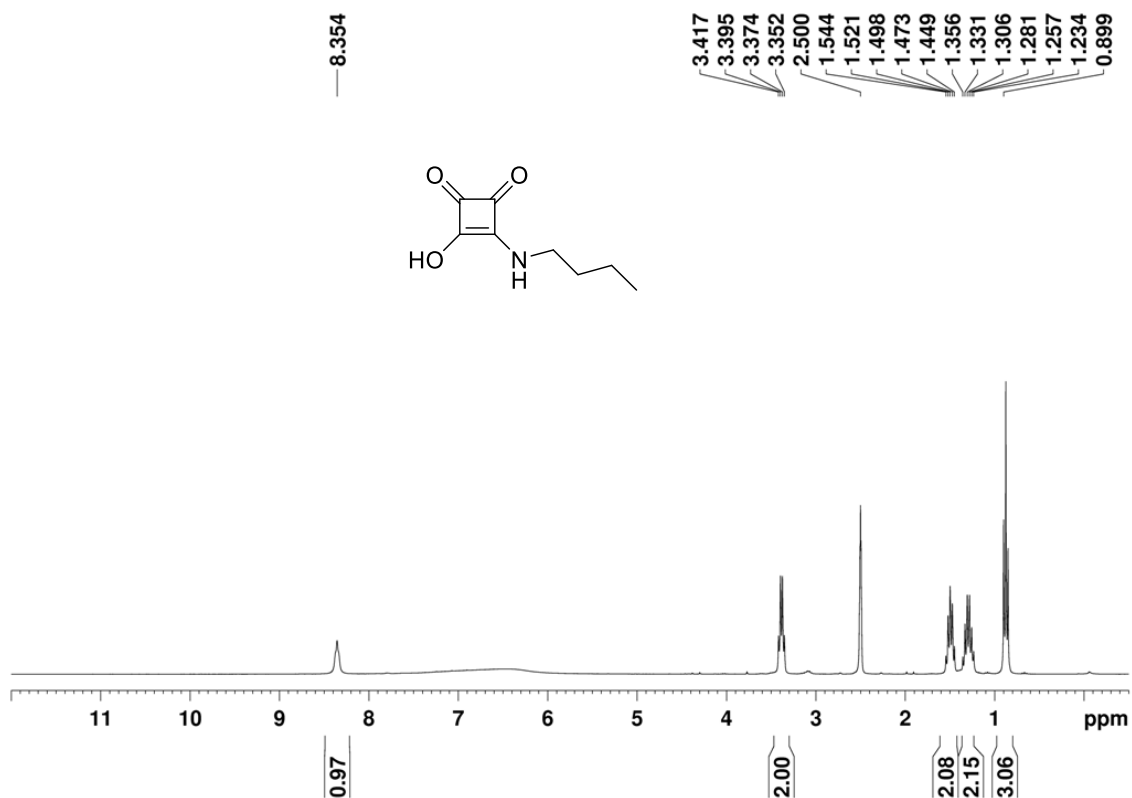


## 3-(3,4,5-trimetoxibenzilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5p).

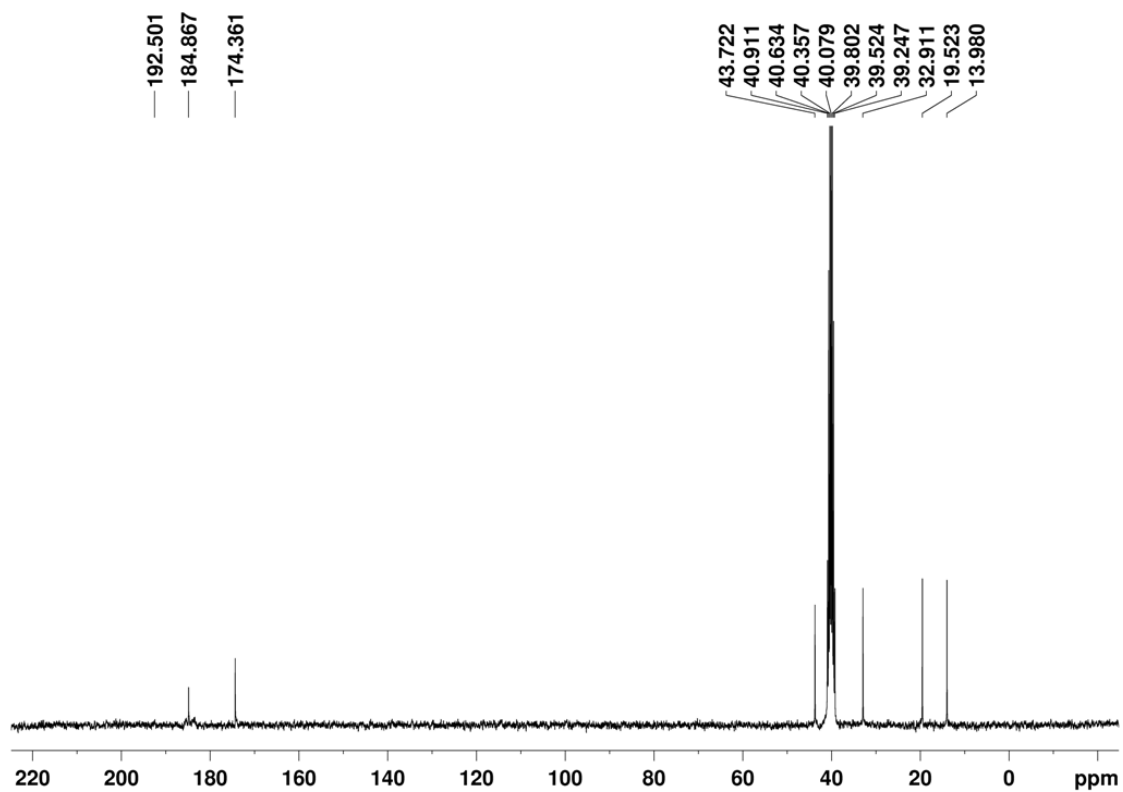
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

**3-(butilamino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (5q).**

<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K





***Capítulo 3: Adsorción de ácidos escuarámicos de cadena larga sobre superficies de aluminio.***





## 3.1. Introducción

### 3.1.1. Modificación química de superficies metálicas

Muchos dispositivos electrónicos diseñados como sensores de analitos de interés medioambiental y/o biomédico utilizan elementos metálicos como componentes activos del sistema sensor. Por componente activo debe entenderse aquella parte del sensor destinada a detectar un determinado analito. Éste, en muchas ocasiones, está constituido por un metal, por ejemplo en forma de electrodo, micropalanca, etc. que responde a la adsorción de un analito en cuestión. El control de las propiedades de la superficie metálica resulta imperativo cuando dichos componentes se miniaturizan y se integran en dispositivos electrónicos o bien optoelectrónicos. La funcionalización química de la superficie metálica del sensor por moléculas orgánicas es una herramienta que permite el control efectivo y la modificación de dichas propiedades.<sup>75</sup>

En líneas generales, los métodos utilizados para llevar a cabo este tipo de deposición se pueden resumir en dos: la unión con el metal de una monocapa de moléculas autoensambladas ("Self Assembled Monolayer" SAM),<sup>76</sup> o la deposición de una estructura polimérica constituida por un conjunto de capas.<sup>77</sup> Ambas estrategias presentan ventajas y desventajas. En esta introducción nos centramos en la primera de ellas.

Una monocapa autoensamblada (SAM) está compuesta por moléculas orgánicas que generalmente presentan un grupo capaz de quimisorberse sobre el substrato metálico, en un extremo, y un grupo que interacciona con el medio, en el extremo contrario. Ambas partes se unen mediante un espaciador, generalmente apolar, que propicia el alineamiento de una molécula con otra mediante fuerzas de Van der Waals (Figura 3.1).<sup>78</sup>

La deposición de monocapas permite controlar tanto las estructuras formadas como las propiedades que se aportan al substrato. Sin embargo, dada la no covalencia de las interacciones responsables del alineamiento de las cadenas hidrocarbonadas del espaciador, las monocapas depositadas resultan menos resistentes que los recubrimientos poliméricos

---

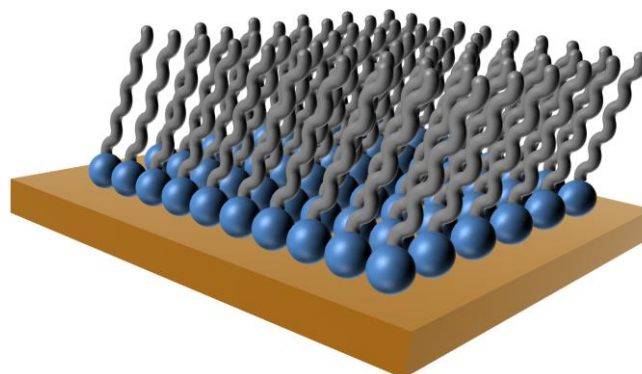
<sup>75</sup> S. P. Pujari, L. Scheres, A. T. M. Marcelis, H. Zuilhof, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 6322–6356.

<sup>76</sup> T. Kondo, R. Yamada, K. Uosaki, *Organized Organic Ultrathin Films, Fundamentals and Applications, Wiley-VCH, Weinheim*, **2013**, 7 – 42.

<sup>77</sup> F. Renate, S. Holger, A. J. A. Tobias, *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology, Wiley-VCH, Weinheim*, **2009**.

<sup>78</sup> (a) A. Ulman. *An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir–Blodgett to Self-Assembly, Academic Press, California*, **1991**, p. 237; (b) A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.

cuando entran en contacto con el medio. Un ejemplo clásico de monocapa es el constituido por monocapas de tioles de cadena larga depositadas sobre láminas de oro.<sup>79</sup>



**Figura 3.1.** Representación de una monocapa autoensamblada (SAM) sobre una superficie metálica

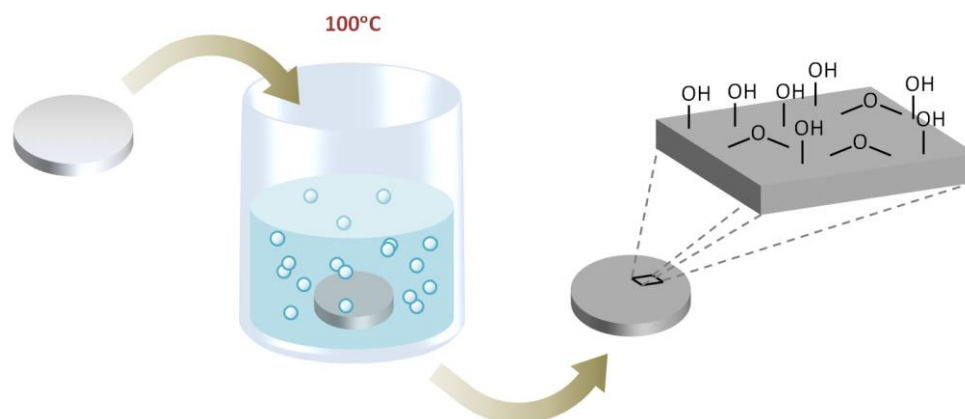
La forma habitual de conseguir una adsorción resistente a la degradación implica la utilización de moléculas orgánicas que se unan fuertemente con el sustrato metálico, ya sea mediante la formación de enlaces covalentes, covalentes coordinados o bien mediante enlaces iónicos. A partir de esta premisa se han investigado todo un abanico de compuestos capaces de unirse covalentemente tanto a óxidos como a otros componentes metálicos que, tras una conveniente activación, puedan presentar grupos hidroxilos superficiales (-OH). Dependiendo del compuesto y del sustrato metálico al que esté unido, se obtienen materiales con propiedades diferentes y resistencias variables al desgaste producido por la degradación de la capa molecular. En general, como paso previo a la formación de la capa molecular, el sustrato metálico deberá "activarse". En el caso de los metales de transición como el Al, Cu, etc., el proceso de activación consiste en un tratamiento químico-físico destinado a generar una superficie metálica hidroxilada que permita el anclaje de la monocapa. Este procedimiento de activación puede llevarse a cabo de varias maneras, dependiendo del material en cuestión.

En esta Memoria se ha utilizado un sustrato base de aluminio, cuya superficie se ha activado sumergiendo la muestra en agua hirviendo durante unos minutos para generar una capa de pseudoboehmita, un oxohidróxido de aluminio (AlOOH) (Figura 3.2).

La galería de grupos funcionales capaces de llevar a cabo uniones covalentes con óxidos metálicos es muy extensa. Los más habituales son sililéteres, fosfonatos, carboxilatos,

<sup>79</sup> (a) J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169; (b) C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1805 – 1834; (c) E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, G. Benítez, A. A. Rubert, R. C. Salvarezza, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1183 – 1192; (d) H. Häkkinen, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443 – 455.

catecoles, alquenos, alquinos y aminas, entre otros. El tipo de compuesto con el que se ha trabajado en este capítulo para conseguir su quimisorción sobre aluminio han sido ácidos escuarámicos de cadena larga, para los cuales no hay antecedentes en este tipo de aplicación. Los ácidos escuarámicos son isómeros de los ácidos carboxílicos y fosfónicos, los cuales sí se han utilizado para generar monocapas moleculares sobre aluminio. El material resultante constituye un precedente del trabajo realizado en esta Memoria y por ello se describen a continuación.



**Figura 3.2.** Tratamiento de activación llevado a cabo sobre aluminio con agua hirviendo para la obtención de una capa superficial de oxo-hidróxido de aluminio (AlOOH).

### 3.1.2. Quimisorción de ácidos carboxílicos sobre superficies metálicas

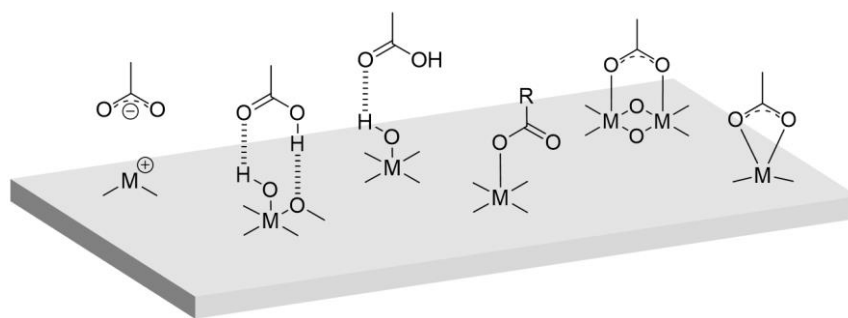
Los ácidos carboxílicos de cadena larga son los compuestos más estudiados a la hora de preparar monocapas sobre superficies metálicas oxidadas. La unión metal-carboxilato se ha definido como un complejo de adsorción.<sup>80</sup> Esto significa que, a diferencia de otros grupos como pueden ser los ácidos fosfónicos, no se establece un enlace covalente entre monocapa y sustrato sino una unión de tipo iónico y/o por coordinación del grupo carboxilato aniónico sobre centros deficientes del metal. Como consecuencia las monocapas de carboxilato resultan menos resistentes a la degradación hidrolítica que las preparadas a partir de derivados fosfónicos. Sin embargo, la gran variedad de ácidos carboxílicos disponibles ofrece un mayor margen de maniobra a la hora de modular las propiedades superficiales de la monocapa.

Los tres métodos más habituales para la quimisorción de ácidos carboxílicos son los siguientes:

<sup>80</sup> D. J. Miller, L. Sun, M. J. Walzak, N. S. McLntyre, D. Chvedov, A. Rosenfeld, *Surf. Interface Anal.* **2003**, 35, 463 - 476.

- Técnicas de tipo Langmuir-Blodgett. En este caso se lleva a cabo la formación previa de la monocapa en agua. La monocapa resultante se compacta mecánicamente y se orienta, para transferirla luego al sustrato metálico mediante la técnica de Langmuir-Blodgett.<sup>81</sup> De esta manera se consigue un elevado grado de ordenación, aunque la interacción con el sustrato metálico sea pobre debido a la presencia de agua.
- Deposición en fase vapor. La deposición del ácido carboxílico se lleva a cabo a partir de un aerosol aplicado mediante un spray, consiguiendo así el crecimiento de la monocapa en fase vapor.
- Deposición a partir de disoluciones líquidas. Este método es el más común. Requiere el uso de disolventes apolares y tiempos de exposición mucho más elevados. Además, dependiendo del sustrato, es necesario llevar a cabo un post-tratamiento térmico para aumentar la estabilidad de la monocapa, forzando la formación de complejos bidentados.<sup>82</sup>

Los ácidos carboxílicos pueden presentar varios modos de unión, dependiendo del sustrato metálico.<sup>83</sup> La unión más frecuente se lleva a cabo mediante una coordinación tipo metal-éster monodentada o bidentada para formar carboxilatos metálicos. La unión puede ser por coordinación a un único centro metálico o bien haciendo de ligando puente entre dos centros. Otra posibilidad es la unión mediante una reacción ácido base, quedando ligado el carboxilato correspondiente a un centro ácido de Lewis de la superficie metálica (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Posibles modos de unión de los grupos COOH y COO<sup>-</sup> a una superficie metálica oxidada.

<sup>81</sup> L. H. Dubois, B. R. Zegarski, R. G. Nuzzo, *Langmuir*. **1986**, 2, 412 - 417.

<sup>82</sup> A. Raman, E. S. Gawalt, *Langmuir*. **2007**, 23, 2284 - 2288.

<sup>83</sup> (a) D. J. Miller, L. Sun, M. J. Walzak, N. S. McLntyre, D. Chvedov, A. Rosenfeld, *Surf. Interface Anal.* **2003**, 35, 463 - 476; (b) T. Bauer, T. Schmaltz, T. Lenz, M. Halik, B. Meyer, T. Clark, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 6073 - 6080; (c) I. V. Chernyshova, S. Ponnuram, P. Somasundaran, *Langmuir* **2011**, 27, 10007 - 10018; (d) S. Ponnuram, I. V. Chernyshova, P. Somasundaran, *Langmuir*. **2012**, 28, 10661 - 10671; (e) S. Pawsey, K. Yach, J. Halla, L. Reven, *Langmuir*. **2000**, 16, 3294 - 3303; (f) G. G. Ting, O. Acton, H. Ma, J.W. Ka, A. K. Y. Jen, *Langmuir*. **2009**, 25, 2140 - 2147.

### 3.1.3. Quimisorción de ácidos fosfónicos y fosfonatos sobre superficies metálicas

Los ácidos fosfónicos y sus ésteres derivados (Figura 3.4) componen una familia de compuestos ampliamente utilizados para la funcionalización de superficies metálicas. La técnica más común para la formación de monocapas es el recubrimiento por inmersión. Éste consiste en sumergir durante un tiempo determinado el sustrato metálico en una disolución que contiene el compuesto destinado a quimisorberse.<sup>84</sup> El abanico de disolventes utilizados con derivados fosfónicos es muy amplio, incluyendo agua. Sin embargo, se ha demostrado que los disolventes poco polares, y por tanto que interactúan en menor medida con la superficie metálica, promueven la formación de SAMs más densas y estables.<sup>85</sup> Así, en un medio predominantemente apolar, las interacciones entre el grupo fosfónico y la superficie hidrofílica del sustrato se ven favorecidas, permitiendo un recubrimiento rápido. Sin embargo, dependiendo del tipo de sustrato metálico, para llevar a cabo la unión covalente final con el derivado fosfónico, es necesario un tratamiento térmico previo, que puede consistir por ejemplo en el calentamiento de la muestra metálica justo antes de la deposición del producto.<sup>86</sup>

El mecanismo de quimisorción de los ácidos fosfónicos depende en gran medida de un conjunto de factores, como son el pH, la temperatura, la concentración del producto, el disolvente utilizado, y el tipo de sustrato metálico.<sup>87</sup> Sobre óxidos metálicos que sean ácidos de Lewis (p. ej.  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, etc.)<sup>88</sup> (Figura 3.4a), la quimisorción se inicia mediante la coordinación del oxígeno fosfónico (P=O) a un centro metálico. Este primer paso aumenta la electrofilia del átomo de fósforo, promoviendo el ataque por parte de los hidroxilos superficiales adyacentes, fijando así covalentemente el producto al sustrato metálico. En el caso de que no se trate de ácidos de Lewis (Figura 3.4b), las interacciones por puentes de hidrógeno entre el ácido fosfónico y los hidroxilos de la superficie son los que anclan inicialmente el producto a la superficie, de manera que puedan llevarse a cabo sucesivas reacciones de heterocondensación. En este caso puede ser necesario el tratamiento térmico antes mencionado para favorecer la reacción.

---

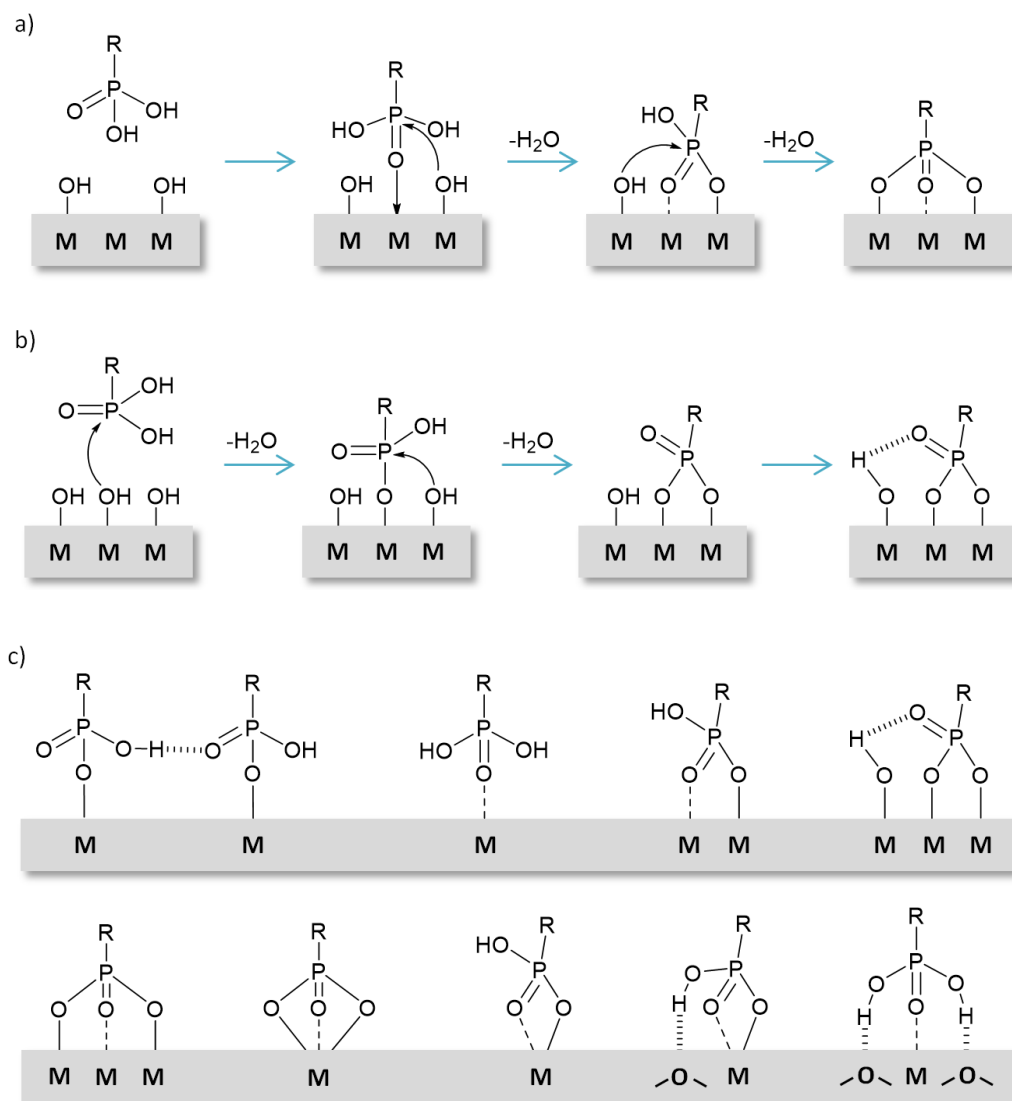
<sup>84</sup> P. Thissen, M. Valtiner, G. Grundmeier. *Langmuir*, **2010**, *26*, 156 - 164.

<sup>85</sup> X. Chen, E. Luais, N. Darwish, S. Ciampi, P. Thordarson, J. J. Gooding. *Langmuir*, **2012**, *28*, 9487 - 9495.

<sup>86</sup> A. Bulusu, S. A. Paniagua, B. A. MacLeod, A. K. Sigdel, J. J. Berry, D. C. Olson, S. R. Marder, S. Graham. *Langmuir*, **2013**, *29*, 3935 - 3942.

<sup>87</sup> (a) G. Guerrero, P. H. Mutin, A. Vioux. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 3161 - 3165; (b) P. H. Mutin, G. Guerrero, A. Vioux. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3761 - 3768; (c) T. Hauffman, O. Blajiev, J. Snauwaert, C. van Haesendonck, A. Hubin, H. Terryn. *Langmuir*, **2008**, *24*, 13450 - 13456; (d) C. Queffelec, M. Petit, P. Janvier, D. A. Knight, B. Bujoli. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3777 - 3807.

<sup>88</sup> J. R. Copeland, I. A. Santillan, S. M. Schimming, J. L. Ewbank, C. Sievers. *J. Phys. Chem. C*, **2013**, *117*, 21413-21425



**Figura 3.4.** a, b) Mecanismos de quimisorción de ácidos fosfónicos sobre óxidos metálicos que actúen (a) o no (b) como ácidos de Lewis, dando lugar a distintos modos de unión (c).

En conjunto, dependiendo del sustrato y de las condiciones de reacción, se han identificado una gran variedad de modos de unión de los ácidos fosfónicos con el sustrato metálico (Figura 3.4).<sup>89</sup>

Los ácidos fosfónicos apenas tienen tendencia a la autocondensación, lo que aporta una mayor durabilidad temporal. Además, resultan experimentalmente versátiles ya que no requieren condiciones de trabajo anhidras. Por otra parte, las monocapas generadas a partir

<sup>89</sup> (a) P. J. Hotchkiss, S. C. Jones, S. A. Paniagua, A. Sharma, B. Kippelen, N. R. Armstrong, S. R. Marder, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 337 - 346; (b) F. Brodard-Severac, G. Guerrero, J. Maquet, P. Florian, C. Gervais, P. H. Mutin, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 5191 - 5196; (c) V. Lafond, C. Gervais, J. Maquet, D. Prochnow, F. Babonneau, P. H. Mutin, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4098 - 4103.



de ácidos fosfónicos presentan uniones fuertes con el sustrato metálico,<sup>90</sup> con una gran estabilidad frente a procesos de degradación hidrolítica, superior a la resistencia de otros componentes moleculares como son los ácidos carboxílicos.

#### 3.1.4. Características y aplicaciones de los materiales recubiertos

Dada la gran variedad de compuestos susceptibles de quimisorberse sobre superficies metálicas oxidadas/hidroxiladas, las posibilidades de formación de SAMs son infinitas, y por ende también las aplicaciones que se derivan de ello.

Los metales son parte integrante del elemento sensor en muchos campos relacionados con la industria y la construcción. Numerosas investigaciones están enfocadas a conseguir métodos de recubrimiento capaces de modular la afinidad de las superficies metálicas en distintos medios. Así, una de las aplicaciones comunes es la formación de capas protectoras frente a la corrosión en medio acuoso. Si se tiene en cuenta que la mayor parte de las SAMs incluyen cadenas hidrocarbonadas largas para facilitar el autoensamblaje, el aumento en la hidrofobicidad de la superficie es en muchos casos notable.<sup>91</sup>

La hidrofobicidad en superficies se mide mediante el ángulo de contacto entre una gota de agua ("Contact Angle Measurement", CAM) y la superficie sobre la que se deposita (Figura 3.5). Cuando el ángulo es mayor a 90°, la superficie se considera hidrofóbica. Para conseguir este efecto, la superficie metálica necesariamente debe presentar grupos químicos o cadenas hidrofóbicas, bien de forma natural o bien mediante alguna modificación. Si se combina con una topografía rugosa concreta, puede conseguirse lo que se denomina superhidrofobicidad, que se traduce en valores ángulo de contacto mayores de 150° (Figura 3.5).<sup>92</sup>

Los recubrimientos hidrofóbicos se utilizan de forma habitual para prevenir la oxidación de las superficies metálicas.<sup>93</sup> Según se ha descrito en el apartado anterior, las superficies metálicas en su estado nativo, es decir no oxidadas, requieren un tratamiento de oxidación/hidroxilación superficial que genera una capa oxidada sobre la que se puede adherir químicamente una SAM. Ésta preservará la superficie de nuevas alteraciones químicas. Un ejemplo próximo al estudio realizado en esta Memoria es la funcionalización de aluminio

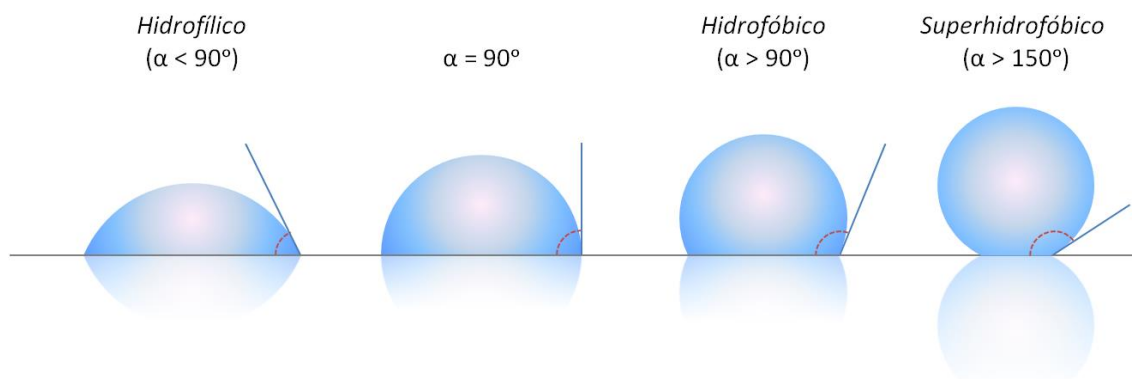
<sup>90</sup> (a) S. Marcinko, A. Y. Fadeev, *Langmuir* **2004**, *20*, 2270 - 2273; (b) M. de Los Reyes, P. J. Majewski, N. Scales, V. Luca, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 4120 - 4128.

<sup>91</sup> K. Liu, L. Jiang, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 825-838.

<sup>92</sup> (a) M. Thieme, R. Frenzel, S. Schmidt, F. Simon, A. Hennig, H. Worch, K. Lunkwitz, D. Scharnweber, *Adv. Eng. Mater.* **2001**, *3*, 691-695; (b) X. Fu, X. He, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255*, 1776-1781; (c) H. Bai, C. Li, G. Q. Shi, *J. Adhes. Sci. Technol.* **2008**, *22*, 1819-1839; (d) A. Tuteja, W. J. Choi, G. H. McKinley, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *MRS Bulletin*, **2008**, *33*, 752-758.

<sup>93</sup> Q. F. Xu, J. N. Wang, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 734-738.

anodizado con ácido mirístico ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ ), con el fin de crear un recubrimiento que prevenga de la corrosión por efecto del agua de mar. Los ácidos grasos aportan al aluminio una hidrofobicidad moderada frente a agua pura, con valores de CAM no superiores a los  $120^\circ$ . Sin embargo, en el caso del agua de mar, la salinidad que presenta aumenta la polaridad y por tanto dificulta todavía más la interacción con la monocapa hidrofóbica, que se traduce en un incremento del valor de CAM ( $154^\circ$ ), considerándose la superficie por tanto superhidrofóbica.<sup>94</sup>



**Figura 3.5.** Grados de hidrofobicidad de una superficie en función de la medida del ángulo de contacto de una gota de agua (CAM).

Un área de investigación en auge es la aplicación de superficies metálicas recubiertas como sensores. Para ello las monocapas se funcionalizan habitualmente con receptores para el reconocimiento selectivo de iones o de moléculas.<sup>95</sup> De esta manera, la detección del analito en cuestión se produce con constantes de afinidad en muchos casos superiores a las medidas en fase homogénea líquida, dado que el receptor se encuentra en este caso inmovilizado.<sup>96</sup> Este diseño se puede aprovechar por ejemplo para la detección de cationes metálicos mediante receptores fluorescentes situados en el extremo de la monocapa autoensamblada.<sup>97</sup> Además, la incorporación de las monocapas funcionalizadas en módulos que incluyen dispositivos electrónicos de medida proporciona una gran reproducibilidad, rapidez de respuesta y una amplificación significativa de la respuesta original del sensor. Tal es el ejemplo de la funcionalización de una lámina de oro con  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ , acoplada a un dispositivo de detección a partir de ondas acústicas de superficie (SAW), que permite la detección de cationes  $\text{Cu}^+$  adheridos a los grupos carboxilato terminales (Figura 3.6).<sup>98</sup>

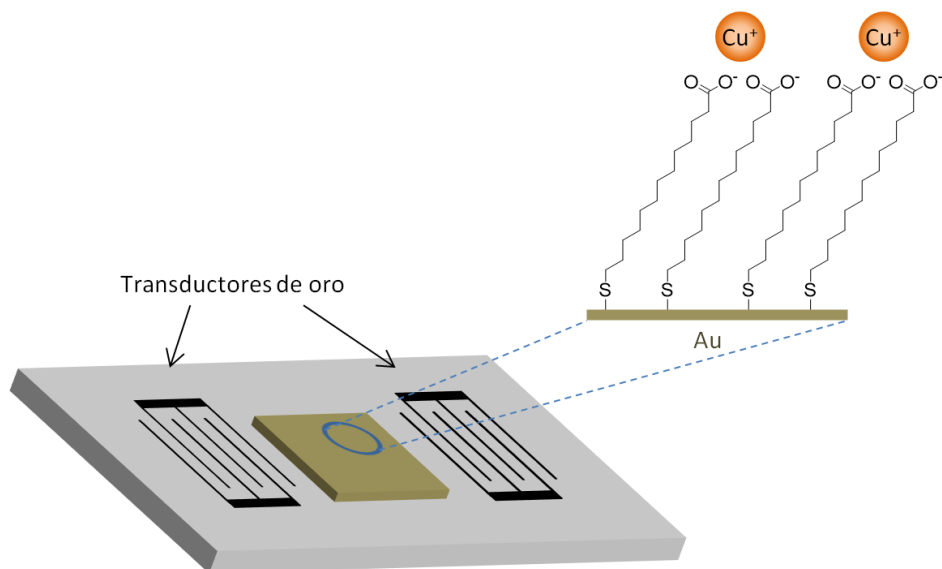
<sup>94</sup> (a) Y. Yin, T. Liu, S. Chen, T. Liu, S. Cheng, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, 255, 2978–2984; (b) T. He, Y. Wang, Y. Zhang, Q. Lv, T. Xu, T. Liu, *Corros. Sci.* **2009**, 51, 1757–1761.

<sup>95</sup> S. Zhang, C. M. Cardona, L. Echegoyen, *Chem. Commun.* **2006**, 4461–4473.

<sup>96</sup> R. C. Major, X.-Y. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8454.

<sup>97</sup> M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 1171.

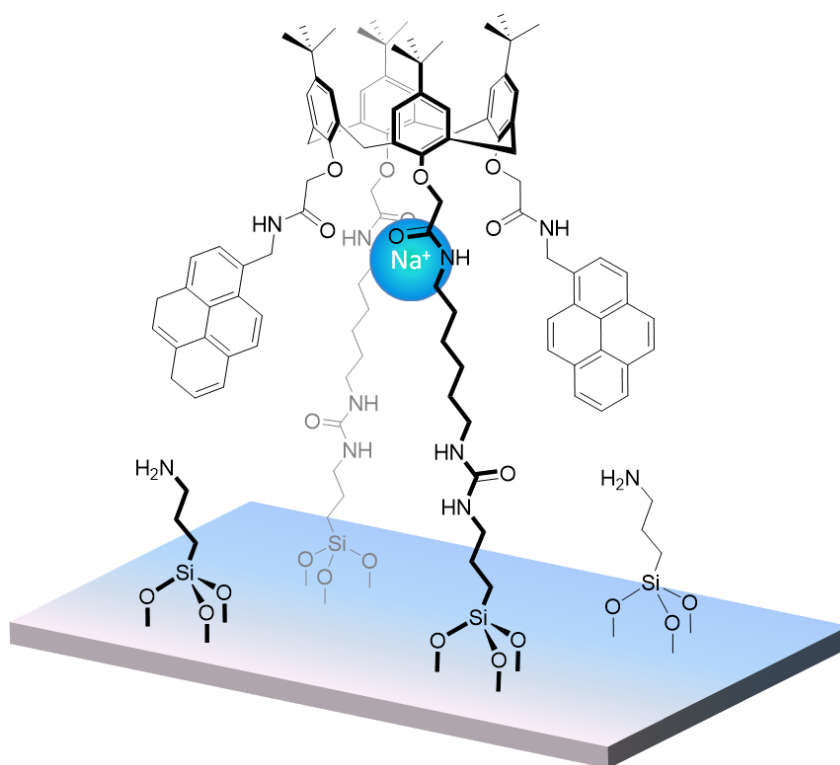
<sup>98</sup> R. M. Crooks, A. J. Ricco, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 219.



**Figura 3.6.** Sensor de  $\text{Cu}^+$  a partir de una lámina de oro funcionalizada con  $\text{HS}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ , acoplada a un detector de ondas acústicas de superficie (SAW).

La unión de las unidades de reconocimiento al espaciador de la monocapa puede afectar a todas y cada una de las unidades que conforman la monocapa, o bien funcionalizarse sólo algunas de ellas, bien antes o después de la formación de la monocapa, generando así SAMs mixtas. Un ejemplo de ello son los detectores fluorescentes de cationes  $\text{Na}^+$ , unidos a una monocapa de alcoxisilanos, anclada sobre una superficie de vidrio (Figura 3.7).<sup>99</sup> La región encargada de llevar a cabo la detección en este caso es un calix[4]areno, sustituido por cuatro unidades amida. De éstas, dos sirven de punto de anclaje a los alcoxisilanos utilizados para anclar la monocapa, mientras que las otras dos soportan dos grupos pireno, cuya fluorescencia se verá afectada por el efecto del catión  $\text{Na}^+$ .

<sup>99</sup> N. J. van der Veen, S. Flink, M. A. Deji, R. J. M. Egberink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6112



**Figura 3.7.** Monocapa con fluoroionóforos anclados sobre una superficie de vidrio que resultan selectivos para el reconocimiento de Na<sup>+</sup>.

## 3.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es el desarrollo de un método de recubrimiento de aluminio oxo-hidroxilado basado en la adsorción de ácidos escuarámicos de cadena larga. El método a desarrollar se pretende que sea compatible con la posterior manipulación con vistas a su integración en dispositivos sensores. Con este fin se han previsto cuatro fases de estudio.

- En primer lugar se desarrollará un sistema de síntesis adecuado para la preparación de ácidos escuarámicos de cadena larga.
- A continuación se estudiará y optimizará un método que permita la adsorción de los ácidos escuarámicos sobre una superficie de aluminio previamente activado en forma de oxo-hidróxido de aluminio.
- La adsorción debe demostrarse. Por ello se utilizarán técnicas de microscopía, medidas de ángulo de contacto, espectroscopia de IR de ángulo rasante, espectroscopia de reflectancia en UV-vis, espectrometría de masas y XPS.
- Finalmente se evaluará la capacidad de adsorción y desorción de las monocapas realizando las correspondientes cinéticas. Los valores obtenidos para los ácidos escuarámicos se compararán con los correspondientes ácidos grasos de longitud de cadena alquílica análoga.

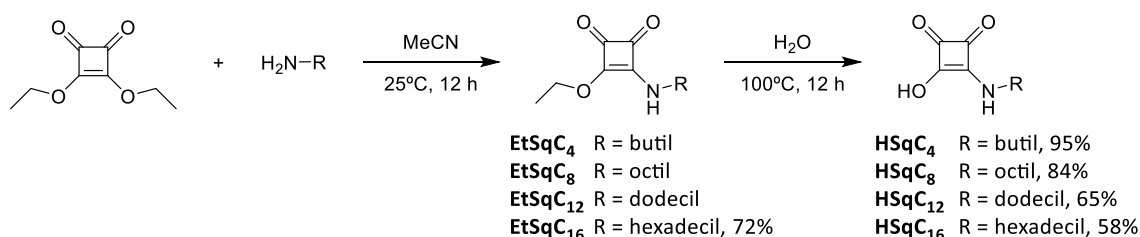


### 3.3. Síntesis y diseño de ácidos escuarámicos de cadena larga

Los ácidos escuarámicos<sup>56b</sup> son derivados muy poco estudiados del ácido escuarico que pueden considerarse como isómeros de ácidos carboxílicos<sup>15</sup> y fosfónicos.<sup>20</sup> La elevada acidez que presentan<sup>100</sup> y la analogía con los grupos mencionados los convierte en candidatos interesantes para la funcionalización de superficies de aluminio. Tal como se ha mencionado anteriormente, si se trabaja con aluminio puro nativo, es necesario generar una capa superficial oxidada. Ésta puede conseguirse de forma sencilla mediante la inmersión de la muestra en agua hirviendo durante diez minutos.<sup>101</sup> De esta manera se genera una capa de pseudoboehmita, un oxo-hidróxido de aluminio amorfo (AlOOH) (Figura 3.2),<sup>102</sup> idóneo para la quimisorción de grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos<sup>85,103</sup> y ácidos fosfónicos.<sup>104</sup>

En este capítulo se propone la formación de SAM a partir de ácidos escuarámicos de cadena larga (LCSQAs),<sup>105</sup> nunca antes utilizados para la fijación sobre superficies metálicas. Estos compuestos se han sintetizado a partir de la monocondensación de aminas alifáticas de longitud de cadena variable con el escuarato de dietilo, para después llevar a cabo la hidrólisis del escuarato de etilo resultante. La síntesis asistida por microondas descrita en el Capítulo 2 solo es efectiva en el caso de la condensación con butilamina. El resto de aminas resultan demasiado hidrofóbicas, y no dan lugar a reacción mediante calentamiento dieléctrico.

Esquema 3.1. Síntesis de los LCSQAs.



<sup>100</sup> Capítulo 2: C. López, M. Vega, E. Sanna, C. Rotger, A. Costa, *RSC Adv.* **2013**, 3, 7249.

<sup>101</sup> I. Liaskukiene, N. Aissaoui, S. J. Asadauskas, J. Landoulsi, J. F. Lambert, *Langmuir* **2012**, 28, 5116–5124.

<sup>102</sup> (a) R. Tettenhorst, D. A. Hofmann, *Clays Clay Miner.* **1980**, 28, 373–380; (b) J. van Den Brand, P. C. Snijders, W. G. Sloof, H. Terry, J. H. W. De Wit, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 6017–6024.

<sup>103</sup> (a) J. A. DeRose, E. Hoque, B. Bhushan, H. J. Mathieu, *Surf. Sci.* **2008**, 602, 1360–1367; (b) C. P. Cho, Y. T. Tao, *Langmuir* **2007**, 23, 7090–7095.

<sup>104</sup> (a) B. Branch, M. Dubey, A. S. Anderson, K. Artyushkova, J. K. Baldwin, D. Petsev, A. M. Dattelbaum, *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 288, 98–108; (b) S. Attavar, M. Diwekar, M. R. Linford, M. A. Davis, S. Blair, *Appl. Surf. Sci.* **2010**, 256, 7146–7150.

<sup>105</sup> Abreviatura utilizando las siglas del nombre que reciben en inglés, “long-chain squaramic acid” (LCSQA).

### Capítulo 3

La metodología utilizada a lo largo del capítulo para la adsorción de los LCSQAs se basa en un procedimiento análogo al descrito por I. Liascukiene y col. para la quimisorción de ácidos grasos sobre aluminio puro.<sup>101</sup> Además los experimentos se han llevado a cabo en paralelo con ácido palmítico (ácido hexadecanoico, **PA**)<sup>106</sup> como producto control, con el fin de validar los métodos utilizados y comparar los resultados obtenidos.

---

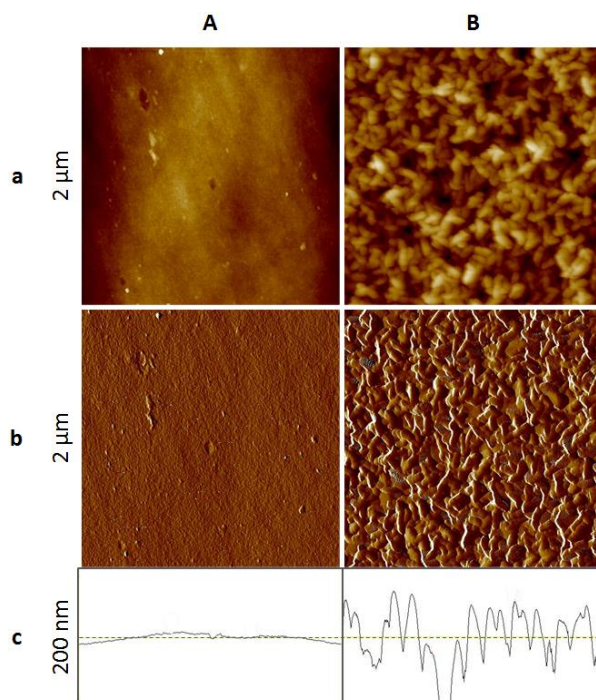
<sup>106</sup> Abreviatura utilizando las siglas del nombre que recibe en inglés, “palmitic acid” (PA).



### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Adsorción de LCSQAs, EtSqC<sub>16</sub> y PA

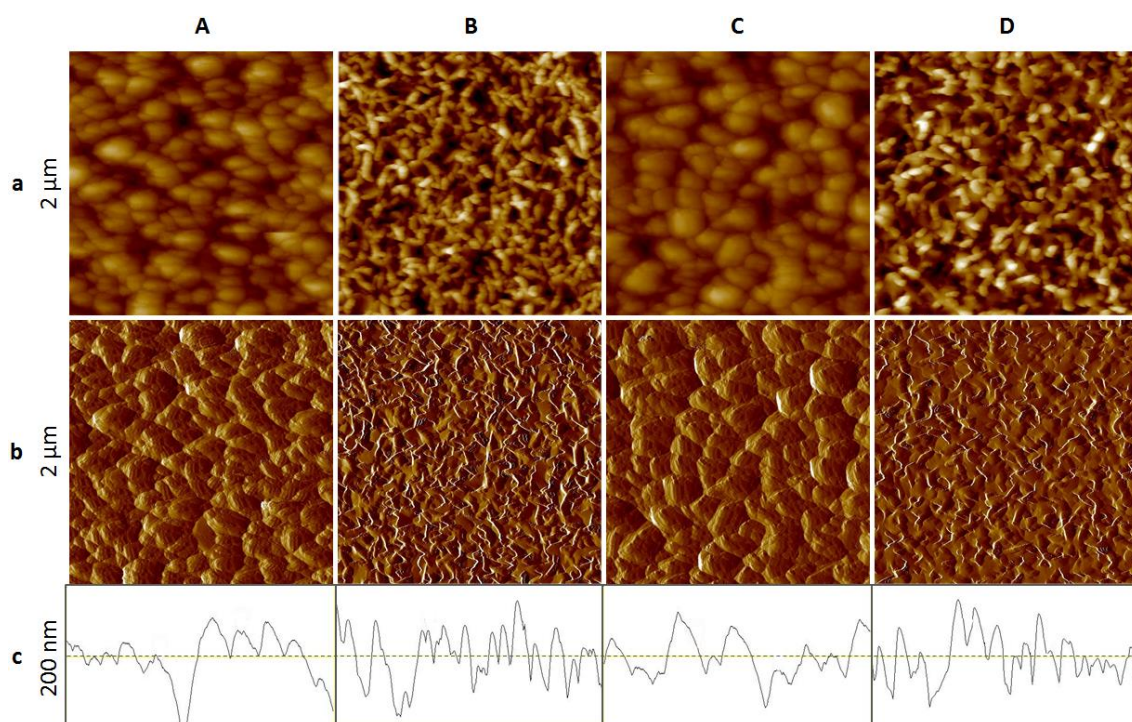
Cada uno de los tratamientos aplicados tales como el pulido, la activación y la posterior funcionalización conllevan alteraciones en la superficie de las muestras apreciables en mayor o menor medida mediante diferentes técnicas. Las modificaciones en la topografía de la muestra sufridas en cada uno de los procesos descritos se han estudiado por AFM. El cambio más drástico lo encontramos tras la hidroxilación de una muestra pulida electrolíticamente. La superficie que inicialmente aparece totalmente lisa (Figura 3.8A) adquiere un relieve mucho más abrupto, formado por estructuras en forma de bastoncillos distribuidos de manera aleatoria (Figura 3.8B). Esta alteración resulta especialmente evidente al comparar los perfiles de las secciones transversales (Figura 3.8c).



**Figura 3.8.** a) Imágenes de AFM de una muestra de aluminio antes (A) y después de su activación (B). La figura muestra las correspondientes imágenes desviación (o amplitud) (b) y los perfiles (c) de una sección transversal (2x2 μm, escala en eje z: 200 nm).

La funcionalización con los LCSQAs y con ácido palmítico (**PA**) no parece aportar cambios significativos en la morfología superficial del aluminio (Figura 3.9B,D y Figura E3.1). Esta observación contrasta con otros trabajos publicados previamente en los que la adsorción de ácidos grasos similares al **PA** (ácidos oleico y linoleico) produce cambios significativos en las

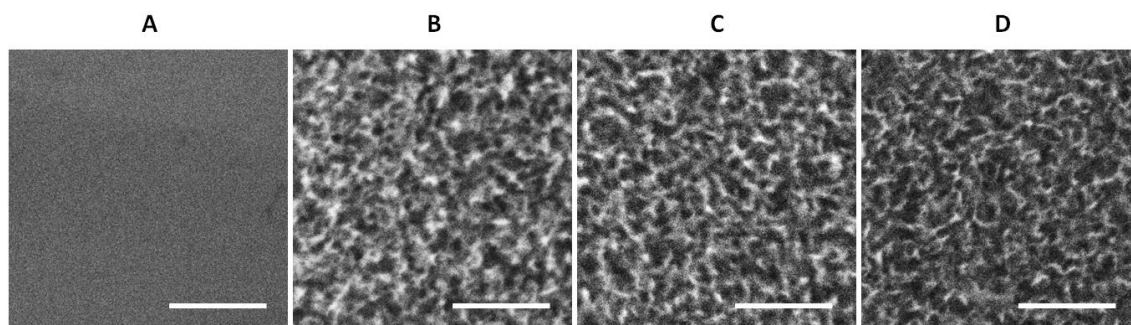
imágenes obtenidas por AFM.<sup>101,107</sup> En este caso las variaciones observadas podrían atribuirse a la deposición física del compuesto sobre la capa quimisorbida. Ello indicaría que el proceso de lavado realizado tras la funcionalización con el fin de eliminar el exceso de producto podría haber resultado inadecuado o insuficiente. Es necesario indicar que en el tratamiento con PA de las muestras de aluminio no se aprecia ninguna alteración en la apariencia de la superficie metálica. Sin embargo, en el caso de los LCSQAs, al tratarse de suspensiones, se observa una película ligeramente blanquecina sobre la superficie de las muestras. Esta fina capa de producto depositado no desaparece tras un lavado con heptano, y se traduce en topografías observadas por AFM totalmente diferentes a las que se veían en las muestras activadas o funcionalizadas con PA (Figura 3.9A). Aplicando un lavado de 10 seg. en isopropanol en un baño de ultrasonidos el exceso de producto fisisorbido desaparece, obteniéndose imágenes de AFM muy similares a las correspondientes a la muestra hidroxilada. Lo mismo ocurre cuando tras la funcionalización con PA si el tiempo de duración del proceso de lavado es inferior a 10 min (Figura 3.9C).



**Figura 3.9.** a) Imágenes de AFM de muestras de aluminio funcionalizadas con **HSqC<sub>16</sub>** (tras un lavado de (A) 10 min. con heptano y (B) tras un lavado de 10 seg. con isopropanol en un baño de ultrasonidos) y **PA** (tras un lavado de (C) 2 min. y (D) 10 min. con heptano). La figura muestra las correspondientes imágenes desviación (o amplitud) (b) y los perfiles (c) de una sección transversal (2x2 μm, escala en eje z: 200 nm).

<sup>107</sup> I. Liaskukiene, M. Steffenhagen, S. J. Asadauskas, J. F. Lambert, J. Landoulsi, *Langmuir* **2014**, *30*, 5797–5807.

Las imágenes obtenidas por SEM muestran morfologías superficiales similares a las observadas por AFM (Figura 3.10). De nuevo, el cambio más notable se observa al activar la muestra y formarse la capa de oxo-hidróxido de aluminio. Las sucesivas funcionalizaciones con los productos de cadena larga no parecen provocar variaciones posteriores apreciables en la superficie de la muestra.

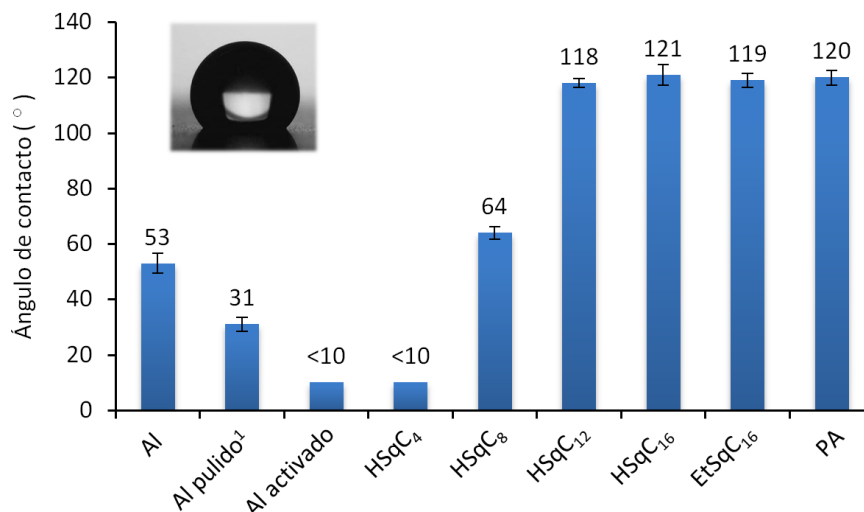


**Figura 3.10.** Imágenes de SEM de muestras de aluminio antes (A) y después (B) de la activación, y tras la adsorción con **HSqC<sub>16</sub>** (C) y **PA** (D). Barra de escala: 1  $\mu\text{m}$ .

La hidrofobicidad de los materiales resultantes es una característica que se ve perturbada de forma más drástica tras cada uno de los tratamientos aplicados a las muestras de aluminio. Las medidas del ángulo de contacto estático de una gota de agua depositada sobre la superficie metálica (CAM, Figura 3.11) se han utilizado para demostrar la adsorción de los compuestos. A partir de las medidas de CAM puede afirmarse que inicialmente el aluminio puro comercial presenta cierto carácter hidrofílico ( $53^\circ$ ), que aumenta tras el proceso de pulido ( $31^\circ$ ), ya que al conseguir una superficie más homogénea las interacciones con el agua son más favorables. Hay que recordar que por naturaleza el aluminio se encuentra pasivado en su superficie con una capa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , hecho que explica la ligera hidrofilia. La posterior activación de la superficie con agua a ebullición y la correspondiente formación del oxo-hidróxido de aluminio (AIOOH, pseudoboehmita) conllevan un aumento notable de la hidrofilia. Después del tratamiento de activación la gota de agua se esparce totalmente; las medidas de contacto conducen a valores muy bajos ( $<10^\circ$ ), lo cual demuestra la elevada hidrofilia de la superficie metálica una vez activada.

Tras el tratamiento con ácidos escuarámicos de cadena larga (LCSQAs), si únicamente se lleva a cabo un lavado con heptano, la capa blanquecina debida al exceso de producto sin eliminar modifica los valores de CAM. De esta manera, el ángulo de contacto de las muestras tratadas con **HSqC<sub>16</sub>** alcanza los  $133^\circ$ . Sin embargo, aplicando el lavado con isopropanol, el exceso de producto depositado físicamente desaparece reduciéndose la hidrofobicidad de la muestra. En estas condiciones el valor final de CAM obtenido para **HSqC<sub>16</sub>** es de  $121^\circ$ , muy similar al que presentan **HSqC<sub>12</sub>** y **PA** ( $118^\circ$  y  $120^\circ$  respectivamente) tras los lavados adecuados.

De esta manera se demuestra el carácter hidrofóbico que se deriva de la funcionalización de las muestras con estos compuestos anfifílicos. La hidrofobicidad del aluminio tratado disminuye al acortar la cadena hidrocarbonada en el caso de **HSqC<sub>8</sub>** (64°). Para **HSqC<sub>4</sub>**, sabiendo que el resto butilo podría resultar insuficiente como para aportar hidrofobia, no se observa ningún cambio en los valores de ángulo de contacto con respecto a la muestra hidroxilada, por lo que la funcionalización con este compuesto no puede demostrarse mediante esta técnica.



**Figura 3.11.** Ángulos de contacto (CAM) medidos tras cada uno de los tratamientos realizados sobre las muestras de aluminio y tras la funcionalización con los distintos LCSQAs y con **EtSqC<sub>16</sub>**. (<sup>1</sup>): Aluminio pulido mecánicamente. La imagen superior representa una gota de 5  $\mu$ L depositada sobre una muestra funcionalizada con **HSqC<sub>16</sub>**.

Se ha demostrado que los ésteres de ácidos grasos son capaces de quimisorberse en muestras de aluminio previamente activado, hidrolizándose *in situ* en la superficie hidroxilada formando el carboxilato correspondiente.<sup>101</sup> En base a ello, se ha probado la funcionalización de la muestra de aluminio activada con el éster precursor del LCSQA de 16 carbonos, **EtSqC<sub>16</sub>**. Siguiendo el mismo procedimiento, el valor de CAM obtenido es de 119°, muy similar a los valores obtenidos con los otros ácidos escuarámicos **HSqC<sub>16</sub>** y **HSqC<sub>12</sub>**.

Las medidas de ángulo de contacto son un indicativo directo de la hidrofobicidad de la muestra, y por tanto de la formación de una capa molecular superficial. Sin embargo, al comparar los valores de CAM obtenidos en muestras tratadas de la misma manera se observan en algunos casos diferencias significativas. Eso es debido principalmente a que el método de pulido no permite la obtención de muestras con idéntica topografía a nivel micrométrico, a pesar de que a escala visual no se aprecien diferencias, lo que se traduce en variaciones en los ángulos de contacto.

La funcionalización con **HSqC<sub>16</sub>** aporta la mayor hidrofobicidad a la superficie del aluminio. Por esta razón se ha investigado con mayor detalle la adsorción del **HSqC<sub>16</sub>** y del éster **EtSqC<sub>16</sub>** del cual deriva. Los resultados se han comparado en todo momento con los obtenidos con el ácido palmítico **PA** de igual número de carbonos.

Los espectros de IR de ángulo rasante obtenidos a partir de las muestras de Al funcionalizadas permiten estudiar las modificaciones químicas que han tenido lugar sobre la superficie metálica a lo largo de todo el proceso. En primer lugar, la activación acuosa produce la formación de una capa de oxo-hidróxido de aluminio. Ésta alteración superficial da lugar a la aparición de bandas de gran intensidad (Figura 3.12a). Las más representativas son una banda aguda que aparece a 1103 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al modo de flexión δ(OH), y una banda ancha que comprende desde 2800 a 3770 cm<sup>-1</sup>, atribuida a las vibraciones de tensión ν(OH) de los grupos hidroxilo y de las moléculas de agua retenidas.<sup>108</sup>

La adsorción de los ácidos escuarámicos y del **PA** se hace evidente a partir de las bandas que aparecen entre 2800 y 3000 cm<sup>-1</sup>, debidas a las vibraciones de las cadenas hidrocarbonadas (Figura 3.12b, Tabla 3.1). Así, la adsorción de **HSqC<sub>16</sub>**, **EtSqC<sub>16</sub>** y **PA** da lugar a dos bandas correspondientes a la tensión simétrica ν<sub>s</sub>(C—H) y asimétrica ν<sub>as</sub>(C—H) de los CH<sub>2</sub>, que aparecen a 2856 y 2926 cm<sup>-1</sup> respectivamente y a otra banda más débil a 2960 cm<sup>-1</sup> debida a la tensión asimétrica ν<sub>as</sub>(C—H) del CH<sub>3</sub> terminal.

**Tabla 3.1.** Asignación de las bandas principales observadas por GA-FTIR de **HSqC<sub>16</sub>**, **EtSqC<sub>16</sub>** y **PA** adsorbidos sobre aluminio comparadas con las correspondientes a los productos puros (KBr).

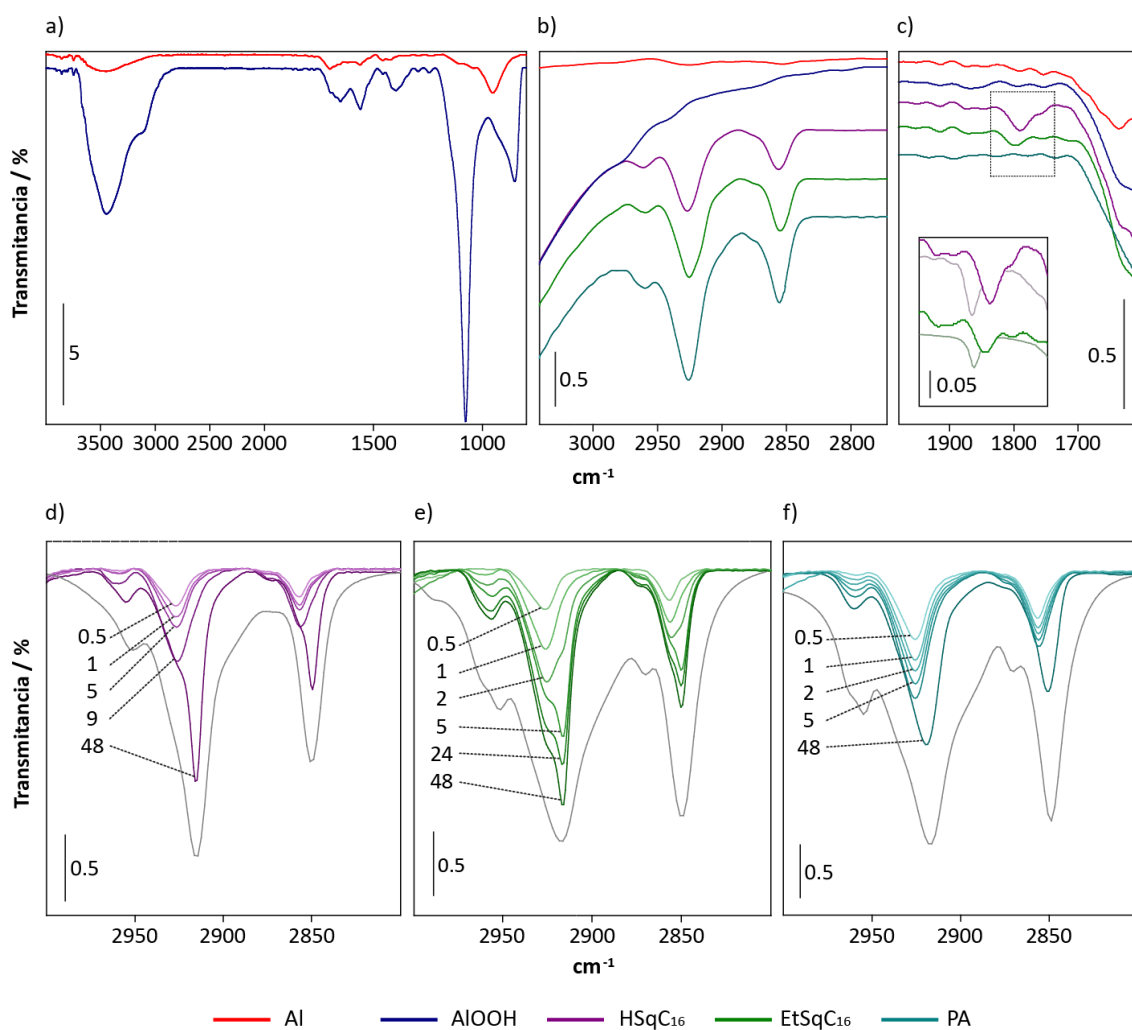
grupo	vibración	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$					
		<b>HSqC<sub>16</sub></b>		<b>EtSqC<sub>16</sub></b>		<b>PA</b>	
		KBr	Adsorbido	KBr	Adsorbido	KBr	Adsorbido
CH <sub>3</sub>	ν <sub>as</sub> (C—H)	2951	2960	2952	2960	2955	2960
CH <sub>2</sub>	ν <sub>as</sub> (C—H)	2915	2926	2917	2926	2917	2926
CH <sub>2</sub>	ν <sub>s</sub> (C—H)	2850	2856	2850	2856	2849	2856
Sq(C=O)	ν <sub>s</sub> (C=O)	1817	1792	1815	1799	-	-

Por otra parte, no puede extraerse mucha información de la zona media del espectro, entre 1300 y 1600 cm<sup>-1</sup>, debido a la baja resolución de la técnica y al hecho de que el aluminio hidroxilado presenta dos bandas anchas que enmascaran las debidas al componente

<sup>108</sup> (a) J. van den Brand, O. Blajiev, P. C. J. Beentjes, H. Terryn, J. H. W. de Wit, *Langmuir*, **2004**, *20*, 6308–6317; (b) J. van den Brand, O. Blajiev, P. C. J. Beentjes, H. Terryn, J. H. W. de Wit, *Langmuir*, **2004**, *20*, 6318–6326.



molecular. Sin embargo, la banda de tensión  $\nu_s(\text{C}=\text{O})$  característica de los derivados de ácido escuárico sí que es visible en el caso de **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** a 1792 y 1799  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente (Figura 3.12c). En nuestro caso esta banda resulta especialmente significativa ya que aparece en una región del espectro diagnóstica para estos compuestos. Los espectros de GA-FTIR de las muestras funcionalizadas con **HSqC<sub>4</sub>**, **HSqC<sub>8</sub>** y **HSqC<sub>12</sub>** se muestran en la Sección Experimental (Figura E3.2).



**Figura 3.12.** Espectros de IR de ángulo rasante (GA-IR) totales (a) y parciales (b,c) de muestras de aluminio pulido, activado (AlOOH) y tratado con **HSqC<sub>16</sub>**, **EtSqC<sub>16</sub>** y **PA**. a) Espectros completos de una muestra pulida y posteriormente activada. d-f) Variación del aspecto del espectro IR en función del tiempo de inmersión (expresado en horas) en **HSqC<sub>16</sub>** (d), **EtSqC<sub>16</sub>** (e) y **PA** (f). Los espectros en gris corresponden a los productos puros (KBr).

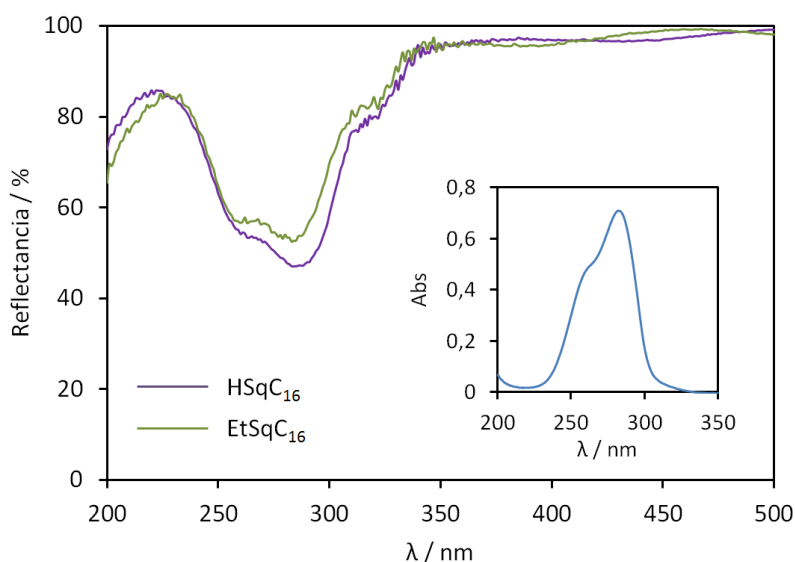
Por otra parte, se ha monitorizado por GA-FTIR el proceso de adsorción en función del tiempo. Para ello, la inmersión del Al en la suspensión del compuesto a depositar se

interrumpe a intervalos de tiempo controlados y se registra el espectro GA-FTIR sin aplicar ningún tipo de lavado. Este experimento aporta información cualitativa valiosa. Como puede observarse en la Figura 3.12d-f, el incremento de las bandas correspondientes a las vibraciones de la cadena hidrocarbonada prueba la presencia del componente molecular. Sin embargo a partir de un período de inmersión determinado las bandas de la cadena alquílica en la región 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  se acompañan de la aparición de nuevas bandas que terminan siendo más intensas que las primeras. Las frecuencias de vibración de estas bandas coinciden con las observadas en los espectros llevados a cabo mediante pastilla de KBr de cada uno de los componentes moleculares. Esto indica que a partir de cierto grado de formación de la capa de producto quimisorbido, sobre ella se empieza a producir la fisisorción del compuesto, a priori químicamente inalterado pues presenta el mismo desplazamiento de bandas que el compuesto puro. Tras efectuar el lavado con isopropanol se obtiene el espectro que corresponde únicamente al producto unido químicamente al aluminio activado (Figura 3.12b).

La espectroscopia de reflectancia total de UV-vis también permite detectar la presencia de los ácidos escuarámicos sobre la superficie del aluminio. Para ello se ha utilizado un accesorio de esfera integradora, de manera que adquiriendo los espectros con un ángulo de incidencia de  $8^\circ$ , es posible registrar la reflectancia total como suma de las reflectancias difusa y especular. Así, puesto que **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** presentan en su estructura un centro de escuaramato que absorbe alrededor de 280 nm, su presencia sobre la superficie metálica puede detectarse mediante esta técnica.<sup>109</sup> La Figura 3.13a muestra que el aluminio funcionalizado con ambas especies **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** presenta una disminución de la reflectancia alrededor de 280 nm, valor correspondiente al máximo de absorción en el UV del anión escuaramato. Además, en ambos casos se aprecia una curva de forma muy similar, pero invertida, a la banda de absorbancia que se obtiene en los espectros de UV-vis convencionales de LCSQAs de cadena alquílica (Figura 3.13b).<sup>109</sup> Debe tenerse en cuenta que la reflectancia de la superficie de aluminio no sólo depende de la absorción de radiación UV-vis que pueda tener lugar debido a la presencia de productos adsorbidos, sino también de la topografía de la superficie de la muestra y de su capacidad para reflejar y/o dispersar la luz. Por ello, para la adquisición de los espectros que se muestran se ha tomado como espectro de referencia el correspondiente a la muestra activada antes de su funcionalización.

---

<sup>109</sup> M. Ximenis, E. Bustelo, A. G. Algarra, M. Vega, C. Rotger, M. G. Basallote, A. Costa, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2160–2170.



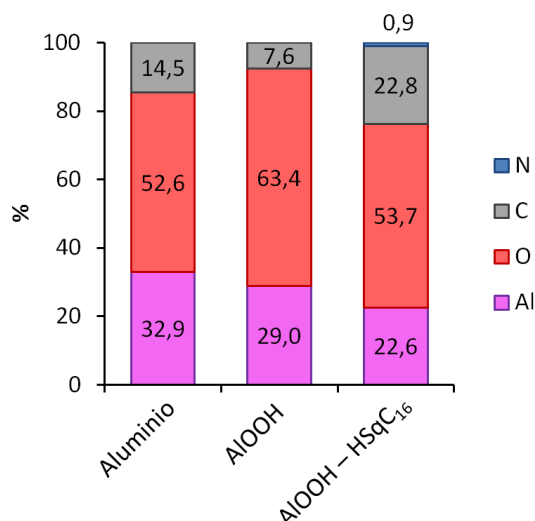
**Figura 3.13.** a) Espectros de reflectancia total en la región de UV-vis de muestras de aluminio funcionalizadas con **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>**. b) Espectro de absorbancia de **HSqC<sub>4</sub>** ( $2.0 \times 10^{-5}$  M) en agua.

La quimisorción de **HSqC<sub>16</sub>** sobre la superficie de aluminio se ha corroborado mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Esta técnica es especialmente adecuada en este caso ya que permite obtener información cualitativa y cuantitativa de la composición elemental en capas superficiales (10 nm). En este caso se han analizado las señales correspondientes a C<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub>, Al<sub>2p</sub> y N<sub>1s</sub>. Los porcentajes de cada elemento extraídos a partir de las áreas totales relativas de las señales obtenidas sirven para explicar las variaciones en la composición de la superficie de las muestras (Figura 3.14). En primer lugar, la muestra de aluminio puro pulido presenta un elevado contenido de oxígeno, debido a la capa de óxido de aluminio natural que la recubre. Tras la activación, el porcentaje aumenta desde el 52.6 al 63.4% debido a la oxo-hidroxilación de la superficie. Ambas muestras presentan un porcentaje moderado de carbono. Éste se origina probablemente debido a la contaminación ambiental adherida a la superficie oxidada.<sup>110</sup> Debe tenerse en cuenta que la muestra activada puede adsorber con facilidad contaminación orgánica adventicia.<sup>111</sup> Finalmente, la funcionalización con **HSqC<sub>16</sub>** se demuestra por el aumento significativo de la proporción de carbono y por la aparición de nitrógeno.

<sup>110</sup> (a) E. Hoque, J. A. DeRose, P. Hoffmann, H. J. Mathieu, *Surf. Interf. Anal.* **2006**, *38*, 62; (b) S. Gredelj, A. R. Gerson, S. Kumar, G. P. Cavallaro, *Appl. Surf. Sci.* **2001**, *174*, 240.

<sup>111</sup> E. Hoque, J. A. DeRose, P. Hoffmann, H. J. Mathieu, B. Bhushan, M. Cichomski, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174710.

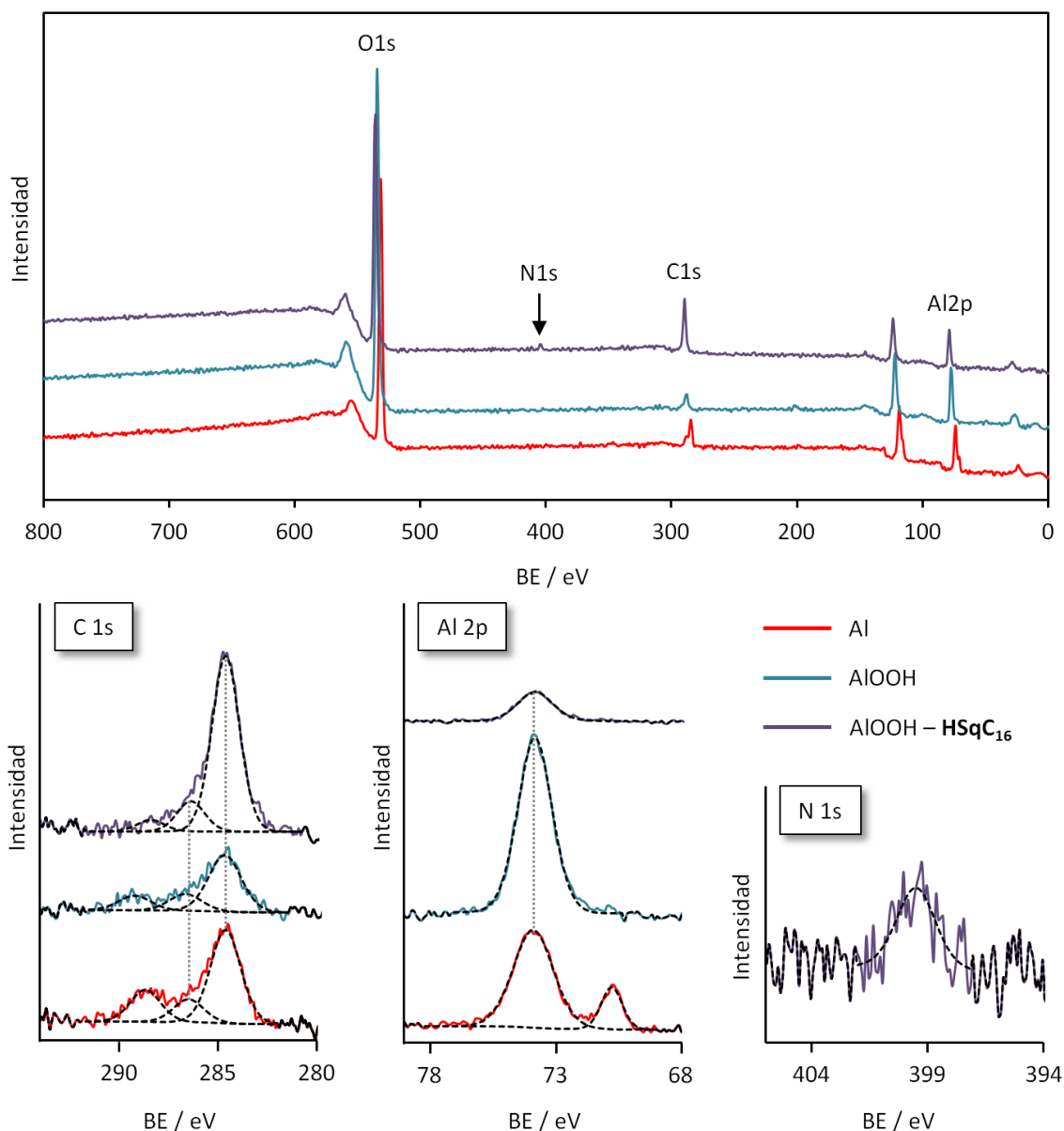




**Figura 3.14.** Gráfico comparativo de los porcentajes de los elementos presentes en la superficie de las muestras. Los valores numéricos se han extraído a partir de las áreas totales relativas de las señales obtenidas por XPS.

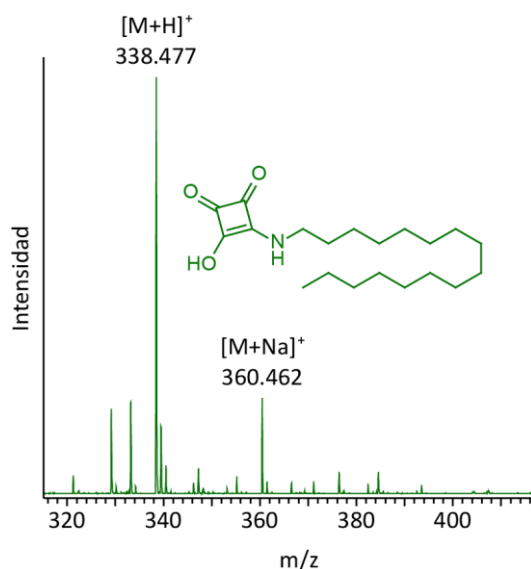
La deconvolución de las bandas del espectro XPS permite analizar la evolución de la superficie según el tratamiento efectuado (Figura 3.15). La muestra tratada con **HSqC<sub>16</sub>** presenta una proporción mucho mayor del pico a 284.6 eV asignado a la cadena alquílica (C-C/C-H), lo cual concuerda con la adsorción del ácido escuarámico. Por otra parte, las muestras de aluminio inicial no hidroxilado e hidroxilado, presentan una señal característica a 288.7 y 289.0 eV respectivamente, que se corresponde a grupos carboxilato (COO<sup>-</sup>) de posibles contaminantes orgánicos ambientales. En el caso de la muestra funcionalizada con **HSqC<sub>16</sub>** esta señal aparece a 288.4 eV, y podría asignarse al grupo escuaramato (RNHSqO<sup>-</sup>).<sup>112</sup> Por último, la banda correspondiente a los enlaces C-O/C-N aparece a 286.5 eV en los cuatro espectros. En cuanto a la señal de Al<sub>2p</sub>, en la muestra de aluminio sin tratar aparecen dos picos a 70.8 y 73.9 eV, correspondientes a óxido de aluminio y a aluminio metálico respectivamente. A partir de la hidroxilación de la muestra, esta última señal desaparece debido al aumento de la capa de aluminio oxo-hidroxilado. La señal de N<sub>1s</sub> visible a 399.5 eV en el espectro de la muestra tratada con **HSqC<sub>16</sub>**, e inexistente en las muestras previas a la funcionalización, confirma la presencia del ácido escuarámico sobre la superficie.

<sup>112</sup> No existen referencias de estudios por XPS de derivados de ácido escuarámico donde se describan las energías de enlace. La asignación especificada en el texto es una suposición en base al espectro observado.

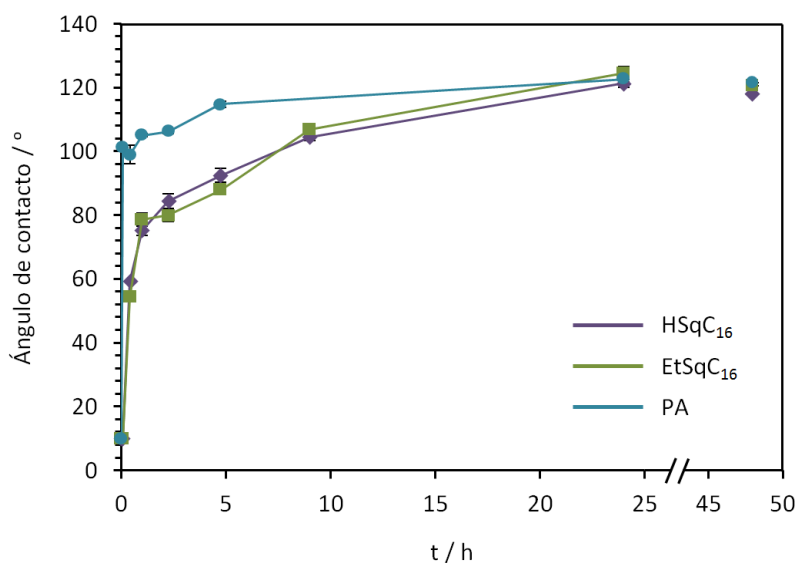


**Figura 3.15.** Espectros de XPS registrados sobre aluminio puro, activado (AlOOH), y funcionalizado con HSQC<sub>16</sub> (arriba). Abajo se muestran las ampliaciones de las señales de C1s, Al2p y N1s.

La presencia de HSQC<sub>16</sub> sobre la superficie del aluminio también se ha detectado mediante espectroscopia de masas mediante MALDI-TOF(+). En esta técnica la energía de la radiación láser incidente es capaz de desprender las moléculas quimisorbidas, que luego son detectadas e identificadas en el espectro de masas resultante. Así, la detección de la masa del producto confirma de nuevo su adsorción sobre la superficie de aluminio activado (Figura 3.16).



**Figura 3.16.** Espectro de masas registrado directamente sobre una muestra funcionalizada con **HSqC<sub>16</sub>**.



**Figura 3.17.** Cinética de adsorción de **PA**, **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** sobre aluminio activado evaluada mediante medidas de ángulos de contacto sobre muestras independientes de aluminio tratadas durante períodos de tiempo crecientes.

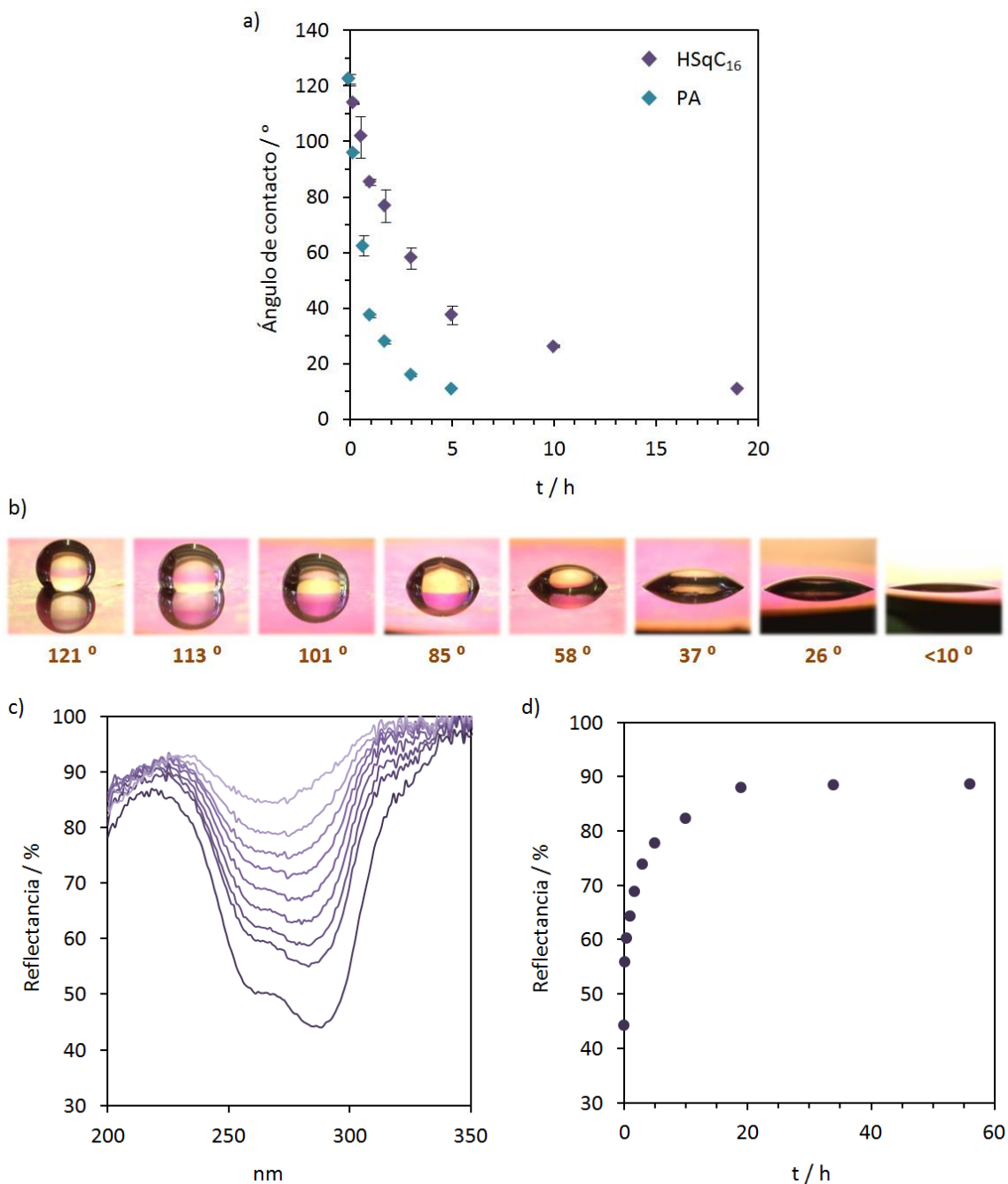
La velocidad de adsorción/funcionalización de la superficie metálica es un aspecto importante. La cinética del proceso de adsorción, además de evaluarse a partir de GA-FTIR, se ha estudiado a partir de medidas de ángulo de contacto (CAM). Siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente, el proceso de adsorción se interrumpe a intervalos de tiempo controlados. Las medidas se han realizado, después del correspondiente lavado de las muestras con heptano y/o isopropanol para eliminar las moléculas fisisorbidas. Así, el **PA**

presenta una cinética de adsorción mucho más rápida que **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** (Figura 3.17), alcanzando el 80% del valor final en tan solo 5 min, mientras que los derivados de ácido escuárico requieren de 8-9 horas. Tras 24 horas de tratamiento, no se aprecian variaciones en los ángulos de contacto en ninguno de los tres productos.

#### **3.4.2. Desorción comparada de HSqC<sub>16</sub> y PA.**

A la hora de desarrollar un nuevo recubrimiento molecular es importante evaluar su durabilidad y resistencia a la desorción frente a distintos tratamientos físicos y químicos. En nuestro caso, se ha estudiado el efecto de la inmersión de las muestras funcionalizadas con **PA** y **HSqC<sub>16</sub>** en isopropanol. La elección de este disolvente se ha basado en su capacidad para disolver ambos productos. Tal y como ocurre durante el proceso de adsorción, la desorción de los productos va ligada a una variación en la hidrofobicidad de la muestra, en este caso una disminución, que puede ser monitorizada mediante CAM. De la misma manera, dicho proceso también debería verse reflejado en una disminución de la absorbancia de la muestra, y por tanto en un aumento de la reflectancia total, que puede seguirse por espectroscopia de reflectancia en UV-vis.

Los experimentos se han realizado sumergiendo las muestras durante periodos controlados de tiempo en isopropanol. La muestra se seca en corriente de argón antes de efectuar las medidas de ángulo de contacto (CAM). A partir de los valores de CAM obtenidos a lo largo del proceso (Figura 3.18a) puede verse como la desorción de **PA** en isopropanol es bastante rápida, disminuyendo el ángulo de contacto a 10° en tan solo 5 horas, valor correspondiente a una muestra activada sin funcionalizar. En cambio, **HSqC<sub>16</sub>** presenta una cinética más lenta, siendo necesarias 19 horas para observar el descenso total de hidrofobicidad. Sin embargo, al estudiar el proceso mediante la variación en la reflectancia (Figura 3.18c,d), se observa que superadas las 19 horas de tratamiento con isopropanol, la banda deja de perder intensidad, manteniendo una reflectancia del 85% en su máximo. De acuerdo con lo observado por CAM, y teniendo en cuenta que cada espectro se encuentra referenciado al espectro de la muestra activada previa funcionalización, al final del proceso de desorción cabría esperar una reflectancia próxima al 100% debido a la pérdida casi total de producto adsorbido. Por tanto, la banda remanente observada indicaría que una parte del producto permanece quimisorbida en la superficie pero de forma dispersa. De esta manera, la muestra ya no estaría recubierta por una capa de moléculas agrupadas de forma compacta capaces de aportar hidrofobicidad.



**Figura 3.18.** a) Cinética de desorción de **PA** y **HSqC<sub>16</sub>**. (b) Imágenes consecutivas de una gota de agua (5  $\mu$ L) depositadas sobre la superficie de Al previamente funcionalizada con **HSqC<sub>16</sub>** y posteriormente tratada por inmersión en isopropanol durante los períodos de tiempo representados en (a). c) Evolución de la banda UV de ácido escuarámico con un máximo a 268 nm obtenida por reflectancia total frente al tiempo de tratamiento transcurrido. d) Representación gráfica de la intensidad de la banda de adsorción a 278 nm frente al tiempo transcurrido. En todos los casos se ha tomado como blanco el espectro correspondiente a la muestra activada.

En resumen, la adsorción de los ácidos escuarámicos sobre superficies de aluminio requiere la activación previa de la superficie del aluminio puro, con el fin de conseguir una oxo-hidroxilación completa que permita una funcionalización masiva de la superficie. La activación se consigue mediante la inmersión de la muestra en agua hirviendo durante un periodo de tiempo suficiente para que el proceso sea completo, generalmente 10 minutos. Los cambios sufridos tras esta activación de la muestra son apreciables mediante varias técnicas ya que la topología y propiedades físico-químicas de la superficie se ven modificadas significativamente. Las diferencias topográficas son perfectamente visibles mediante AFM y SEM. La superficie lisa del aluminio puro pulido se transforma durante el proceso de activación hasta llegar a un estado hidroxilado en el que se observa una estructura amorfa compuesta por bastoncillos distribuidos de forma aleatoria. Por otra parte, la hidroxilación aporta un fuerte carácter hidrofílico a la superficie de la muestra, que se traduce en medidas de ángulo de contacto inferiores a 10°. Además, la nueva estructura de AlOOH da lugar a señales características de IR.

Al analizar muestras de Al tratadas mediante distintas técnicas de mecanizado y activación tal como se ha mencionado anteriormente, se llega a la conclusión de que el proceso de pulido y la posterior activación son críticos. La rugosidad que presente la superficie de Al es determinante en primera instancia a la hora de llevar a cabo estudios por AFM y SEM, puesto que de ello dependerá la calidad de las imágenes. Además, en espectroscopia de reflectancia en UV-vis la rugosidad afecta directamente a la reflectancia especular y difusa de las muestras, que componen la reflectancia total medida. Por otra parte, la hidrofobicidad depende también en gran medida de la rugosidad. El proceso de activación, que también puede verse afectado por el pulimiento de la muestra, resulta claramente determinante pues condicionará el grado de la funcionalización posterior. La hidroxilación también puede afectar a la reflectancia, teniendo en cuenta que en ocasiones es apreciable a simple vista, aportando opacidad a la superficie de la muestra. Con todo, la técnica GA-FTIR es la más afectada por el proceso de activación. La oxo-hidroxilación de la muestra da lugar a bandas anchas cuya intensidad puede variar de una muestra a otra, alterando por ende las intensidades de las señales correspondientes a la capa molecular. En esta misma técnica, el grado variable de contaminación orgánica adventicia, visible en ocasiones a partir de las señales alifáticas entre 2800 y 3000  $\text{cm}^{-1}$ , puede enmascarar las señales de los productos.

La quimisorción de los productos se ha evaluado mediante varias técnicas. Las imágenes obtenidas por AFM y SEM en sí mismas no demuestran la presencia de una capa molecular, dada la escasa variación observada entre las muestras hidroxiladas y funcionalizadas. Sin embargo, teniendo en cuenta que la adsorción molecular sí que se detecta mediante el resto de técnicas, se refuerza la idea de que tras el proceso de adsorción y posterior lavado se consigue una funcionalización en monocapa cuyo espesor (ca. 0,25 nm) no tendría por qué alterar la topografía del substrato metálico. En el caso de **HSqC<sub>16</sub>**, la molécula mide aproximadamente 23 Å de largo en su conformación más extendida, por lo que la formación

de una SAM no debería ser apenas perceptible, teniendo en cuenta la elevada rugosidad que presentan las muestras activadas, con surcos que superan los 100 nm.

Las medidas de CAM aportan datos que permiten afirmar de forma inequívoca la formación de una capa molecular. Sabiendo que las muestras activadas presentan un marcado carácter hidrofílico, la quimisorción de **HSqC<sub>8</sub>**, **HSqC<sub>12</sub>**, **HSqC<sub>16</sub>**, **EtSqC<sub>16</sub>** y **PA** se demuestra por un aumento significativo en los ángulos de contacto. Estos mismos productos se han detectado mediante GA-FTIR, principalmente a partir de las señales correspondientes a las vibraciones de las cadenas alquílicas. La señal cercana a 1800 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la tensión  $\nu_s(\text{C}=\text{O})$  no siempre resulta visible debido a su baja intensidad, quedando oculta en el ruido de fondo. Al final del proceso de adsorción, el incremento de intensidad de las bandas en la zona comprendida entre 2800 y 3000 cm<sup>-1</sup> correspondientes al producto de partida, confirma la existencia de un fenómeno de superposición física sobre la capa quimisorbida. Este resultado pone de manifiesto la importancia de un método de lavado adecuado para cada compuesto con el fin de conseguir únicamente la quimisorción molecular, y así evitar deposiciones físicas que puedan alterar los resultados obtenidos por otras técnicas como pueden ser imágenes de microscopía y valores de CAM.

La adsorción de **HSqC<sub>4</sub>** no aporta variaciones en el ángulo de contacto con respecto a los obtenidos para la muestra hidroxilada, probablemente debido a que la longitud de su cadena alquílica no es suficiente como para aportar una hidrofobicidad apreciable a la muestra. El mismo motivo explicaría que en el espectro de GA-FTIR no se observe la presencia de las señales que derivan de la cadena alquílica, determinantes para la detección de los otros productos de cadena más larga. Sin embargo, dado que no se encuentra ninguna prueba positiva que asegure la presencia de **HSqC<sub>4</sub>** sobre la superficie, su quimisorción no ha podido confirmarse.

La mayor parte de los esfuerzos se han centrado en el estudio de la quimisorción de moléculas con cadenas alquílicas de 16 carbonos, ya que aportan una mayor hidrofobicidad a la superficie metálica. El análisis mediante espectroscopia de reflectancia en UV-vis ha demostrado la adsorción de **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>**. El uso de esta técnica es poco habitual en este tipo de estudios ya que, en la mayoría de casos, los productos utilizados asiduamente para el recubrimiento de muestras metálicas oxidadas no presentan absorción en la región de UV-vis. Los espectros obtenidos para ambos derivados de ácido escuárico resultan muy similares entre sí. Dado que además los espectros de GA-FTIR y el ángulo de contacto obtenidos para las muestras funcionalizadas con ambos productos son prácticamente idénticos, podría afirmarse que el **EtSqC<sub>16</sub>** se hidroliza in situ para quedarse adsorbido en forma de escuaramato. Este tipo de hidrólisis por acción del aluminio activado está descrita para los ésteres de ácidos grasos.<sup>101</sup>

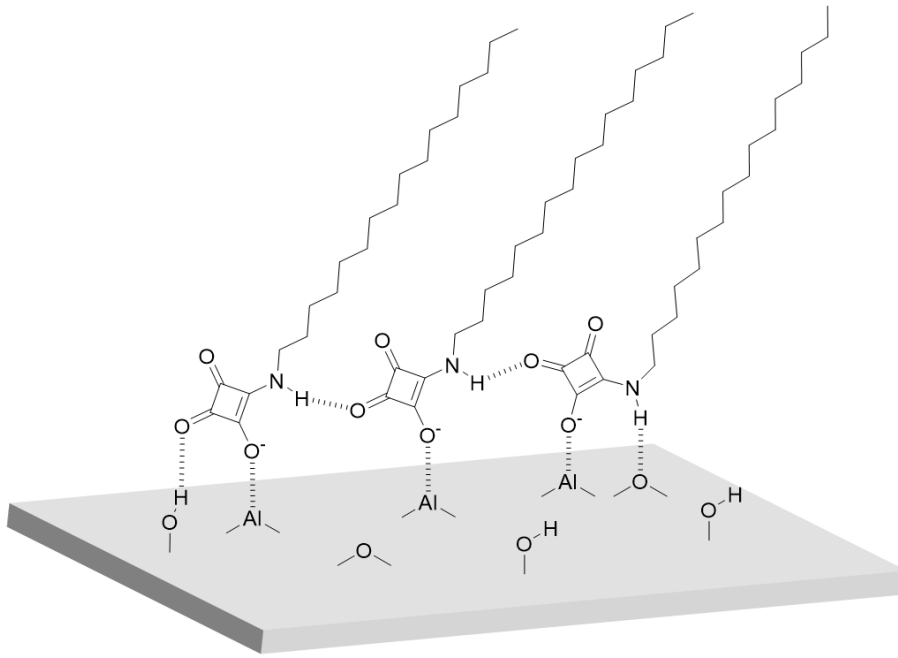
Finalmente, la adsorción del **HSqC<sub>16</sub>** se ha demostrado mediante XPS y MALDI-TOF. Por una parte, el incremento de las señales correspondientes a C<sub>1s</sub> y la aparición de una banda

correspondiente a  $N_{15}$ , confirman la presencia del ácido escuarámico sobre el aluminio hidroxilado. Por otra parte, la detección de la masa del producto al bombardear la superficie de la muestra resulta concluyente.

Al estudiar la cinética del proceso de adsorción, se comprueba que la velocidad de adsorción de **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** resulta más lenta que la de **PA**, lo cual se observa al medir los ángulos de contacto resultantes en cada caso. Esta diferencia tan significativa seguramente puede atribuirse al hecho de que el **PA** es soluble en heptano, disolvente utilizado para llevar a cabo los tratamientos de adsorción. En cambio, los derivados de ácido escuarámico no presentan una solubilidad apreciable en este disolvente, aunque pueden permanecer en suspensión estable. Por otra parte, **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>** presentan curvas cinéticas muy similares entre sí, demostrando velocidades de adsorción equivalentes. Eso implicaría que la hidrólisis que tiene que sufrir el éster no afectaría a la velocidad del proceso. Por tanto, la etapa lenta vendría determinada por la interacción y preorganización de las moléculas sobre la superficie hidroxilada, y dependerá en gran medida de la agregación que presenten entre sí cuando se encuentran en suspensión y de la cantidad de producto que se encuentra en disolución.

Un aspecto importante por resolver es el tipo de unión entre el metal hidroxilado y las unidades de ácido escuarámico. Teniendo en cuenta la elevada acidez de los ácidos escuarámicos ( $pK_a \sim 1.0 - 2.0$ ), es bastante improbable que la unión entre el anión escuaramato y el aluminio se lleve a cabo mediante la formación de un enlace covalente. Además, dada la estudiada capacidad que presentan estos compuestos para formar complejos con metales de transición,<sup>49</sup> cabe esperar que la interacción responsable de la quimisorción se fundamente en un enlace de coordinación con un marcado carácter iónico, tal y como sucede con los ácidos carboxílicos (Figura 3.3 y Figura 3.19).<sup>101,107</sup> Por otra parte el escuaramato podría establecer interacciones adicionales que estabilizasen el complejo formado con el oxo-hidróxido de aluminio y que favorecieran la autoagregación. A partir del NH escuaramídico y de los carbonilos se podrían llevar a cabo enlaces de hidrógeno con los hidroxilos y oxígenos puente de la superficie de AlOOH, así como enlaces de hidrógeno que conectasen un centro escuaramato con otro adyacente (Figura 3.19). Si así fuera, implicaría que globalmente la adsorción de los LCSQAs es más intensa que en el caso de los ácidos grasos, que por su estructura no permiten la formación de interacciones adicionales. Este hecho explicaría la mayor resistencia a la desorción por acción de la inmersión en isopropanol que presenta **HSqC<sub>16</sub>** al compararla con **PA**. El efecto de la solubilidad de nuevo puede resultar relevante, ya que el ácido graso resulta mucho más soluble que el ácido escuarámico, lo que favorecería la redisolución del primero.





**Figura 3.19.** Representación idealizada de la unión de **HSqC<sub>16</sub>** sobre la superficie de aluminio oxo-hidroxilado (AlOOH). La figura muestra algunas de las posibilidades de estabilización mediante enlaces de hidrógeno entre distintas unidades de **HSqC<sub>16</sub>** y entre éstas y la superficie hidroxilada.

### 3.5. Conclusiones

En este capítulo se ha investigado la capacidad de los ácidos escuarámicos de cadena larga (LCSQAs) para quimisorberse sobre la superficie de aluminio puro previamente activado, dando lugar así a un nuevo tipo de recubrimiento. Mediante un conjunto de técnicas tales como CAM, GA-FTIR, XPS y espectrometría de masas por MALDI-TOF se ha demostrado la quimisorción de estos compuestos. A partir de las imágenes obtenidas por AFM y SEM y mediante el estudio de la cinética del proceso de adsorción mediante GA-FTIR, se ha podido distinguir la formación de una capa de producto depositado físicamente que se diferencia de la capa quimisorbida. Así pues se ha desarrollado un procedimiento de lavado para asegurar la formación de un único recubrimiento químicamente anclado. Esta capa resulta invisible por las dos técnicas de microscopía. Sin embargo, debido a que las unidades de ácido escuarámico absorben en el UV-vis, su presencia sobre la superficie se ha podido monitorizar mediante espectroscopia de reflectancia en UV-vis. Con esta técnica se han podido analizar los procesos de adsorción y desorción superficial. El hecho de que los ácidos escuarámicos sean activos en UV permite utilizar una técnica simple pero muy poco utilizada en este campo que resulta, muy útil para el diseño de nuevos recubrimientos basados en los ácidos escuarámicos.

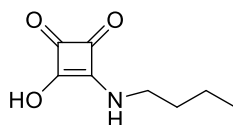
Al estudiar la velocidad de desorción en isopropanol del ácido escuarámico de mayor longitud de cadena alquílica (**HSqC<sub>16</sub>**) se ha comprobado que éste presenta una cinética de desorción más lenta que la del ácido carboxílico análogo (**PA**). Esta mayor resistencia a la desorción, junto con la posibilidad de caracterizar la capa molecular depositada mediante espectroscopia de reflectancia, hacen que este nuevo sistema de funcionalización de óxidos de aluminio pueda resultar muy útil como base para el diseño de recubrimientos con aplicaciones a nivel industrial.

## 3.6. Sección Experimental

### 3.6.1. Síntesis y caracterización de productos

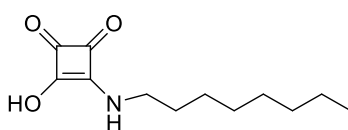
**Síntesis general de LCSQAs.** Los LCSQAs se preparan por hidrólisis de las escuaramidas monoéster correspondientes. Éstos se preparan mediante la reacción de condensación de la alquilamina correspondiente con escurato de dietilo (Esquema 3.1). En un procedimiento típico, 2.2 mmol de amina en 10 mL de MeCN se adicionan sobre 2 mmol de escurato de dietilo disueltos en 10 mL de MeCN. La mezcla resultante se mantiene en agitación magnética durante 12 horas a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, el crudo se concentra y se adicionan 20 mL de agua y se calienta la mezcla a reflujo durante 12 horas más. El crudo resultante se filtra y se lava dos veces con NaOH 1M, MeCN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeCN, HCl 1M y MeCN. Tras secarse al vacío, los LCSQAs se obtienen como sólidos blancos.

#### 3-hidroxi-4-(butilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>4</sub>)



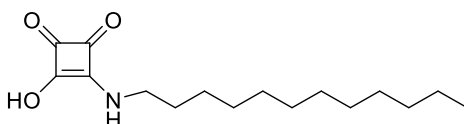
La caracterización del producto se detalla en el Capítulo 2 (Sección 2.5.2).

#### 3-hidroxi-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>8</sub>)



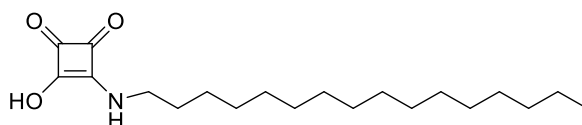
<sup>1</sup>H NMR: δ<sub>H</sub> (300 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>) 8.39 (1 H, br s, NH), 3.49 (2 H, q, *J* = 6.6, Oct(C1-H)), 1.50 (2 H, m, Oct(C2-H)), 1.25 (10 H, s, Oct(C3-C7-H)), 0.85 (3 H, t, *J* = 7.0, Oct(C8-H)). <sup>13</sup>C NMR: δ<sub>C</sub> (75 MHz; DMSO-*d*<sub>6</sub>): 184.54, 173.90, 43.44, 31.16, 30.26, 28.54, 28.47, 25.76, 22.03 y 13.91. HRMS EI(-), calc. para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> [M]<sup>-</sup> 224.1292; experimental 224.1288.

#### 3-hidroxi-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>12</sub>)



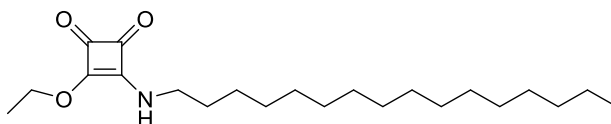
$^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.38 (1 H, br s, NH), 3.37 (2 H, q,  $J = 6.6$ , dodecil(C1-H)), 1.50 (2 H, m, dodecil(C2-H)), 1.23 (18 H, s, dodecil(C3-C11-H)), 0.85 (3 H, t,  $J = 7.0$ , dodecil(C12-H)).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6,): 184.41, 173.84, 43.47, 31.28, 30.27, 28.99, 28.93, 28.90, 28.68, 28.52, 25.77, 22.07 y 13.94. HRMS EI(-), calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_3$   $[\text{M}]^-$  280.1918; experimental 280.1907.

### 3-hidroxi-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>16</sub>)



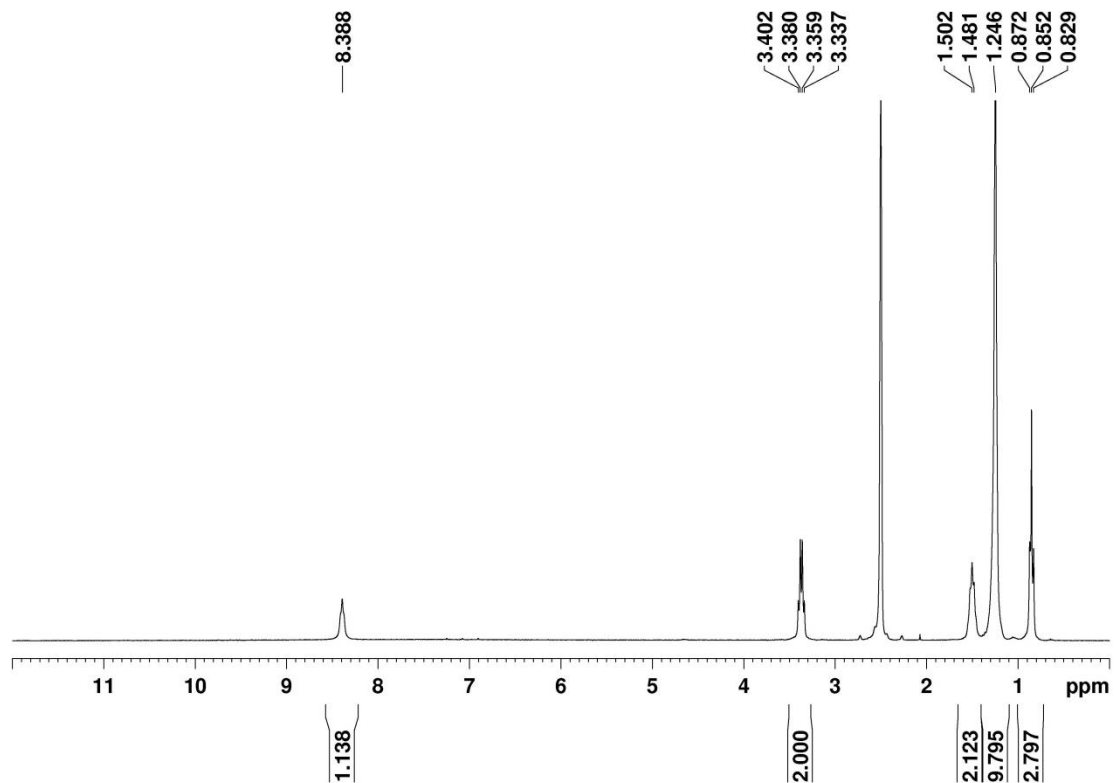
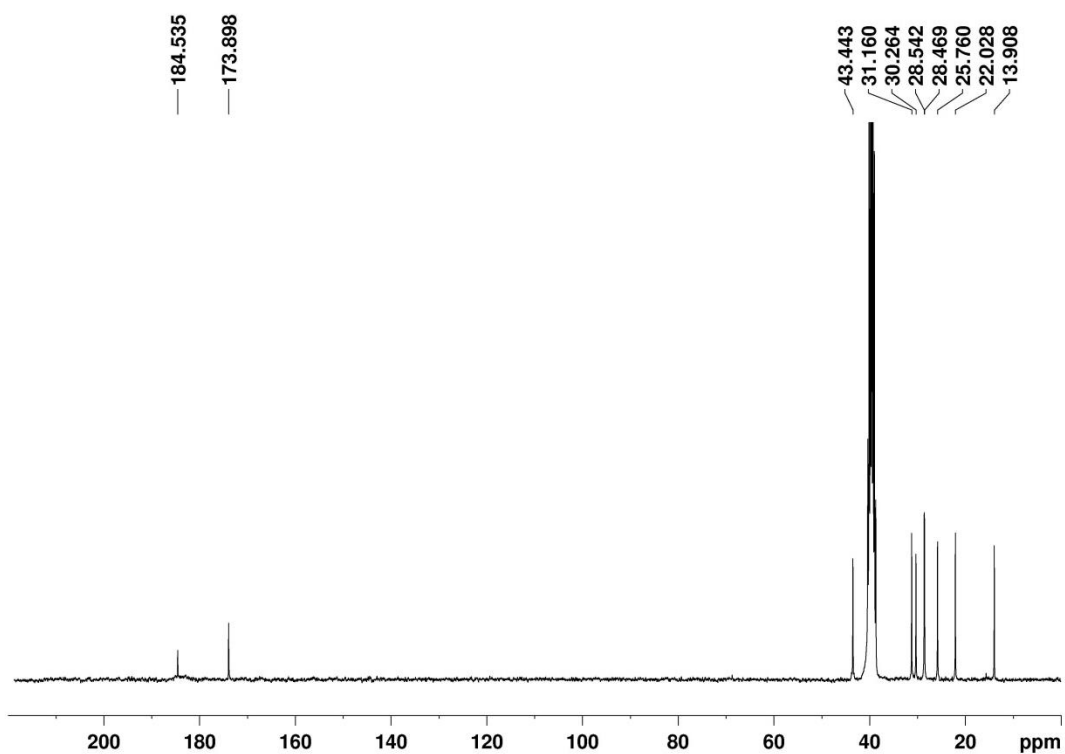
$^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.37 (1 H, br s, NH), 3.36 (2 H, q,  $J = 6.6$ , hexadecil(C1-H)), 1.49 (2 H, s, hexadecil(C2-H)), 1.23 (26 H, s, hexadecil(C3-C15-H)), 0.85 (3 H, s, hexadecil(C16-H)).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6,): 194.64, 184.67, 173.98, 43.45, 31.27, 30.29, 29.01, 28.90, 28.68, 28.53, 25.78, 22.07 y 13.93. HRMS EI(-), calc. para  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{NO}_3$   $[\text{M}]^-$  336.2544; experimental 336.2542.

### 3-etoxi-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (EtSqC<sub>16</sub>)



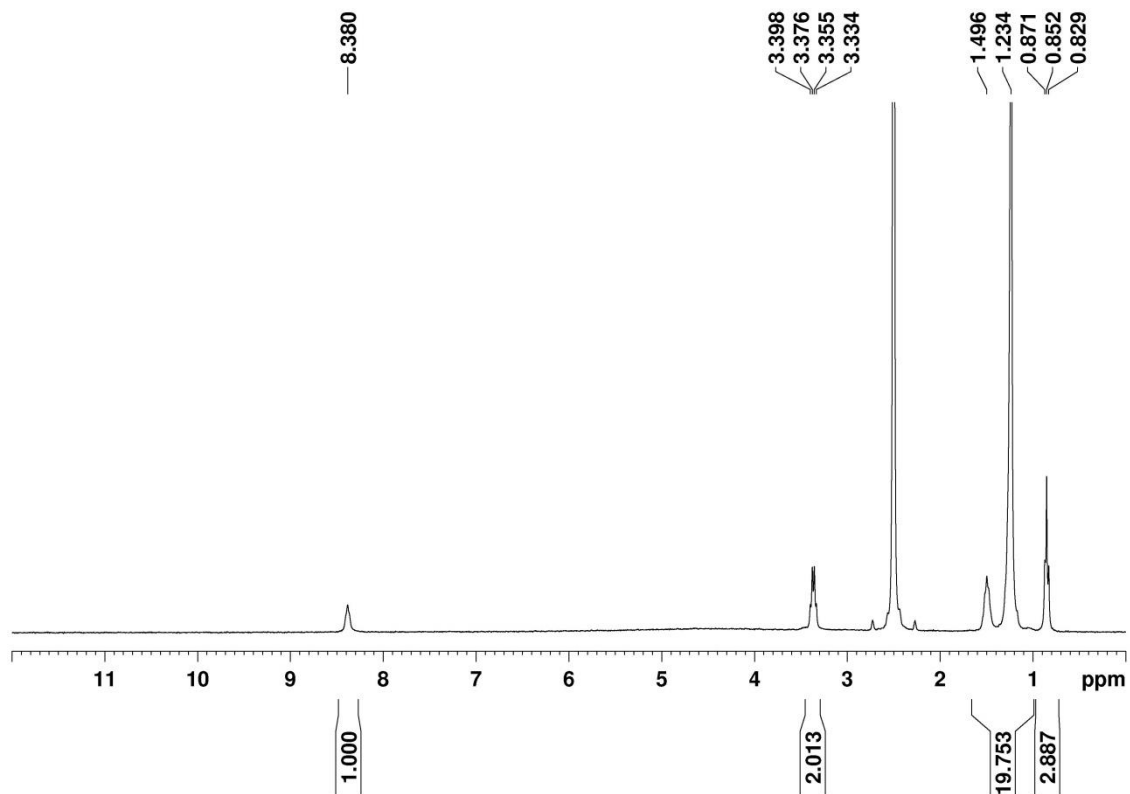
La escuaramida monoéster **EtSqC<sub>16</sub>** es la única que se ha aislado y purificado, ya que el resto se han hidrolizado directamente para obtener los LCSQAs. El crudo correspondiente a la reacción entre la hexadecilamina y el escuarato de dietilo se filtra. El filtrado se lava con 15 mL de una mezcla éter/etanol 1:1 y se filtra, repitiendo el proceso un total de tres veces. Tras secarse al vacío, la escuaramida monoéster **EtSqC<sub>16</sub>** se obtiene como un sólido blanco.

$^1\text{H}$  NMR:  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; DMSO-*d*6) 8.80 y 8.60 (1 H, br s, NH), 4.65 (2 H, q,  $J = 6.9$ , EtO(C1-H)), 3.45 y 3.26 (2 H, q,  $J = 6.6$ , hexadecil(C1-H)), 1.49 (2 H, s, hexadecil(C2-H)), 1.36 (3 H, t,  $J = 6.9$ , EtO(C2-H)), 1.23 (26 H, s, hexadecil(C3-C15-H)), 0.85 (3 H, s, hexadecil(C16-H)).  $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; DMSO-*d*6,): 189.31, 181.85, 176.63, 172.36, 68.69, 43.73, 31.27, 30.32, 29.83, 29.00, 28.91, 28.86, 28.68, 28.49, 28.43, 25.71 y 22.07 HRMS EI(-), calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NO}_3$   $[\text{M}]^-$  336.2852; experimental 364.2857.

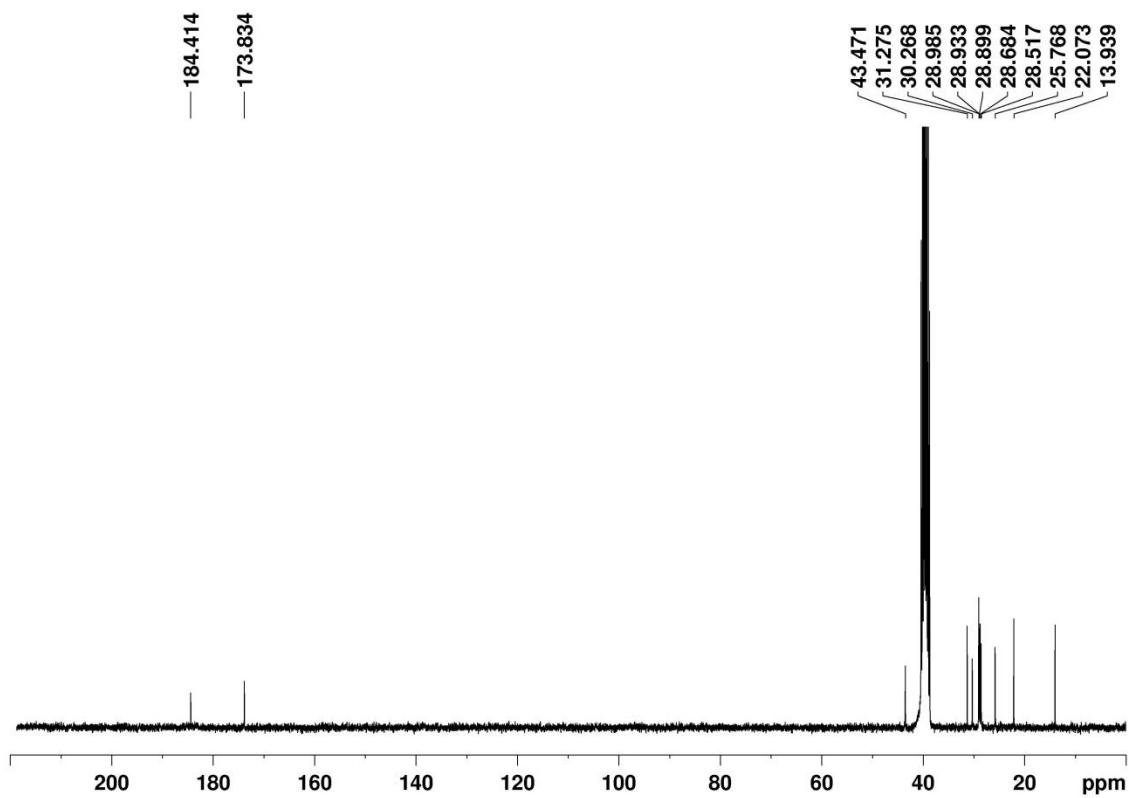
3.6.2. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR.3-hidroxi-4-(octilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona ( $\text{HSqC}_8$ ) $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

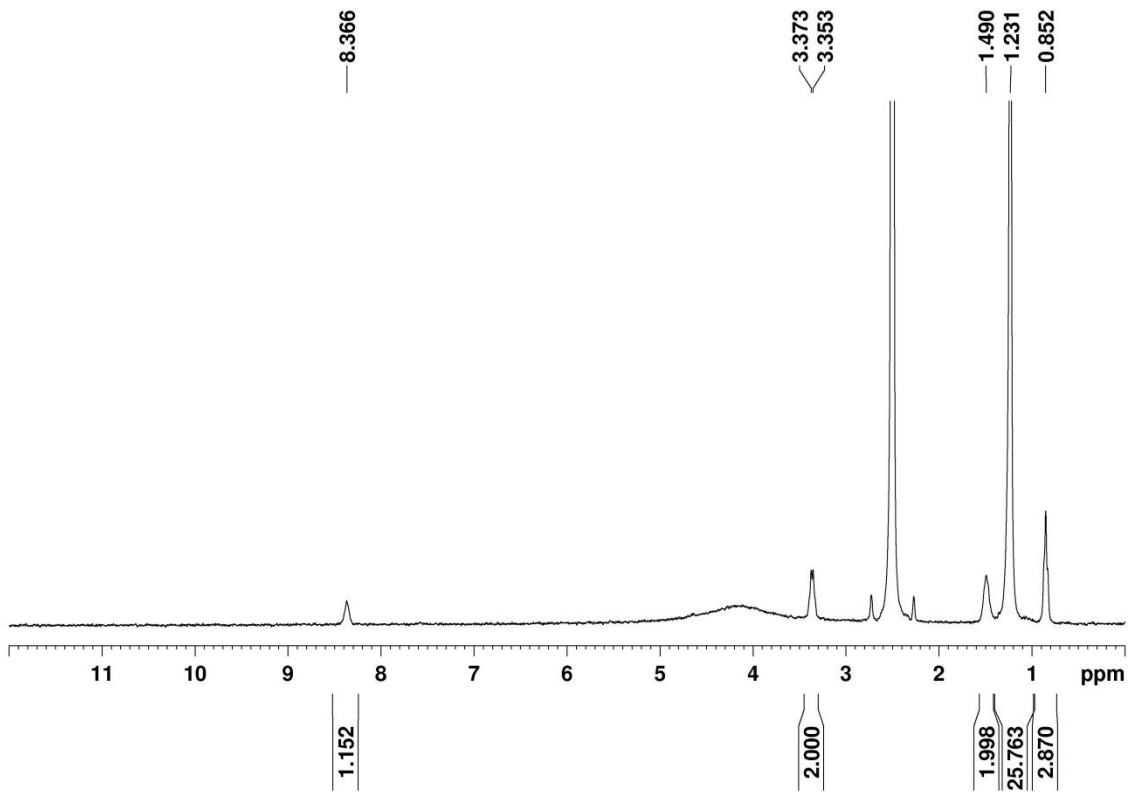
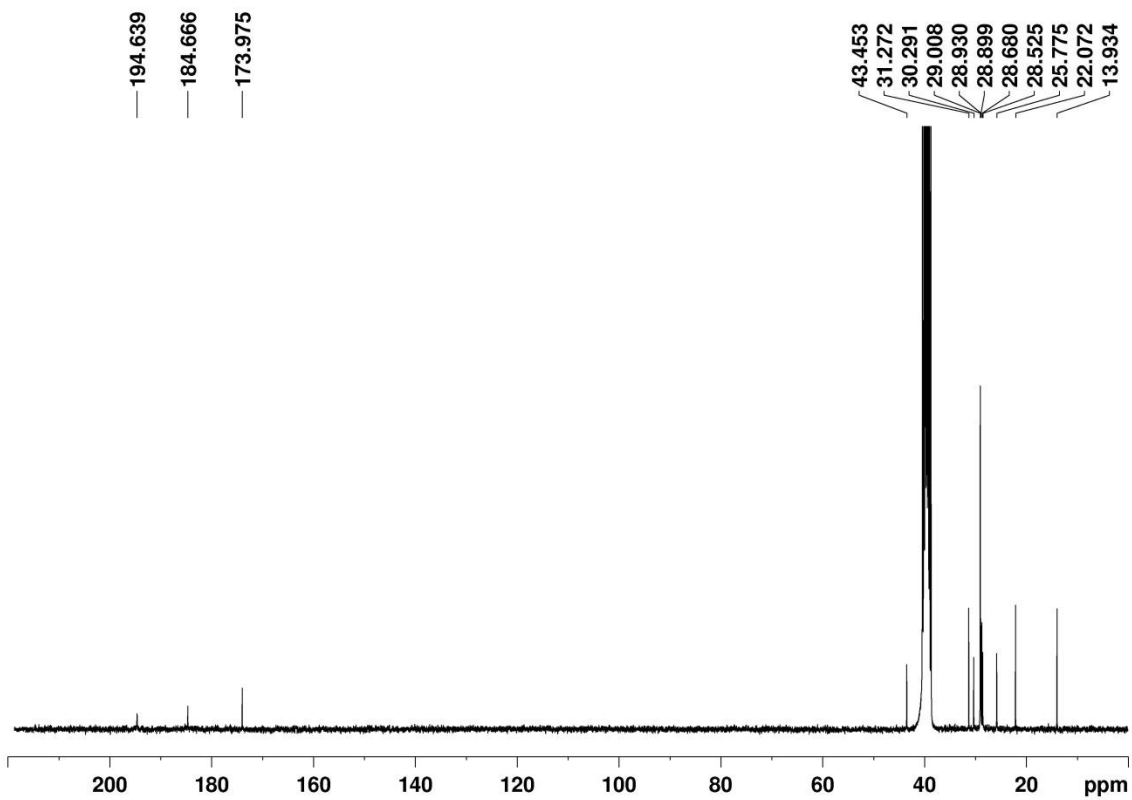
**3-hidroxi-4-(dodecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>12</sub>)**

<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



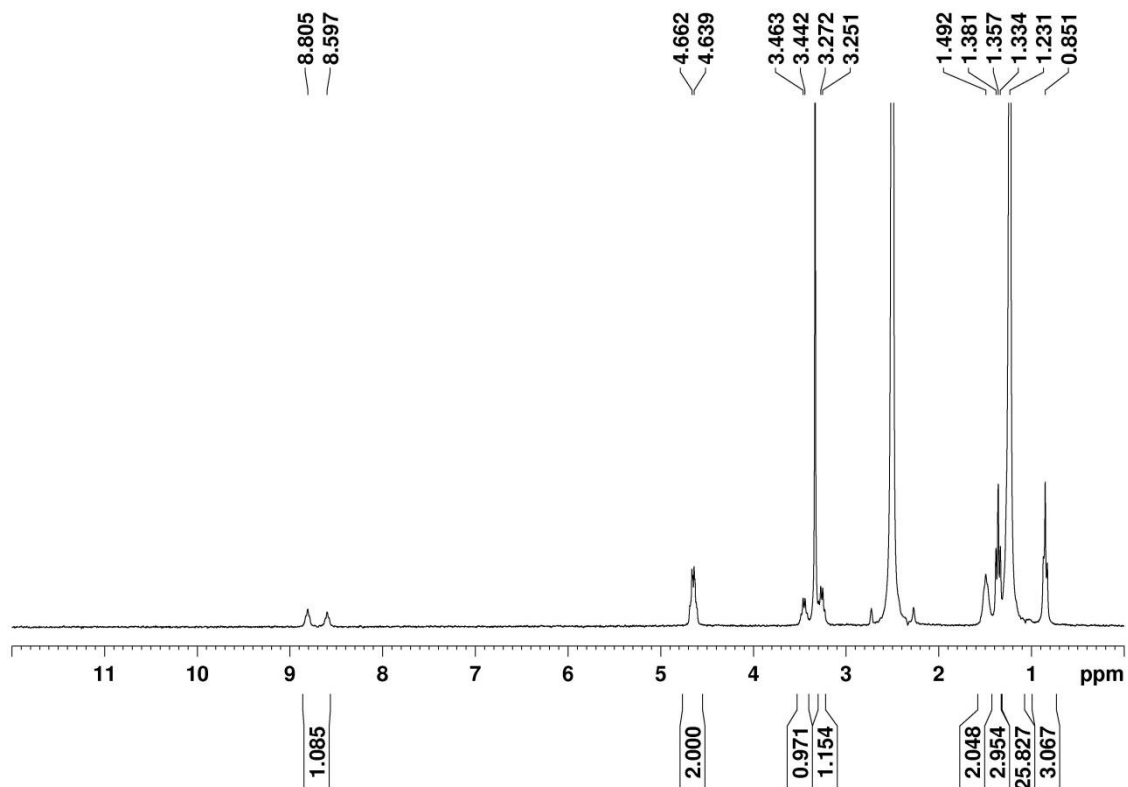
<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K



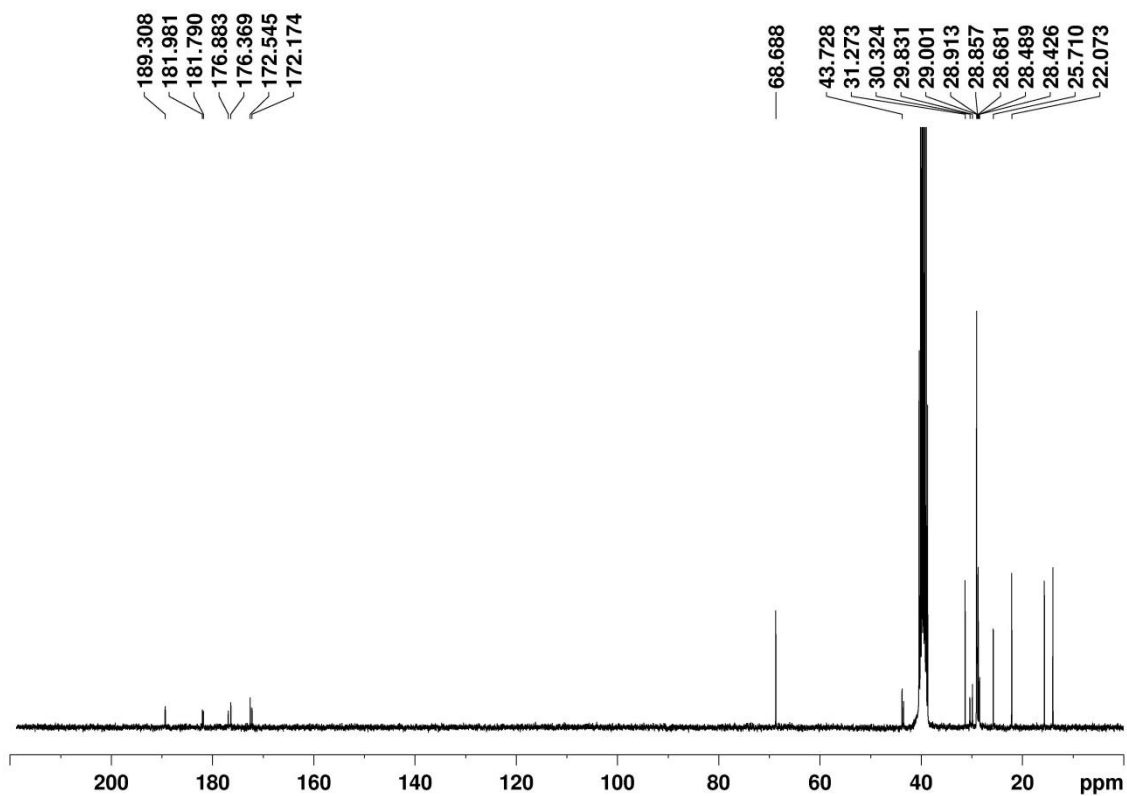
**3-hidroxi-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (HSqC<sub>16</sub>)**<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

**3-etoxi-4-(hexadecilamino)ciclobut-3-en-1,2-diona (EtSqC<sub>16</sub>)**

<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K





### 3.6.3. Preparación, activación y quimisorción de las muestras de Al

**Preparación de las muestras de Al.** Se ha utilizado Al policristalino (1 mm de grosor, Al 99.99%, Si 0.01%, *abcr*, Alemania) cortado en piezas de forma cuadrada de 1 cm de lado para su estudio por AFM, o en discos de 2.5 cm<sup>2</sup> para el resto de medidas. Las piezas cuadradas utilizadas en AFM se han pulido electrolíticamente (TenuPol-5, Struers) a 5°C y 40.0 V utilizando electrolito A2 (Struers, ácido perclórico 60%), mientras que las muestras circulares se han pulido mecánicamente con papeles de SiC con tamaños de grano de 600 y 1200, seguido de pulidos sucesivos con suspensiones partículas de diamante de 3 y 1 µm (Buehler).

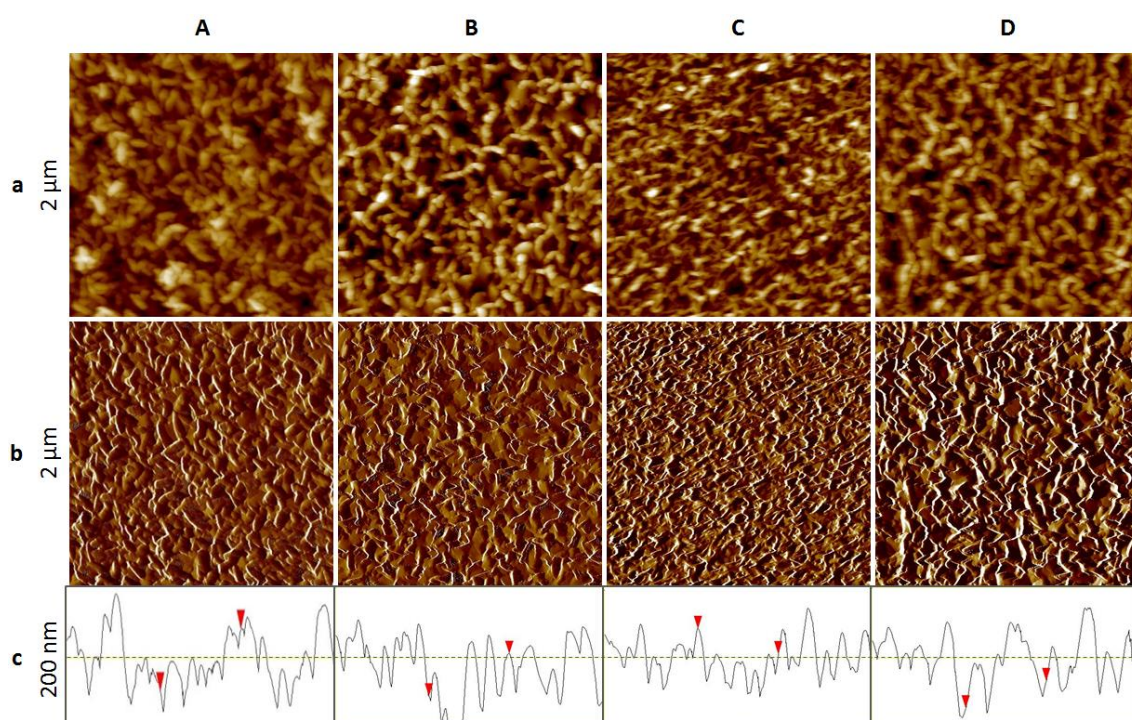
**Activación y quimisorción de las muestras.** Después del correspondiente proceso de pulido, todas las muestras se lavan en una mezcla de agua/etanol (50%/50%) en un baño de ultrasonidos durante 2 minutos y se secan en corriente de argón. La activación se ha llevado a cabo sumergiendo las muestras en agua hirviendo durante 10 minutos, para luego secarlas de nuevo mediante corriente de argón. Para la adsorción de ácido palmítico **PA** se ha utilizado una disolución 0.05 mM en heptano. En cuanto a los derivados de ácido escuárico (**HSqC<sub>4</sub>**, **HSqC<sub>8</sub>**, **HSqC<sub>12</sub>**, **HSqC<sub>16</sub>** y **EtSqC<sub>16</sub>**), dada su insolubilidad en heptano, se han preparado suspensiones con una concentración de 0.017 g/L. Las suspensiones se han sonificado mediante un procesador de ultrasonidos GEX 130 (130 W, Sonics) durante 10 minutos. El proceso de adsorción se ha llevado a cabo mediante la inmersión de las muestras de Al recién activadas en la suspensión correspondiente. El conjunto se mantiene en agitación orbital suave durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se digieren en heptano para su lavado durante 10 minutos con el mismo sistema de agitación y luego se han secado luego mediante corriente de argón. En el caso las muestras funcionalizadas con LCSQAs o **EtSqC<sub>16</sub>**, para eliminar el exceso de producto fisisorbido sobre la superficie de la muestra se ha realizado un lavado con isopropanol de 10 segundos en un baño de ultrasonidos para posteriormente secar de manera habitual.

### 3.6.4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se han obtenido en un microscopio Hitachi S-3400N con un voltaje de aceleración de 10 kV. Las muestras utilizadas para la obtención de estas imágenes, al igual que para AFM, han sido piezas cuadradas de aluminio electropulido de 1 cm<sup>2</sup> y 1 mm de grosor, situadas directamente en el portamuestras del microscopio.

### 3.6.5. Imágenes de AFM

Las imágenes de AFM en modo "tapping" se han tomado a temperatura y presión ambiental mediante un microscopio AFM MultiMode Veeco con un controlador NanoScope IV. Se han utilizado puntas de silicón HQ:NSC35/AIBS con una longitud de cantiléver de 90  $\mu\text{m}$ , operando en una región de frecuencias de 150-300 kHz y una relación de barrido de 1.0 Hz. Las muestras de aluminio electropulido utilizadas para la obtención de las imágenes se han mecanizado formando piezas cuadradas de 1  $\text{cm}^2$  de superficie y 1 mm de grosor. Estas piezas se colocan directamente en el portamuestras del microscopio.



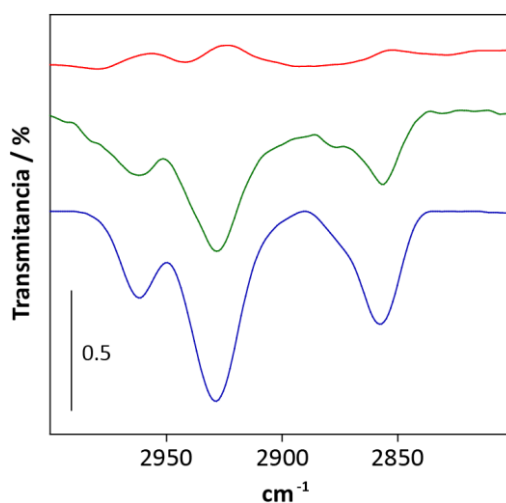
**Figura E3.1.** a) Imágenes de AFM con sus correspondientes imágenes de amplitud (b) y los perfiles (c) de una sección transversal ( $2 \times 2 \mu\text{m}$ , escala en eje z: 200 nm) registradas en aluminio funcionalizado con **HSqC<sub>4</sub>** (A), **HSqC<sub>8</sub>** (B), **HSqC<sub>12</sub>** (C) y **EtSqC<sub>16</sub>** (D).

### 3.6.6. Medidas del ángulo de contacto (CAM).

El ángulo estático de contacto con agua se ha medido a temperatura ambiente utilizando un dispositivo de construcción propia equipado con una cámara DinoXcope, mediante el método de la gota sésil, analizando posteriormente la imagen obtenida del perfil de la gota depositada (5  $\mu\text{L}$ , Mili-Q) con el software ImageJ. Para cada muestra, el valor tomado es el resultado de la media obtenida con tres gotas.

### 3.6.7. Espectroscopia de "Grazing Angle" GA-FTIR

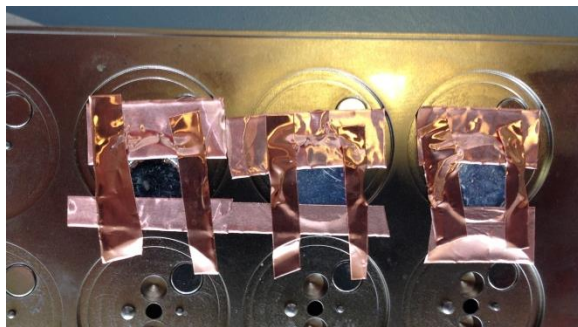
Los espectros de IR de ángulo rasante (GA-FTIR) se han registrado al vacío utilizando un espectrómetro de IR Vertex 80V (Bruker). El haz del láser se focaliza sobre la muestra con un ángulo de incidencia de 80°, utilizando un accesorio de reflectancia especular de ángulo rasante. La luz reflejada se redirige a un detector LN-MCT fotovoltaico que se encuentra a la temperatura del nitrógeno líquido. Los espectros que se presentan se han adquirido con 128 adquisiciones con una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.



**Figura E3.2.** Espectros de GA-FTIR de las muestras de aluminio activado funcionalizadas con **HSqC<sub>4</sub>** (rojo), **HSqC<sub>8</sub>** (verde) y **HSqC<sub>12</sub>** (azul).

### 3.6.8. Espectroscopia de masas por MALDI-TOF

Los espectros de masas por MALDI-TOF se han adquirido utilizando un espectrómetro Autoflex (Bruker). Las piezas de aluminio funcionalizadas con **HSqC<sub>16</sub>** se han recubierto de una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y se han fijado a la placa portamuestras utilizando cinta adhesiva de cobre. Las muestras se han bombardeado con una potencia de laser del 60%, aplicando 1000 disparos.



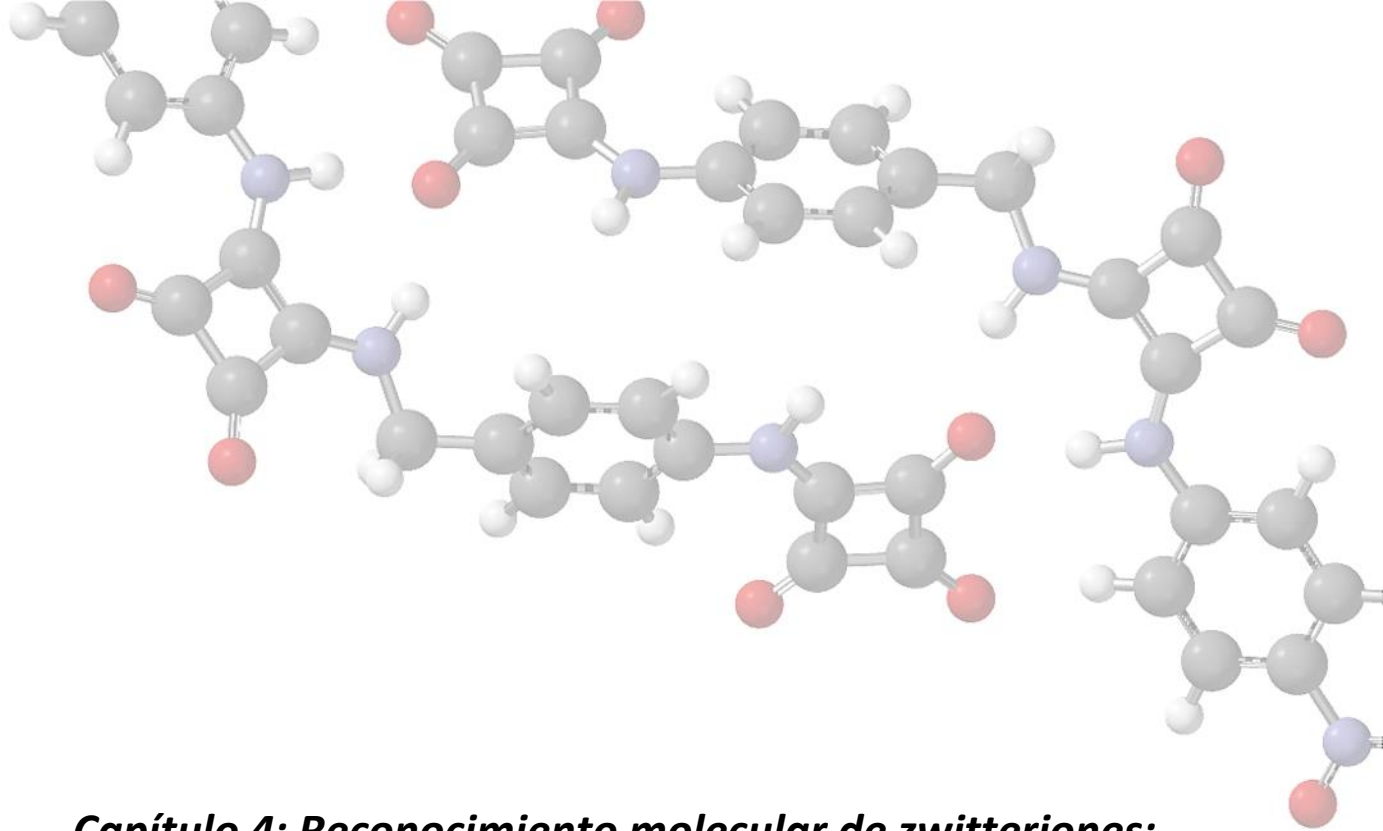
**Figura E3.3.** Imagen tomada de la disposición de las piezas de aluminio funcionalizadas sobre la placa del espectrómetro de MALDI-TOF.

### ***3.6.9. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)***

Las medidas de Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) se realizaron en la Universidad del País Vasco UPV/EHU en un sistema SPECS (Berlín, Alemania) equipado con un analizador Phoibos 150 1D-DLD y una fuente de radiación monocromática Al K $\alpha$  (1486.7 eV). Se llevó a cabo un análisis inicial de los elementos presentes (wide scan: step energy 1 eV, dwell time 0.1 s, pass energy 80 eV) y se realizaron análisis detallados de los elementos presentes (detail scan: step energy 0.1 eV, dwell time 0.1 s, pass energy 30 eV) con un ángulo de salida de electrones de 90°. Los espectros se analizaron mediante el software CasaXPS 2.3.16, que modeliza las contribuciones Gauss-Lorentzian después de la substracción del fondo (Shirley).

### ***3.6.10. Espectroscopia UV de reflectancia total***

Los espectros de UV se han registrado con un espectrofotómetro Varian Cary 300Bio provisto de un accesorio de esfera integradora DRA-CA-30I (70 mm de diámetro de apertura, LabSphere). La muestra se coloca frente a la abertura con una cuña adaptadora, de manera que la radiación se focaliza sobre la muestra con un ángulo de incidencia de 8°. De esta manera se adquiere la reflectancia total como suma de las reflectancias especular y difusa. La referencia utilizada para hacer el blanco ha sido un disco de Spectralon® (PTFE), el mismo material que recubre el interior de la estera integradora.



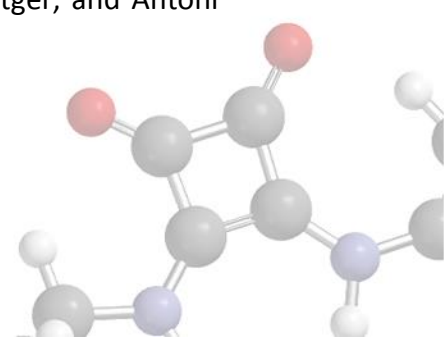
***Capítulo 4: Reconocimiento molecular de zwitteriones:  
reconocimiento selectivo de miltefosina mediante un  
receptor de base escuaramida-escuaramato.\****



***\*Molecular Recognition of Zwitterions: Enhanced Binding and Selective Recognition of Miltefosine by a Squaramide-Based Host***

Carlos López, Elena Sanna, Lucas Carreras, Manuel Vega, Carmen Rotger, and Antoni Costa.

*Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 84 – 87



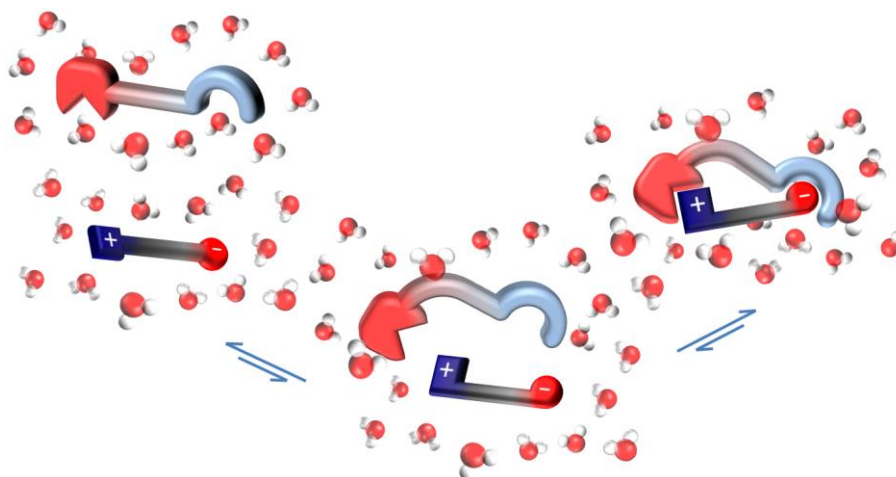




## 4.1. Introducción

### 4.1.1. Receptores para moléculas zwitteriónicas

El estudio de moléculas de interés biomédico supone una de las líneas de investigación más activas dentro de la Química Supramolecular. En este sentido se han publicado una gran cantidad de trabajos sobre el reconocimiento de moléculas bioactivas de carácter aniónico y catiónico. Sin embargo, el diseño de receptores para moléculas zwitteriónicas resulta más complejo, por lo que no se ha profundizado tanto a pesar de la gran relevancia de estos compuestos en los sistemas biológicos. La dificultad reside en la propia naturaleza de un zwitterión. El hecho de poseer varios centros cargados suele implicar una muy elevada solubilidad en agua, pero una escasa solubilidad en disolventes orgánicos no próticos, en la que se desarrollan muchos trabajos de reconocimiento molecular.

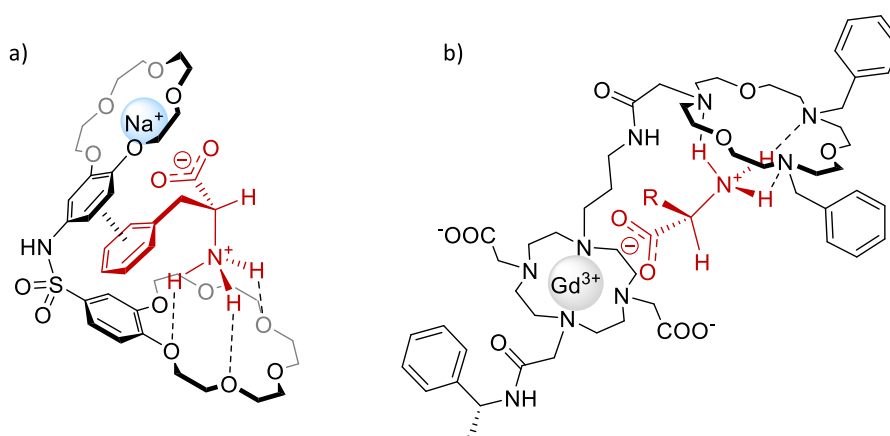


**Figura 4.1.** Esquema de los equilibrios de desolvatación del receptor y del sustrato para la posterior formación del complejo *host-guest*.

Uno de los problemas habituales que rodean el diseño de receptores es la competencia del disolvente a la hora de llevar a cabo interacciones con el sustrato (Figura 4.1). En el caso de moléculas zwitteriónicas, éste puede convertirse en el principal escollo a superar, ya que los dos centros cargados se encuentran altamente solvatados y, en la mayoría de casos, la energía de interacción receptor-sustrato y la correspondiente solvatación del complejo no compensa la energía requerida para la desolvatación del receptor y el sustrato por separado. De la misma manera, según que grupos funcionales se incluyan en el receptor, la propia solvatación del mismo puede impedir la formación del complejo *host-guest* deseado.

Los receptores de moléculas zwitteriónicas presentan generalmente una estructura ditópica, con una región destinada a interactuar con el centro aniónico unida mediante un espaciador a otra región con afinidad para grupos catiónicos. La naturaleza química del grupo pro-aniónico es muy diversa, lo cual se verá en los siguientes ejemplos. En cambio, para la región pro-catiónica es muy común el uso de éteres corona. El espaciador entre ambos componentes suele ser el que determina la selectividad del receptor. Además, éste puede utilizarse a su vez como grupo sensible a partir del cual se lleva a cabo la detección del sustrato en cuestión por ejemplo mediante métodos espectroscópicos.

Para el reconocimiento de la parte aniónica del zwitterión es habitual el uso de cationes metálicos parcialmente coordinados al receptor, de manera que el sustrato pueda actuar como ligando. Por ejemplo, un catión  $\text{Na}^+$  coordinado dentro de un éter corona es suficiente para interactuar con el grupo carboxilato de una fenilalanina (Figura 4.2a).<sup>113</sup> La amina protonada en este caso interactúa con otro éter corona del receptor, mientras que el espaciador aromático aporta la selectividad interaccionando por stacking con el fenilo del aminoácido. Un ejemplo similar lo constituye el mostrado en la Figura 4.2b. En este caso el carboxilato del zwitterión se coordina sobre un complejo formado entre el catión  $\text{Gd}^{3+}$  y un azaéter corona.<sup>114</sup>



**Figura 4.2.** Ejemplos de receptores de aminoácidos con complejos metálicos de éter o azaéter corona como región de interacción con cationes.

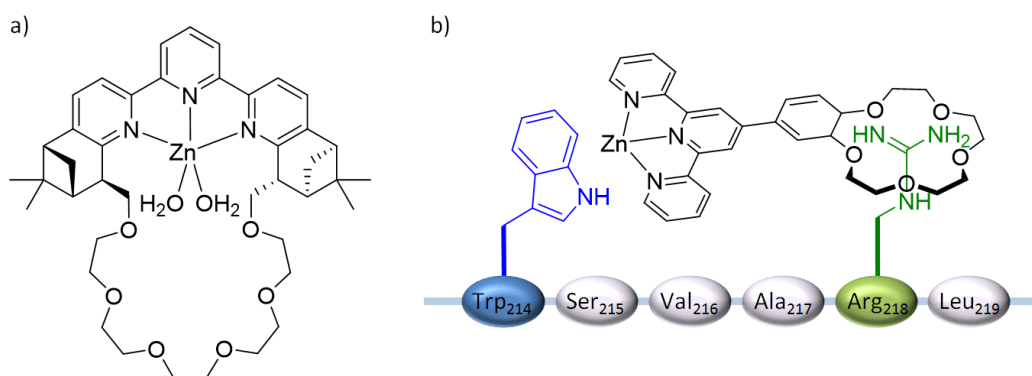
Siguiendo el mismo principio que en los dos ejemplos anteriores se han publicado algunos receptores similares para aminoácidos. De nuevo se utiliza un éter corona para interactuar con la amina protonada, así como un catión metálico, en este caso  $\text{Zn}^{2+}$ , para interactuar con

<sup>113</sup> M. D. Barboiu, N. D. Hovnanian, C. Luca, L. Cot, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9221–9232.

<sup>114</sup> F. Oukhatar, S. Môme, W. Môme, F. Szeremeta, N. K. Logothetis, G. Angelovski, Éva Tóth, *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 219–225.



el carboxilato. Sin embargo, en este caso el metal se encuentra coordinado al receptor mediante un ligando terpiridina, que es activo como fluoróforo. De esta manera, al enlazarse el carboxilato se produce una disminución en la señal de fluorescencia, que se utiliza como sensor en mezclas de agua/DMF (Figura 4.3a). Este receptor además muestra cierta selectividad por L-aspartato y L-cisteína.<sup>115</sup> El diseño del receptor de la Figura 4.3b. permite la señalización de fragmentos concretos de péptidos, al ser capaz de interactuar con cadenas laterales de arginina mediante el éter corona, mientras interactúa con el grupo indólico de un triptófano con el complejo terpiridina-Zn(II).<sup>116</sup> Es importante resaltar que este receptor actúa en agua, un medio altamente competitivo.



**Figura 4.3.** a) Esquema de un receptor de aminoácidos a partir de un éter corona y  $Zn^{2+}$  coordinado a una terpiridina. b) Representación de un esquema similar de receptor con capacidad para reconocer fragmentos peptídicos.

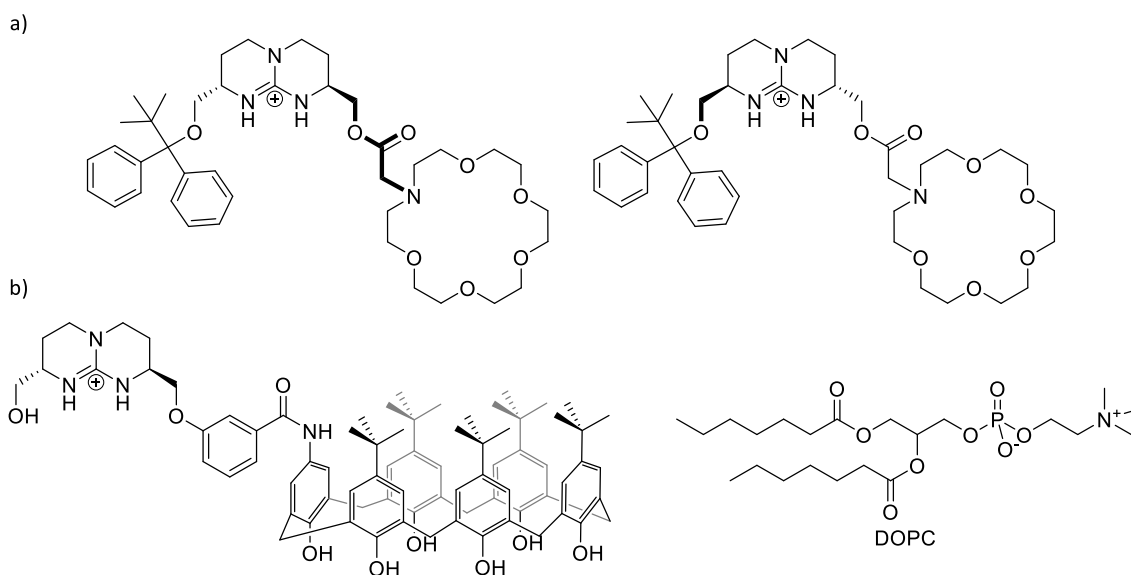
Un grupo comúnmente utilizado para la interacción con la parte aniónica de un zwitterión es el grupo guanidinio. El receptor de aminoácidos de la Figura 4.4a es un ejemplo de ello. La interacción con el carboxilato se lleva a cabo de nuevo a partir de un éter corona. Sin embargo, en este caso el espaciador ópticamente activo que una ambas partes aporta la selectividad requerida para el reconocimiento del enantiómero L o D del aminoácido.<sup>117</sup> El mismo grupo guanidinio unido a un calixareno se utiliza para el reconocimiento de la dioctanoil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (DOPC),<sup>118</sup> una molécula muy similar a la que se ha utilizado en este capítulo (Figura 4.4b).

<sup>115</sup> H. L. Kwong, W. L. Wong, C. S. Lee, C. T. Yeung, P. F. Teng, *Inorg. Chem. Commun.* **2009**, *12*, 815–818.

<sup>116</sup> X. Zhou, X. Jin, D. Li, X. Wu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3921–3923.

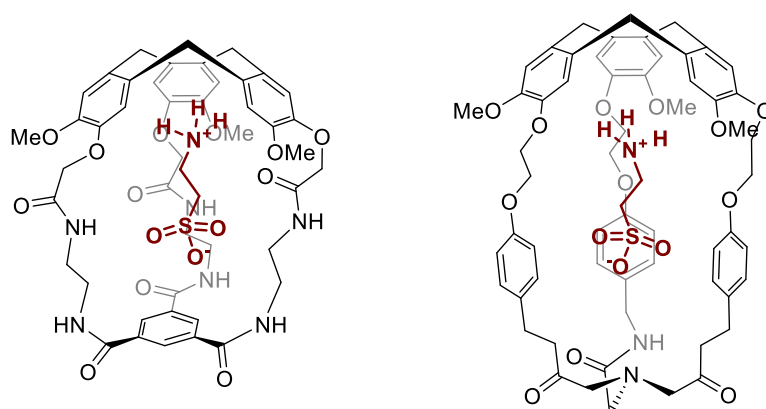
<sup>117</sup> G. Lu, F. Liu, W. Song, W. He, P. Prados, J. de Mendoza, *Mater. Sci. Eng. C* **1999**, *10*, 29–32.

<sup>118</sup> J. de Mendoza, V. Alcazar, E. Botana, A. Galan, G. Y. Lu, J. O. Magrans, M. Martin Portugues, P. Prados, A. Salmeron, J. Sanchez Quesada, C. Seel, M. Segura. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 577–582.



**Figura 4.4.** a) Esquema de receptores enantioméricos para el reconocimiento de D y L-aminoácidos. b) Esquema para el reconocimiento de dioctanoil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (DOPC).

Las interacciones de tipo ión- $\pi$  son generalmente más débiles que las originadas a partir de enlaces de hidrógeno o de coordinación por metales. Sin embargo el receptor que aparece en la Figura 4.4b se basa en este tipo de interacciones para anclar la carga positiva del sustrato mediante un calixareno.<sup>118</sup> Otro ejemplo de este tipo de sistemas son las cápsulas que aparecen en la Figura 4.5 capaces de reconocer aminoácidos no peptídicos como taurina o GABA.<sup>119</sup> En este caso el reconocimiento molecular se lleva a cabo principalmente mediante interacciones de tipo anión- $\pi$  y catión- $\pi$ .

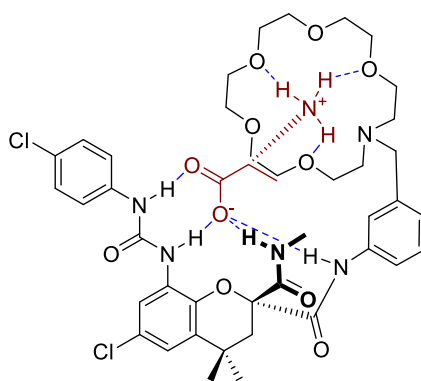


**Figura 4.5.** Esquema de cápsulas capaces de reconocer aminoácidos no peptídicos como GABA y taurina mediante interacciones de tipo ión- $\pi$ .

<sup>119</sup> (a) O. Perraud, V. Robert, A. Martinez, J-P. Dutasta. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13405 – 13408; (b) O. Perraud, V. Robert, H. Gornitzka, A. Martinez, J-P. Dutasta. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 504 –508.

Las ureas constituyen un grupo de compuestos con capacidad de interacción frente a aniones. Por lo tanto, es frecuente encontrar unidades urea formando parte de la estructura de receptores para zwitteriones. Las ureas presentan algunas características comunes con las escuaramidas. En concreto una urea ofrece dos NH donadores de enlace de hidrógeno como ocurre con las escuaramidas. En el ejemplo que se presenta en la Figura 4.6, la urea se combina con un grupo amida y un azaéter corona para dar lugar a un receptor de alanina.<sup>120</sup>

Las escuaramidas poseen algunas características comunes a las ureas, y por ello se han utilizado frecuentemente para la preparación de receptores de aniones. Sin embargo, hasta la fecha no existen precedentes de receptores de base escuaramida diseñados para el reconocimiento de zwitteriones.



**Figura 4.6.** Esquema de un receptor de alanina constituido por un azaéter corona, una urea y una amida como regiones de unión con el sustrato zwitteriónico.

#### 4.1.2. Miltefosina: un zwitterión con actividad biológica como objetivo de estudio

La miltefosina es un compuesto bioactivo activo frente a la leishmaniasis, una enfermedad zoonótica causada por un protozoo del género *Leishmania* que se transmite por la picadura de mosquitos del género *Phlebotomus*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente hasta formas más graves en las que se produce una inflamación severa del hígado y del bazo, pudiendo llegar a ser letales. La enfermedad, por su naturaleza zoonótica, afecta tanto a cánidos como a humanos. Sin embargo, animales silvestres como liebres, zarigüeyas, coatíes y osos hormigueros, entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, por lo que se les considera animales reservorio.

<sup>120</sup> O. H. Rubio, R. Taouil, F. M. Muñiz, L. M. Monleón, L. Simón, F. Sanz, J. R. Morán, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 477–485.

La miltefosina (hexadecilfosfocolina) es un compuesto alquil-fosfolipídico (Figura 4.7). Presenta un grupo trimetil amonio cuaternario separado por dos carbonos de un fosfodiéster, al que está unida una cadena alquílica de 16 carbonos. El compuesto es un zwitterión muy soluble en agua y moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares.

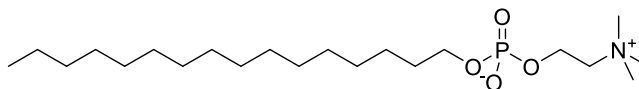


Figura 4.7. Estructura química de la miltefosina.

La miltefosina se diseñó originalmente para tratar el cáncer de mama y otros tumores sólidos. Sin embargo, no pudo desarrollarse como agente oral a causa de la limitación en la dosis debida a la toxicidad gastrointestinal que provoca y sólo se ha aprobado como tratamiento tópico de metástasis en la piel.<sup>121</sup> Paralelamente se investigó la actividad antileishmanial de la miltefosina en animales de experimentación, obteniendo muy buenos resultados.<sup>122</sup> En 1996 se aprobó la evaluación clínica de la miltefosina oral como tratamiento para la leishmaniasis visceral humana, demostrándose su elevada eficacia para combatir esta enfermedad.<sup>123</sup> Así, la miltefosina se ha convertido en el primer fármaco oral aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis. Actualmente la miltefosina forma parte de la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud.<sup>124</sup>

La miltefosina se ha elegido como diana para llevar a cabo los experimentos de reconocimiento molecular que se exponen en la presente Memoria, debido a su condición de molécula zwitteriónica con actividad biológica, y que es objeto de interés en el grupo de investigación.

<sup>121</sup> (a) J. Verweij, A. Planting, M. van der Burg, G. Stoter. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **1992**, 118(8), 606-608; (b) R. Dummer, M. Krasovec, J. Röger, H. Sindermann, G. Burg. *J Am Acad Dermatol.*, **1993**, 29(6), 963-970.

<sup>122</sup> (a) S. L. Croft, R. A. Neal, W. Pendergast, J. H. Chan. *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, 36(16), 2633-2636; (b) S. L. Croft, D. Snowdon, V. Yardley. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1996**, 38(6), 1041-1047; (c) A. Kuhlencord, T. Maniera, H. Eibl, C. Unger. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, 36(8), 1630-1634.

<sup>123</sup> J. Berman. *Expert Opin Pharmacother.*, **2005**, 6(8), 1381-1388.

<sup>124</sup> WHO (2015). *19th WHO Model List of Essential Medicines*. November 8, **2016**.

## 4.2. Objetivos

A partir del método de síntesis de ácidos escuarámicos optimizado en el Capítulo 2, en este capítulo se diseñará y sintetizará un receptor ditópico de base escuaramida para moléculas zwitteriónicas, que incluya un centro escuaramato cargado negativamente. Para ello se ha dividido el estudio en tres fases:

- En primer lugar, se estudiará la capacidad de autoagregación del receptor mediante valoraciones por  $^1\text{H-RMN}$ .
- En segundo lugar, y siguiendo la misma técnica, se medirán las constantes de interacción del receptor con el substrato miltefosina. Estos datos se compararán con los valores obtenidos de las constantes de interacción con aniones tales como cloruro, sulfato, acetato, etc.
- Finalmente, con el fin de evaluar la capacidad repulsora de aniones del centro escuaramato del receptor, se diseñarán y sintetizarán receptores análogos al anterior con dos o ninguno de estos grupos. De esta manera, se determinarán las constantes de asociación con miltefosina y con aniones y se comparará con los valores obtenidos para el receptor ditópico anterior.



### 4.3. Diseño y síntesis de un receptor de base escuaramida para miltefosina

Las escuaramidas presentan un modo de interacción dual que permite el reconocimiento de cationes de amonio cuaternarios<sup>26,125</sup> y, alternativamente, una gran variedad de aniones incluyendo haluros<sup>126</sup> y oxoaniones.<sup>41,127</sup> Además, las transiciones conformacionales promovidas por procesos de reconocimiento permiten que los receptores basados en escuaramidas adapten su estructura al analito para satisfacer mejor los requerimientos necesarios para un reconocimiento eficiente de pares iónicos.<sup>42</sup> En base al conocimiento adquirido, se ha diseñado un receptor de base escuaramida que presenta una alta afinidad y selectividad hacia la miltefosina, una molécula zwitteriónica de interés biológico y farmacológico. Para ello se ha utilizado la dimerización dinámica y la reorganización conformacional de un receptor escuaramídico flexible, sinérgicamente combinado con interacciones cooperativas mediante enlaces de hidrógeno. Con este fin se ha introducido por primera vez una unidad de escuaramato cargada como sitio de unión de la parte catiónica de la miltefosina, la cual se situará a una distancia precisa de una unidad escuaramida convencional, que deberá servir para interactuar con la parte aniónica del zwitterión. Esta combinación de dos tipos diferentes de unidades escuaramida ilustra una forma efectiva de mejorar la afinidad y la selectividad hacia una molécula zwitteriónica utilizando un receptor relativamente sencillo.<sup>128</sup>

El ácido escuarámico precursor **1** se ha preparado mediante la condensación quimioselectiva de la 4-aminobenzilamina con ácido escuarámico.<sup>129</sup> El receptor **4**, en forma de sal sódica, se ha preparado mediante la condensación secuencial de escuarato de dietilo con *p*-nitroanilina,<sup>59</sup> y luego con el ácido escuarámico **1** (Esquema 4.1).

<sup>125</sup> (a) S. Tomás, M. C. Rotger, J. F. González, P. M. Deyà, P. Ballester, A. Costa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2523-2526; (b) S. Tomàs, R. Prohens, G. Deslongchamps, P. Ballester, A. Costa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2208-2211.

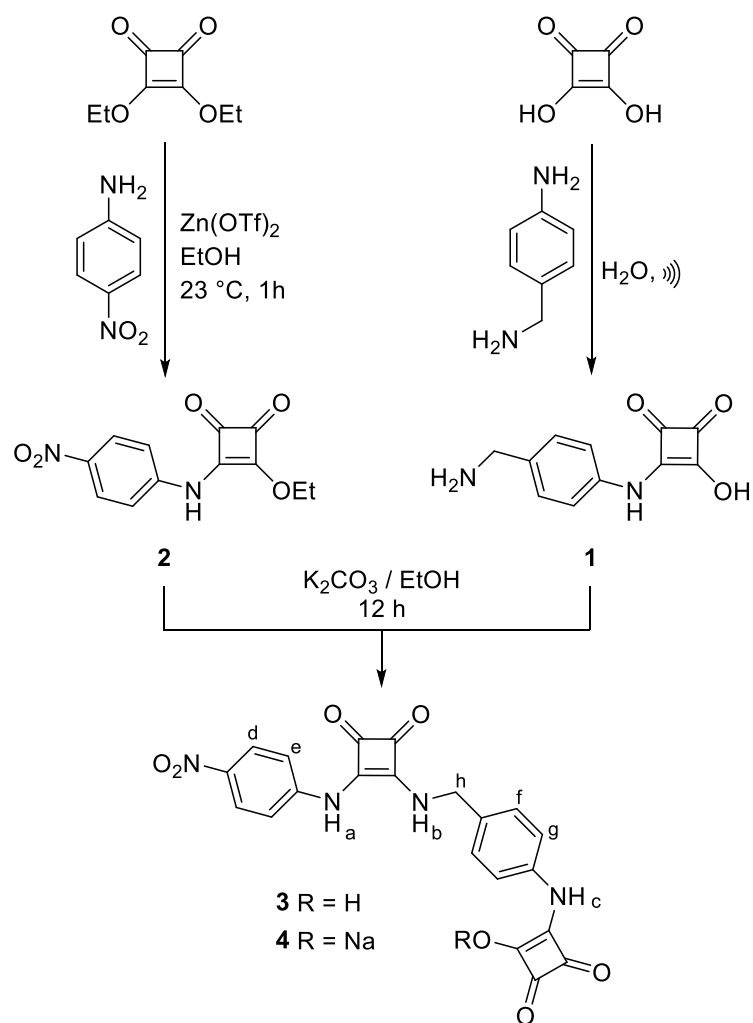
<sup>126</sup> (a) V. Ramalingam, M. E. Domaradzki, S. Jang, R. S. Muthyala, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3315-3318; (b) G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 702-712.

<sup>127</sup> (a) A. Frontera, J. Morey, A. Oliver, M. N. Piña, D. Quiñonero, A. Costa, P. Ballester, P. M. Deyà, E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7185-7195; (b) M. N. Piña, B. Soberats, C. Rotger, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *New. J. Chem.* **2008**, *32*, 1919-1923.

<sup>128</sup> (a) A. Metzger, K. Gloe, H. Stephan, F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2051-2055; (b) J. Voskuhl, T. Fenske, M. C. A. Stuart, B. Wibbeling, C. Schmuck, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8300-8306; (c) C. Schmuck, V. Bickert, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4579-4581.

<sup>129</sup> Ácido escuarámico **5m**, Tabla 2.3, reacción 12 y Sección Experimental 2.5.2.

Esquema 4.1. Síntesis del receptor 4.





## 4.4. Resultados y discusión

La introducción de una unidad de escuaramato con carga negativa provoca que **4** dimerice espontáneamente, probablemente orientando las unidades en una disposición cabeza-cola mediante la formación de enlaces de hidrógeno, dando lugar a dímeros o incluso oligómeros (Figura 4.8). Debido a esto, en primer lugar se ha investigado el estado de agregación de **4** por  $^1\text{H}$  RMN. Al aumentar la concentración de **4** en DMSO- $d_6$ , los tres hidrógenos NH experimentan desplazamientos a campo bajo, mientras que varios hidrógenos aromáticos se desplazan a campo alto ( $H_g$ ) o a campo bajo ( $H_e$ ,  $H_f$ ), indicando la formación de especies agregadas. El análisis global de los desplazamientos químicos se han llevado a cabo con el software HypNMR<sup>130</sup> dan lugar a las constantes  $K_{\text{dim}} = 285(2) \text{ M}^{-1}$  and  $K_{\text{trim}} = 90(2) \text{ M}^{-2}$  correspondientes a la formación de las especies **4**<sub>2</sub> y **4**<sub>3</sub>, respectivamente. Por tanto, en vez de darse un fenómeno de repulsión debido a la presencia de cargas negativas similares, los desplazamientos químicos y las constantes calculadas indican un equilibrio dinámico entre especies tales como monómeros, dímeros y, en menos proporción, trímeros (<8% at  $10^{-3} \text{ M}$ ).<sup>131</sup> Los estudios de modelación molecular (B3LYP/6-31G\*) llevados a cabo sobre el dímero **4**<sub>2</sub> sugieren un empaquetamiento antiparalelo con simetría  $C_2$ , en el que el hidrógeno  $\text{ArH}_e$  participa en las interacciones por puente de hidrógeno ayudando así a estabilizar el dímero (Figura 4.8).<sup>132</sup>

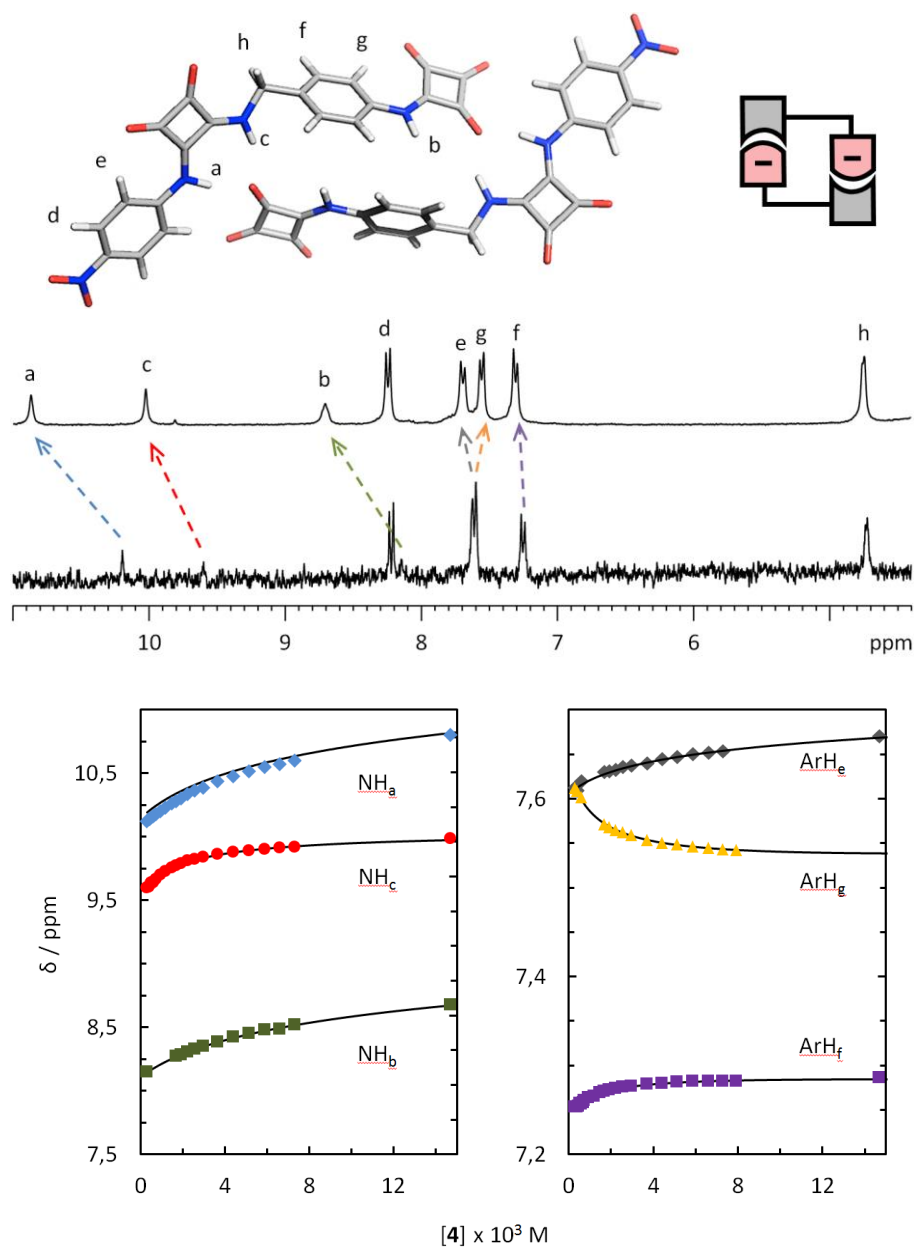
Los estudios de modelización molecular indican que el receptor **4** de base escuaramida-escuaramato permite la interacción simultánea con los grupos tetraalquilamonio y fosfato de la miltefosina utilizando las unidades escuaramato y escuaramida respectivamente. La capacidad de interacción de **4** con la miltefosina se ha investigado por  $^1\text{H}$  RMN. Las valoraciones llevadas a cabo mediante la adición de miltefosina sobre una disolución de **4** en DMSO- $d_6$  (Figura 4.9) muestran un notable desplazamiento a campo bajo de los dos hidrógenos  $\text{NH}_a$  y  $\text{NH}_b$  (> 1.0 ppm), evidenciando una interacción por enlace de hidrógeno de la unidad escuaramida con el grupo fosfato de la miltefosina. El hidrógeno aromático  $H_c$  también sufre un desplazamiento a campo bajo indicando su participación en la formación de enlaces de hidrógeno de tipo  $\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}\cdots\text{O}$ . Al mismo tiempo, los protones  $H_g$  and  $H_h$  experimentan un pequeño pero significativo desplazamiento a campo alto sugiriendo un entorno ligeramente blindado magnéticamente. Por otra parte, tanto la señal de  $\text{NH}_c$  del escuaramato, muy aguda,

<sup>130</sup> HypNMR 2008 program (Protonic Software; <http://www.hyperquad.co.uk>); (a) C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi, A. Vacca, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 374-382; (b) C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, S. Ghelli, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1041-1052.

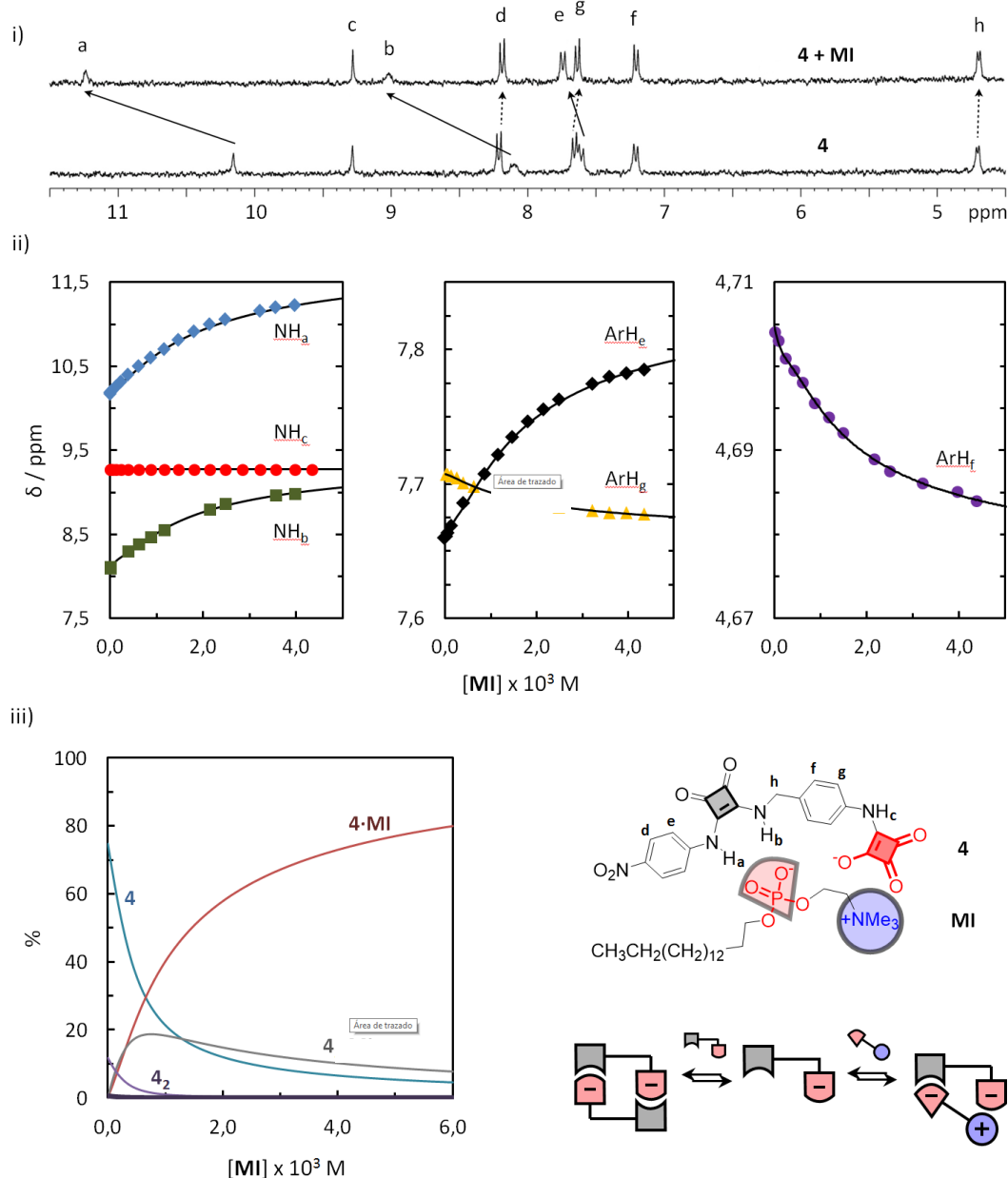
<sup>131</sup> Como ejemplo de la formación en DMSO de agregados supramoleculares cíclicos frente a oligómeros lineales ver: C. Schmuck, T. Rehm, L. Geiger, M. Schafer, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6162-6170.

<sup>132</sup> Las interacciones por puentes de hidrógeno entre aniones cloruro y los hidrógenos aromáticos en *orto* en escuaramidas *p*-nitrofenil sustituidas ha sido publicado: V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, M. Milani, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4368-4380.

como la señal de H<sub>d</sub> permanecen prácticamente sin cambios, indicando que no intervienen en la formación de interacciones con el sustrato.



**Figura 4.8.** Desplazamientos de <sup>1</sup>H RMN dependientes de la concentración de las señales de los hidrógenos más significativos de **4** en DMSO-d<sub>6</sub> a temperatura ambiente (298 K) en un rango de concentraciones entre  $3.0 \cdot 10^{-4}$  y  $1.5 \cdot 10^{-2}$  M. Los símbolos representan los valores experimentales. Las curvas se corresponden a los valores de desplazamiento químico calculados a partir de la regresión no lineal de los valores experimentales mediante el software HypNMR.<sup>130</sup>



**Figura 4.9.** i) Cambios en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de **4** ( $7.38 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) en  $\text{DMSO}-d_6$  a 298 K, en presencia de 6 equivalentes de miltefosina. ii) Gráficas de los cambios sufridos por cada una de las señales de **4** ( $7.38 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) al incrementar la concentración de **MI**. Los símbolos representan los valores experimentales. Las curvas se corresponden a los valores calculados a partir de la regresión no lineal de los valores experimentales. iii) Perfiles de la distribución simulada de las cinco especies participantes:  $4 \cdot \text{MI}$ ,  $4_2 \cdot \text{MI}$ , **4**,  $4_2$ , and  $4_3$  ( $< 0.6\%$ , no es visible a esta escala).

Por otra parte, los valores de desplazamiento químico extraídos de las valoraciones llevadas a cabo por  $^1\text{H}$  NMR con el receptor **4** y miltefosina **MI** se han analizado utilizando modelos de unión 1:1 ( $4 \cdot \text{MI}$ ) y 2:1 ( $4_2 \cdot \text{MI}$ ) e incluyendo las constantes previamente calculadas de auto-agregación  $4_2$  ( $280 \text{ M}^{-1}$ ) y  $4_3$  ( $90 \text{ M}^{-2}$ ). De esta manera se han obtenido las constantes

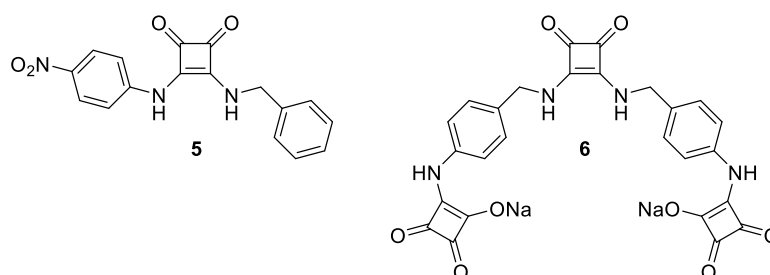
de asociación por etapas  $K_{11}= 3.6(1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{21}= 2.7(6) \times 10^3 \text{ M}^{-2}$  para los complejos **4**·**MI** y **4**<sub>2</sub>·**MI**, respectivamente. Otros intentos de ajustar los datos experimentales a modelos diferentes de complejación no alcanzan la convergencia. La complejación de **4** con miltefosina a concentraciones milimolares muestra la formación dominante de complejos 1:1 (Figura 4.9iii), aunque a bajas concentraciones de miltefosina ( $< 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) la presencia tanto de complejos 2:1 como de dímeros de **4** resulta significativa.

De acuerdo con todo ello, los experimentos de ROESY revelan contactos intermoleculares entre protones de **4** (NH e hidrógenos aromáticos) y varios protones clave de la miltefosina, especialmente aquellos más próximos al grupo fosfodiéster (Figura E4.1). El complejo 1:1 resulta también claramente visible por espectrometría de MALDI-TOF en modo negativo como una señal con valor de  $m/z$  de 840.393, asignada a  $[\mathbf{4} \cdot \mathbf{MI}]^-$  (Figura E4.2). Además, los experimentos de DOSY<sup>133</sup> llevados a cabo también aportan evidencias de la formación de un sistema multicomponente (ver Sección Experimental, Tabla E4.1 y EFigura 4.3).

La idoneidad del receptor se ha explorado por otras vías. Por ejemplo, la afinidad del receptor por la miltefosina no mejora mediante el aumento de unidades de escuaramato dentro de la misma molécula. Las valoraciones llevadas a cabo con los compuestos **5** y **6** (Esquema 4.2) adicionando **MI**, una vez efectuado el correspondiente análisis de los desplazamientos químicos debido a la formación de complejos, aportan constantes de  $K_{11}= 5.8(1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{11}= 6.6(1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  para **5**·**MI** (Figura E4.4) y **6**·**MI** (Figura E4.5), respectivamente. Ambos valores resultan ser aproximadamente cinco veces inferiores que la constante que deriva de la formación del complejo **4**·**MI**. Por otra parte la afinidad del complejo **5**·**MI**, que carece de unidad escuaramato, se corresponde al rango de valores afinidad publicados para complejos de aniones con escuaramidas.<sup>59</sup> Sin embargo, el valor obtenido para **6**·**MI** es inferior a lo esperado debido a la repulsión mutua existente entre las dos unidades escuaramato. Por tanto, el receptor **4** muestra un balance óptimo de grupos capaces de llevar a cabo interacciones con **MI** unido a una conformación favorable para tal efecto. Además, el carácter auto-complementario de **4** ayuda a aumentar la selectividad en presencia de substratos potencialmente competitivos. Por ejemplo, las valoraciones de **4** con bromuro o ioduro de tetrametilamonio no producen ninguna variación en los desplazamientos químicos. Por otra parte el cloruro de tetraetilamonio (TEACl), con mayor capacidad de interacción, forma un complejo con **4** con una constante de asociación  $K_{11}= 1.3(1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  (Figura E4.6), inferior a la obtenida para el complejo **5**·**TEACl**,  $K_{11}= 2.8(1) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  (Figura E4.7).

<sup>133</sup> Diffusion Ordered Spectroscopy

Esquema 4.2. Estructura de los receptores 5 y 6.



El papel que juega la unidad escuaramato no es únicamente el de aumentar la capacidad de interacción, sino que también hace las veces de "guardameta" para repeler o al menos minimizar la interacción de otros substratos potencialmente competitivos con **4**. Esta función de bloqueo es incluso más efectiva con moléculas zwitteriónicas cuya estructura no encaja con la del receptor. Para ilustrar este punto se ha investigado la capacidad de complejación del 2-(trietilamonio)etano sulfonato (TEAES), un zwitterión sulfonado de estructura referible a la miltefosina. La distancia entre cargas en una molécula de TEAES extendida ( $4.3 \text{ \AA}$ )<sup>134</sup> es más corta que en el caso de la miltefosina ( $5.0 \text{ \AA}$ ). La diferente longitud de ambos da lugar a un modo de interacción con **4** totalmente distinto (Figura 4.10). Tras la adición de un exceso de TEAES sobre **4**, los únicos hidrógenos que sufren desplazamientos son  $\text{NH}_c$  y  $\text{H}_g$ , mientras que el resto permanece prácticamente inalterado (Figura E4.8). Este resultado indica que TEAES no interacciona con el núcleo de escuaramida, sino únicamente con el escuaramato.

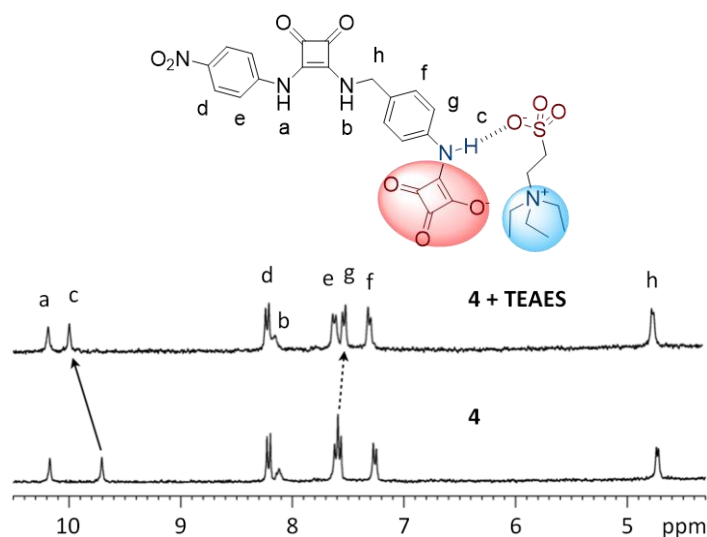


Figura 4.10. Cambios en el espectro de  $^1\text{H}$  NMR de **4** ( $1.03 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) en  $\text{DMSO-d}_6$  a 298 K, en presencia de 8 equivalentes de TEAES.

<sup>134</sup> M. Galin, A. Chapoton, J. C. Galin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1993**, 545-553.

## 4.5. Conclusiones

En resumen, se ha sintetizado un receptor incorporando dos unidades derivadas de escuaramida diferentes con una alta afinidad y selectividad hacia miltefosina. Comparando con otros receptores de zwitteriones existentes que combinan calixarenos o éteres corona para el reconocimiento de la parte catiónica del sustrato, aquí se ha introducido por primera vez una unidad escuaramato, que combinada con una escuaramida preparada para la unión de la parte aniónica da lugar a un receptor simple y selectivo hacia la miltefosina en DMSO.

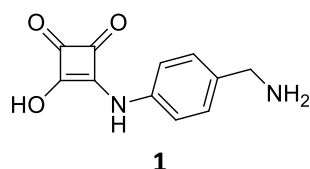
## 4.6. Sección Experimental

### 4.6.1. Información general

Todos los reactivos son de origen comercial y se han utilizado sin llevar a cabo ningún tipo de purificación previa. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) MICROMASS Autospec3000, provisto de una entrada de muestra por electrospray (ESI), o en un espectrómetro Bruker Autoflex (MALDI-TOF) calibrado con PEG BCME(600) y utilizando trans-2-[3(4-t-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden]malononitrilo (DCTB) como matriz. Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300 en DMSO-*d*6. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm, y referenciados a la señal residual del disolvente. Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz. Las síntesis asistidas por microondas se han realizado en viales de 0.5-2 mL mediante un reactor Biotage Initiator (potencia aplicable de 0-400 W con incrementos de 1 W, sensor de temperatura por IR, rango de presiones de 0-20 bar).

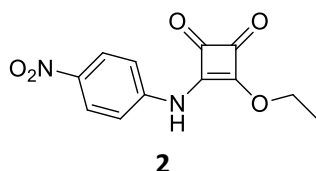
### 4.6.2. Síntesis

#### 3-((4-(aminometil)fenil)amino)-4-hidroxiciclobut-3-en-1,2-diona (1).



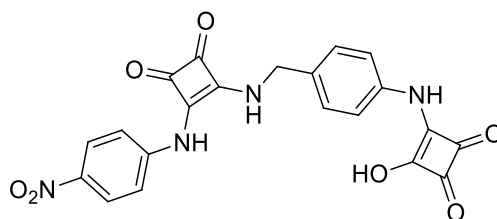
La síntesis y caracterización del producto se detallan en el Capítulo 2 (Sección 2.5.2).

#### 3-(*p*-nitrofenilamino)-4-etoxiciclobut-3-en-1,2-diona (2).



El producto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento que se describe en la bibliografía.<sup>59</sup>

**Ácido nitroescuaramido-escuarámico (3).**



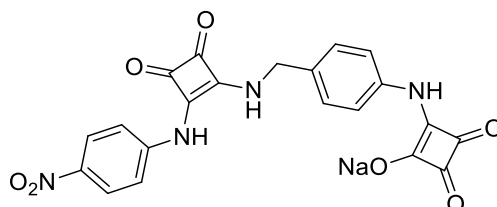
**3**

En un matraz de 50 mL provisto de agitador magnético y en atmósfera inerte de Ar, se introduce una mezcla de ácido escuarámico **1** (29 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq), semiescuarato **2** (24 mg, 0.11 mmol, 1 eq) y carbonato potásico (31 mg, 0.22 mmol, 2 eq) en 20 mL de etanol. La mezcla se calienta a reflujo durante 12 h. Al final de este período, resulta una suspensión violácea que se evapora a sequedad. El residuo sólido se trata con 20 mL de HCl 1M frío, se separa la porción ácida y, a continuación, el residuo se lava primero con HCl 1M y luego con acetonitrilo. El producto se obtiene como un polvo rojizo oscuro insoluble en MeCN (31 mg, 65% de rendimiento).

La misma reacción se ha llevado a cabo mediante la asistencia de calentamiento dieléctrico utilizando un reactor de microondas. En este caso, la misma cantidad de reactivos se han adicionado a un vial de microondas de 2-5 mL con 3 mL de etanol. El tiempo de reacción ha sido de 25 minutos a 130 °C. El producto se ha purificado siguiendo el procedimiento anterior (39 mg, 81% de rendimiento).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.440 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.23 (d, J = 9.0, 2H), 7.64 (d, J = 8.9, 2H), 7.45 (d, J = 8.4, 2H), 7.36 (d, J = 8.4, 2H), 4.78 (d, J = 5.8, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 195.88, 186.92, 185.82, 180.60, 174.92, 170.18, 162.87, 145.82, 141.94, 140.18, 131.48, 129.09, 126.14, 118.85, 118.20, 47.57. Punto de fusión: descompone > 200 °C.

**Receptor nitroescuaramido-escuaramato sódico (4).**



**4**

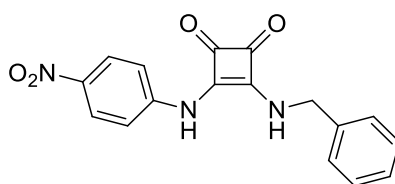
En un frasco Erlenmeyer de 50 mL provisto de agitador magnético se introducen 50 mg (0.11 mmol) de **3** en 20 mL de agua. Se adiciona gota a gota una disolución de NaOH 0.5 M



hasta llegar a pH 7. Después de 15 minutos en agitación, se evapora el disolvente, obteniendo el producto como un sólido granate.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.68 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.23 (d,  $J$  = 8.6, 2H), 7.67 (d,  $J$  = 8.5, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 7.9, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 7.8, 2H), 4.75 (d,  $J$  = 4.6, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 196.00, 186.92, 185.83, 174.97, 170.20, 162.87, 145.82, 141.95, 140.22, 131.43, 129.09, 126.13, 118.84, 118.20, 47.57. MALDI-TOF MS (modo negativo):  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_7^-$ : 433.0790; experimental: 433.0740. Punto de fusión: descompone > 240 °C.

### 3-(benzilamino)-4-((4-nitrofenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5).



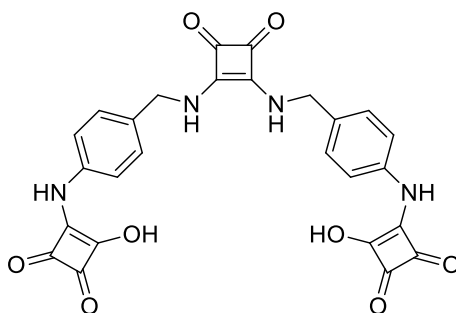
5

En un matraz de 50 mL provisto de agitador magnético y en atmósfera inerte de Ar, se introduce una mezcla de benzilamina (14  $\mu\text{L}$ , 0.14 mmol, 1.2 eq), semiescuarato **2** (30 mg, 0.11 mmol, 1eq) y carbonato potásico (24 mg, 0.17 mmol, 1.5 eq) en 20 mL de etanol. La mezcla se calienta a reflujo durante 12 h. Al final de este período, resulta una disolución de color amarillo pálido que se evapora a sequedad. El residuo sólido se trata con 20 mL de HCl 1M frio, se separa la porción ácida y, a continuación, el residuo se lava primero con HCl 1M y luego con agua hasta pH neutro. El producto se obtiene como un polvo marrón rojizo insoluble (30 mg, 81% de rendimiento).

La misma reacción se ha llevado a cabo mediante la asistencia de calentamiento dieléctrico utilizando un reactor de microondas. En este caso, la misma cantidad de reactivos se han adicionado a un vial de microondas de 2-5 mL con 3 mL de etanol. El tiempo de reacción ha sido de 25 minutos a 130 °C. El producto se ha purificado siguiendo el procedimiento anterior (34 mg, 92% de rendimiento).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.42 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.23 (d,  $J$  = 9.1, 2H), 7.64 (d,  $J$  = 8.7, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.35 (m, 3H), 4.84 (d,  $J$  = 6.2, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 185.76, 180.63, 170.39, 163.03, 145.88, 141.96, 138.66, 129.25, 128.17, 126.13, 118.16, 47.86. Punto de fusión: descompone > 200 °C.

**Ácido escuaramidodiescuarámico (6H).**



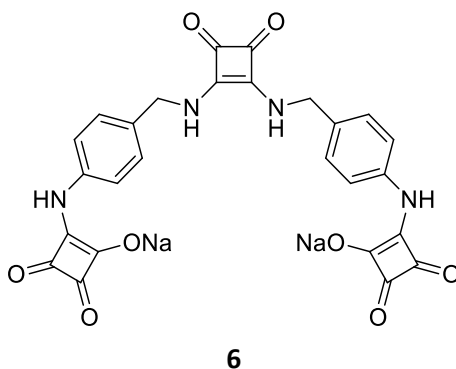
**6H**

En un matraz de 50 mL provisto de agitador magnético y en atmósfera inerte de Ar, se introduce una mezcla de ácido amidoescuárico **1** (35 mg, 0.16 mmol, 2.1 eq), escuarato de dietilo (13 mg, 0.08 mmol, 1 eq) y carbonato potásico (22 mg, 0.16 mmol, 2 eq) en 25 mL de etanol. La mezcla se calienta a reflujo durante 12 h. Al final de este período, resulta una suspensión de color pardo que se evapora a sequedad. El residuo sólido se trata con 20 mL de HCl 1M frío, se separa la porción ácida y, a continuación, el residuo se lava primero con HCl 1M y luego con acetonitrilo. El producto se obtiene como un polvo color pardo insoluble (36 mg, 87% de rendimiento).

La misma reacción se ha llevado a cabo mediante la asistencia de calentamiento dieléctrico utilizando un reactor de microondas. En este caso, la misma cantidad de reactivos se han adicionado a un vial de microondas de 2-5 mL con 3 mL de etanol. El tiempo de reacción ha sido de 40 minutos a 145 °C. El producto se ha purificado siguiendo el procedimiento anterior (34 mg, 81% de rendimiento).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.40 (s, 2H), 7.72 (s, 2H), 7.42 (d,  $J = 8.2$ , 4H), 7.28 (d,  $J = 8.1$ , 4H), 4.65 (d,  $J = 4.4$ , 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 188.43, 185.242, 183.13, 174.07, 171.54, 168.02, 138.50, 134.16, 130.33, 128.88, 128.73, 119.89, 46.90. Punto de fusión: descomposición sobre 270 °C.

## Receptor escuaramidodiescuaramato disódico (6).



En un matraz Erlenmeyer de 50 mL provisto de agitador magnético se introducen 50 mg (0.10 mmol) de receptor **6H** en 20 mL de agua. Se adiciona gota a gota una disolución de NaOH 0.5 M hasta llegar a pH 7. Después de 15 minutos en agitación, se evapora el disolvente, obteniendo el producto como un sólido color ocre.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.40 (s, 2H), 7.72 (s, 2H), 7.42 (d,  $J = 8.2$ , 4H), 7.28 (d,  $J = 8.1$ , 4H), 4.65 (d,  $J = 4.4$ , 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 202.95, 188.39, 183.04, 178.23, 167.95, 141.26, 130.60, 128.80, 117.91, 47.13. Punto de fusión: descompone  $> 280$  °C.

### 4.6.3. Experimentos ROESY

Los espectros de ROESY se han registrado a 298 K utilizando un espectrómetro Bruker Avance III (600 MHz), aplicando un tiempo de mezcla de 400 ms.

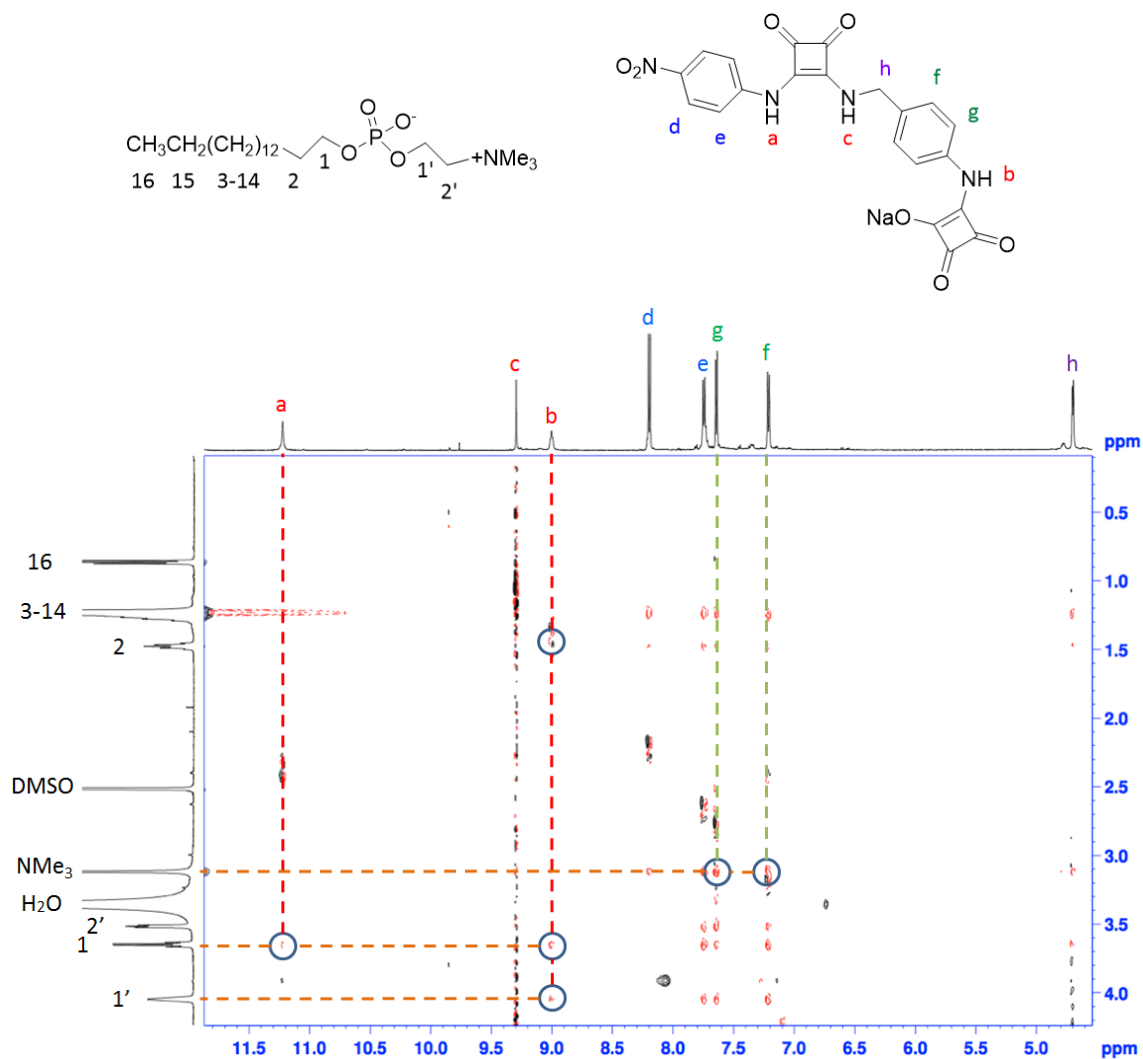
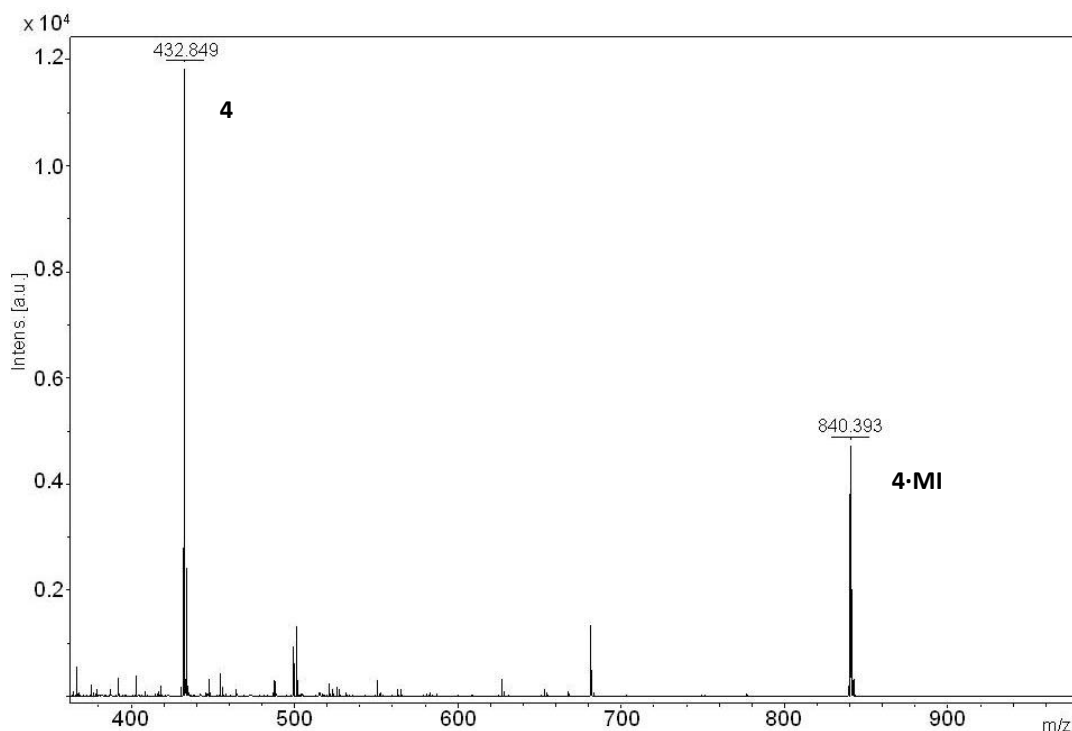


Figura E4.1. Espectro ROESY de una mezcla de 4 y MI en DMSO-d<sub>6</sub>.

#### 4.6.4. MALDI-TOF



**Figura E4.2.** Espectro de masas parcial de MALDI-TOF en modo negativo de una disolución de **4** (1 mg/mL) en DMSO/H<sub>2</sub>O (10% DMSO) con 3 equivalentes de **MI**.

#### 4.6.5. Experimentos DOSY

Los coeficientes de difusión ( $D$ ) se evaluaron mediante secuencias de pulso BPPLIED (bipolar gradient pulse pairs longitudinal-eddy-current delay)<sup>135</sup> y DSTE (double-stimulated-echo).<sup>136</sup> Para todas las muestras se obtuvo el valor de  $D$  como un resultado promedio de tres experimentos diferentes, con tiempos de difusión diferentes 220, 250 y 280 ms y tres mediciones independientes para cada uno.

La intensidad del gradiente se ha calibrado midiendo el coeficiente de auto-difusión de la señal residual HDO en D<sub>2</sub>O ( $1.872 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) a 297K.<sup>137</sup> Se utilizó el sistema de regulación de la temperatura BVT-3000 suministrado por el fabricante. La calibración de la temperatura en el espectrómetro se realizó utilizando una muestra estándar de MeOH-d<sub>4</sub>. En todos los experimentos que requieren regulación de la temperatura, la temperatura se estabilizó en un

<sup>135</sup> D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson Jr., *J. Magn. Reson., Ser. A* **1995**, *115*, 260-264.

<sup>136</sup> A. Jerschow, N. Müller. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 372-375.

<sup>137</sup> R. Mills, *Journal of Physical Chemistry.* **1973**, *77*(5), 685-688.

rango de  $\pm 0,1$  K utilizando un caudal de aire de 800 L/h. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, permitiendo oscilaciones máximas de  $\pm 0,3$  K. La mayoría de los experimentos se adquirieron sin rotar la muestra.

Cada experimento se repitió con intensidad de gradiente creciente ( $g$ ) y el valor  $D$  se obtuvo mediante la medición de la pendiente de la línea de regresión  $\ln(I/I_0)$  frente a  $g^2$ , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -D\gamma^2\delta^2\left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}\right)g^2$$

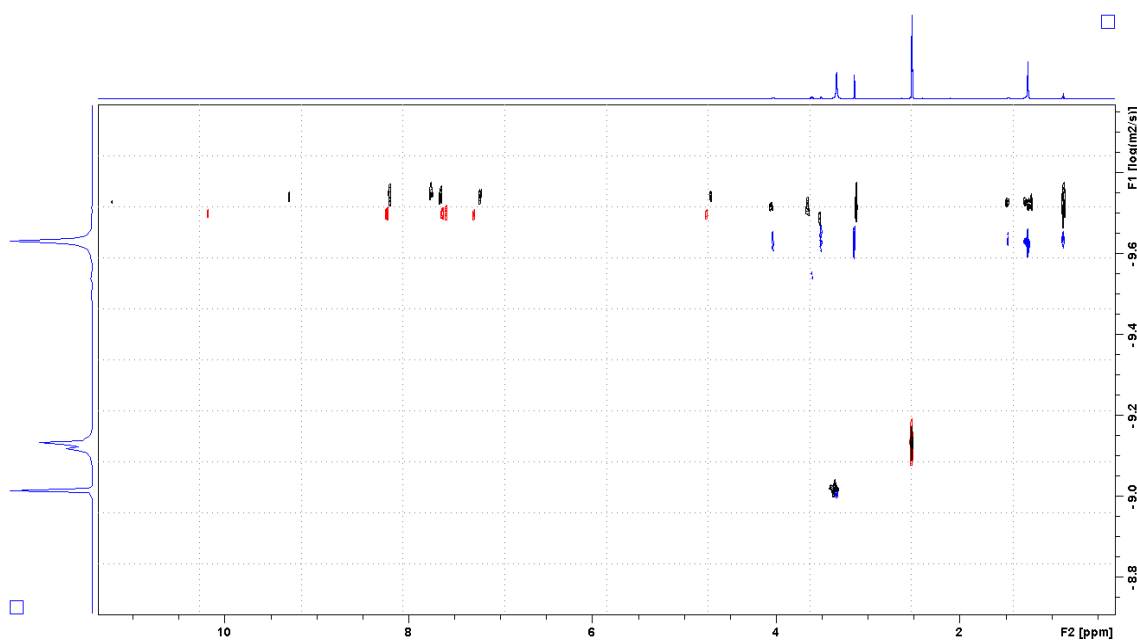
donde  $I$  e  $I_0$  son las intensidades de señal en presencia y ausencia de PFG, respectivamente,  $\gamma$  es la constante giromagnética del núcleo observado ( $\text{rad s G}^{-1}$ ),  $g$  es la intensidad de los gradientes de difusión ( $\text{G cm}^{-1}$ ),  $D$  es el coeficiente de difusión de los giros observados ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $\delta$  es la longitud de la gradiente de difusión (s),  $\Delta$  es el tiempo de separación entre los límites delanteros de los dos pulsos de difusión de gradientes (s) y  $\tau$  es el retardo para la recuperación de gradiente (s).

## Resultados

Tabla E4.1. Coeficientes de difusión  $D$  extraídos a partir de experimentos DOSY llevados a cabo sobre muestras con **4** y **MI** en DMSO- $d_6$  a 297 K.

Muestra	Concentración	$D^a$ ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) (desviación estándar) <sup>b</sup>
<b>4 + MI</b>	1.5 mM (ambos)	$1.71 \times 10^{-10}$ ( $1.4 \times 10^{-12}$ )
<b>4</b>	3 mM	$1.73 \times 10^{-10}$ ( $4.0 \times 10^{-13}$ )
<b>4</b>	0.375 mM	$1.74 \times 10^{-10}$ ( $3.0 \times 10^{-13}$ )
<b>MI</b>	3 mM	$1.99 \times 10^{-10}$ ( $8.0 \times 10^{-13}$ )
<b>MI</b>	0.375 mM	$1.94 \times 10^{-10}$ ( $2.0 \times 10^{-13}$ )

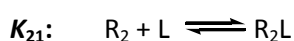
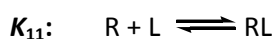
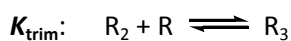
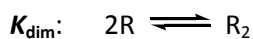
<sup>a</sup>  $D$  es la media de medidas individuales: 5 para el complejo **4+MI** (8.21, 7.21, 3.13, 1.24 y 0.86 ppm), 2 para **4** (8.23 y 7.28 ppm) y 3 para **MI** (3.14, 1.25 y 0.87 ppm). <sup>b</sup> Entre paréntesis, desviación estándar de tres experimentos diferentes con tiempos de difusión distintos (220, 250 y 280 ms) y tres medidas independientes para cada uno.



**Figura E4.3.** Representación simultánea de los espectros de DOSY: **4·MI** (negro), **4** (rojo) and **MI** (azul).

#### 4.6.6. Valoraciones por RMN

Se preparan 2.5 mL de una muestra de receptor de concentración conocida (aproximadamente  $1.0 \times 10^{-3}$  M) en DMSO- $d_6$ . A continuación se retiran 600  $\mu$ L y se registra el espectro de  $^1\text{H}$  RMN. Se pesa con precisión una muestra de sustrato y se disuelve en los 1.9 mL restantes de disolución de receptor (aproximadamente  $6.0 \times 10^{-3}$  M). De esta disolución se adicionan alícuotas sobre el tubo de RMN que contiene la disolución inicial de receptor, llevando a cabo de esta manera una valoración con concentración constante de receptor. Tras cada adición la disolución se agita convenientemente y se deja reposar durante 4 minutos antes de registrar el espectro. Los desplazamientos químicos de las señales superiores a 0.01 ppm se han analizado utilizando el software HypNMR2008,<sup>130</sup> y se han ajustado utilizando los siguientes equilibrios:



donde R = receptor  
 $R_2$  = dímero del receptor  
 $R_3$  = trímero del receptor  
 L = ligando  
 RL = complejo receptor-ligando 1:1  
 $R_2L$  = complejo receptor-ligando 2:1

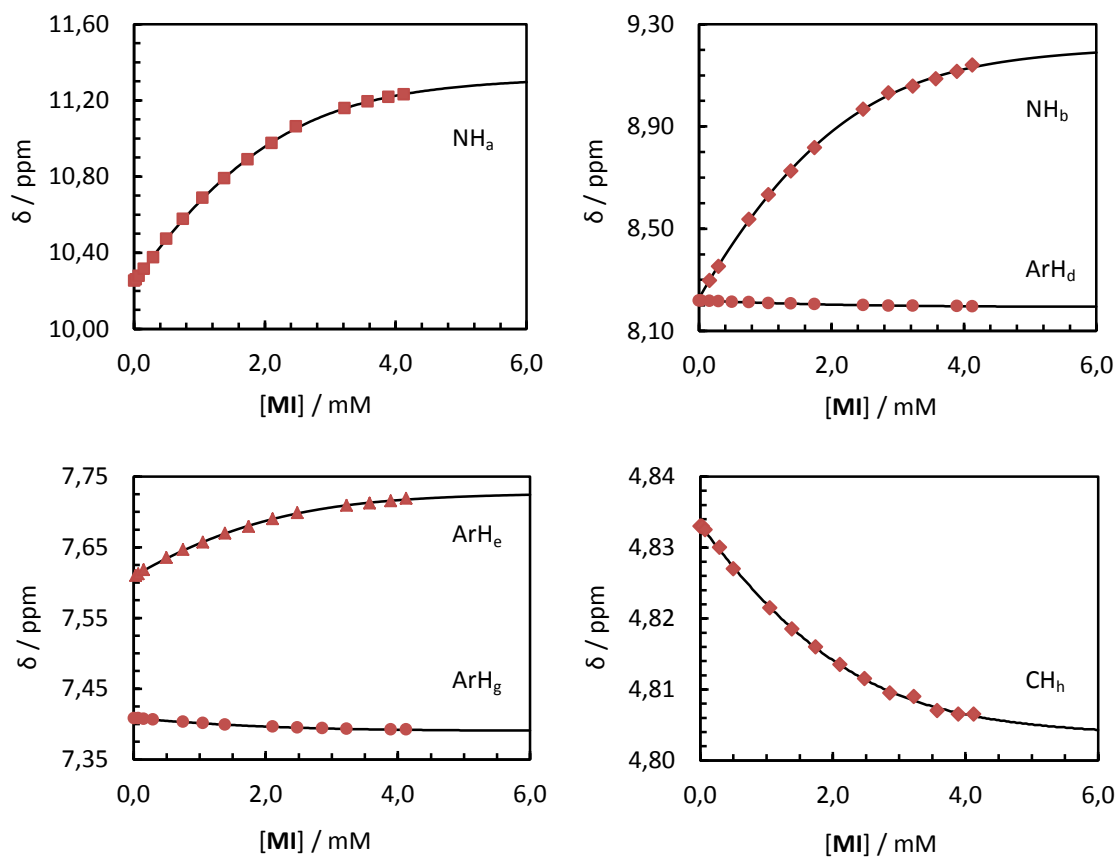
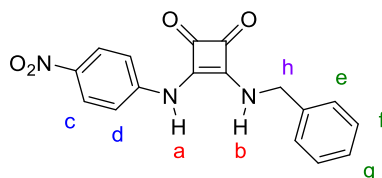


Figura E4.4. Valoración de **5** ( $9.70 \times 10^{-4}$  M) con **MI** ( $5.39 \times 10^{-3}$  M).



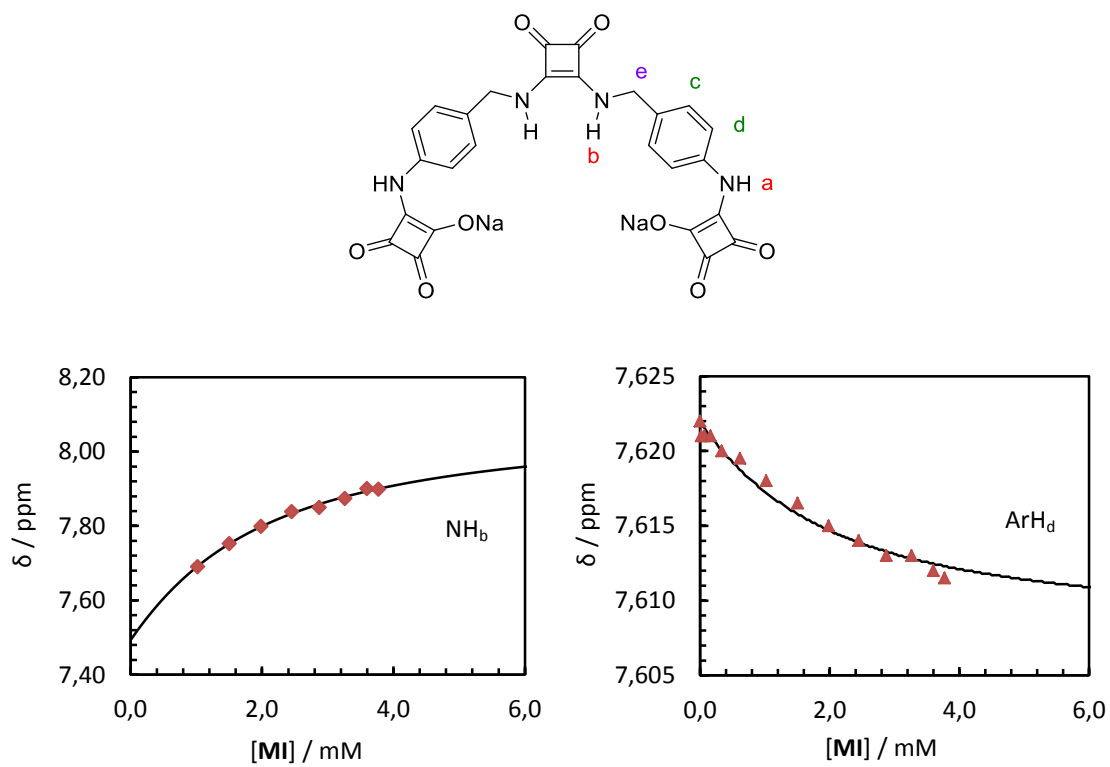


Figura E4.5. Valoración de **6** ( $8.15 \times 10^{-4}$  M) con **MI** ( $4.89 \times 10^{-3}$  M).

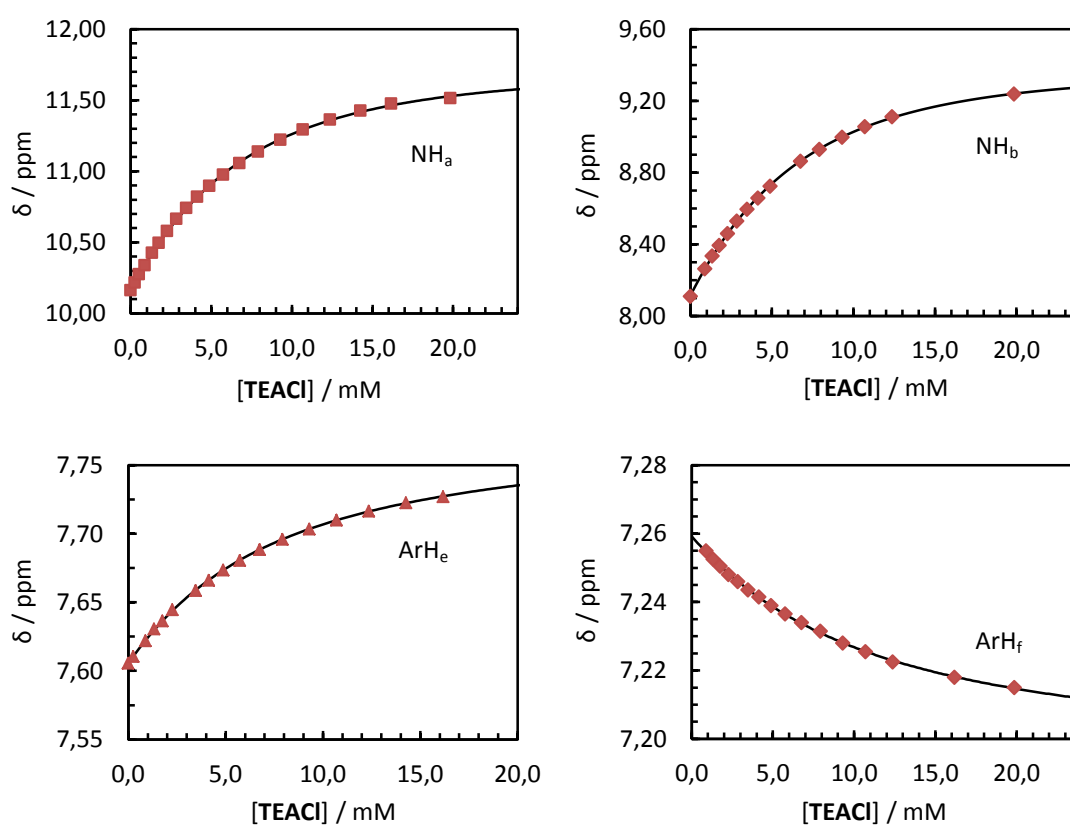
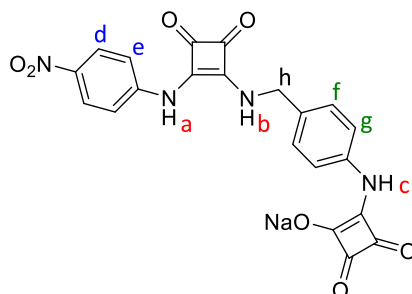


Figura E4.6. Valoración de **4** ( $1.19 \times 10^{-3}$  M) con TEACI ( $2.69 \times 10^{-2}$  M).

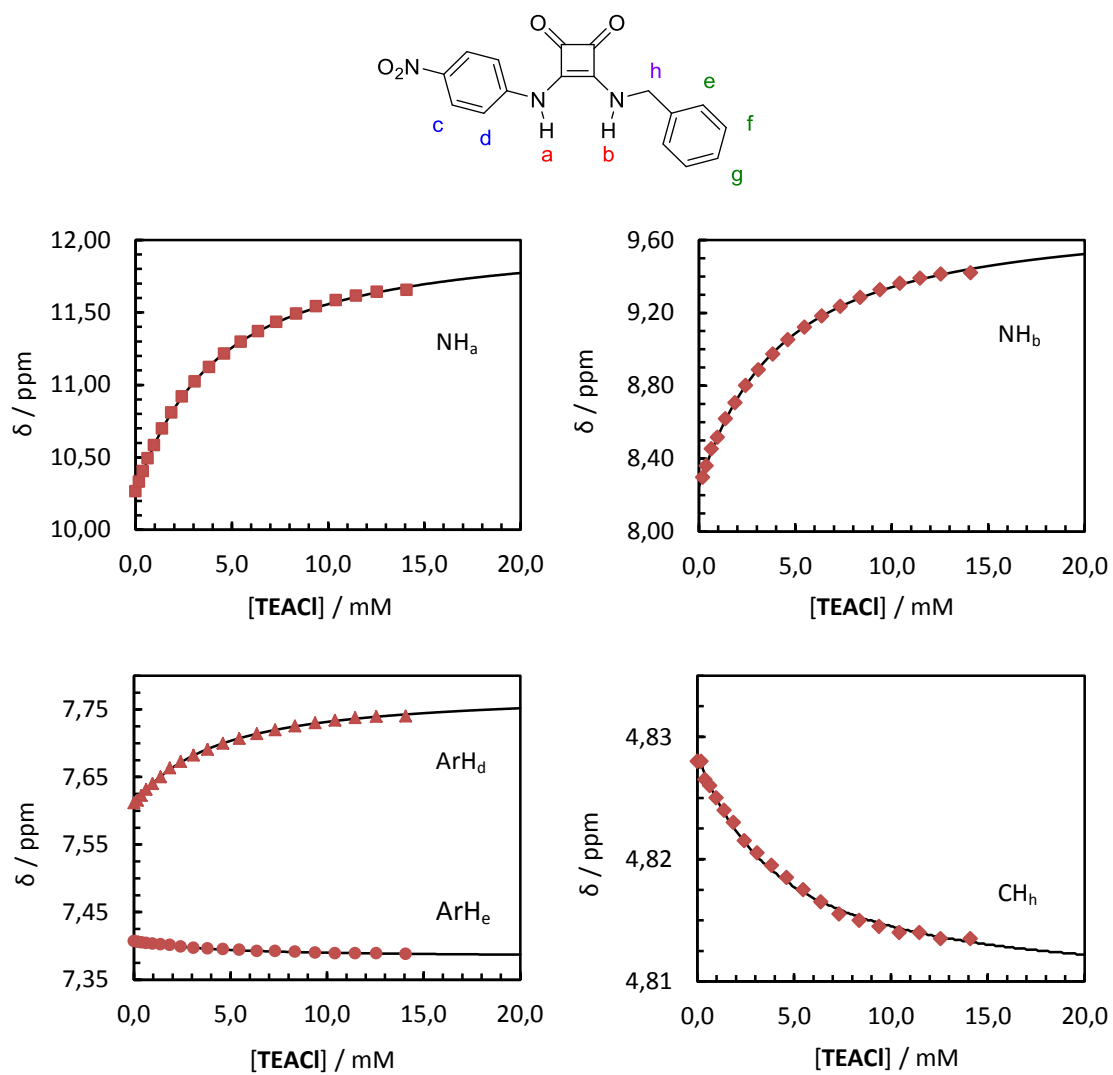


Figura E4.7. Valoración de 5 ( $1.02 \times 10^{-3}$  M) with TEACl ( $1.94 \times 10^{-2}$  M).

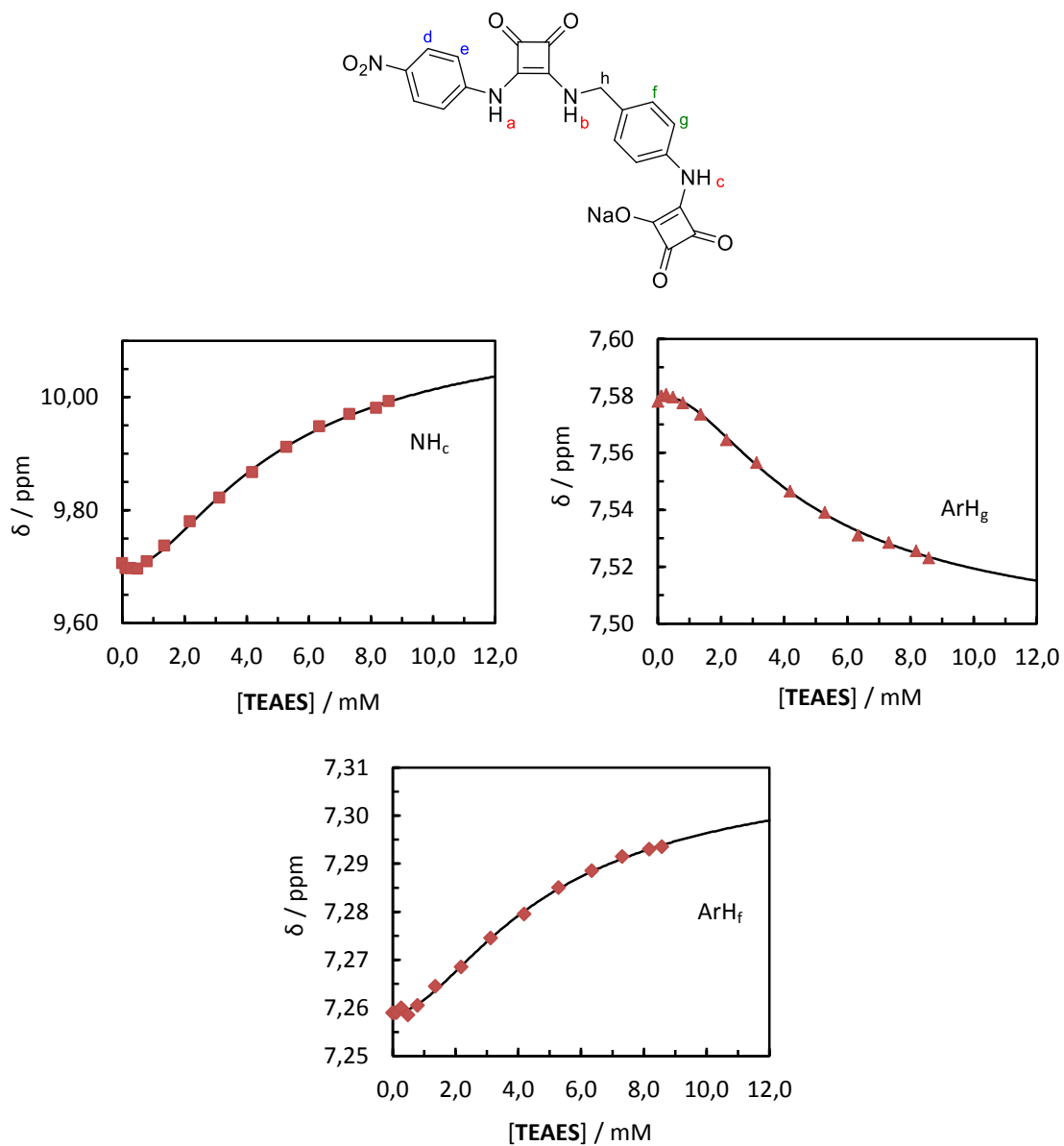
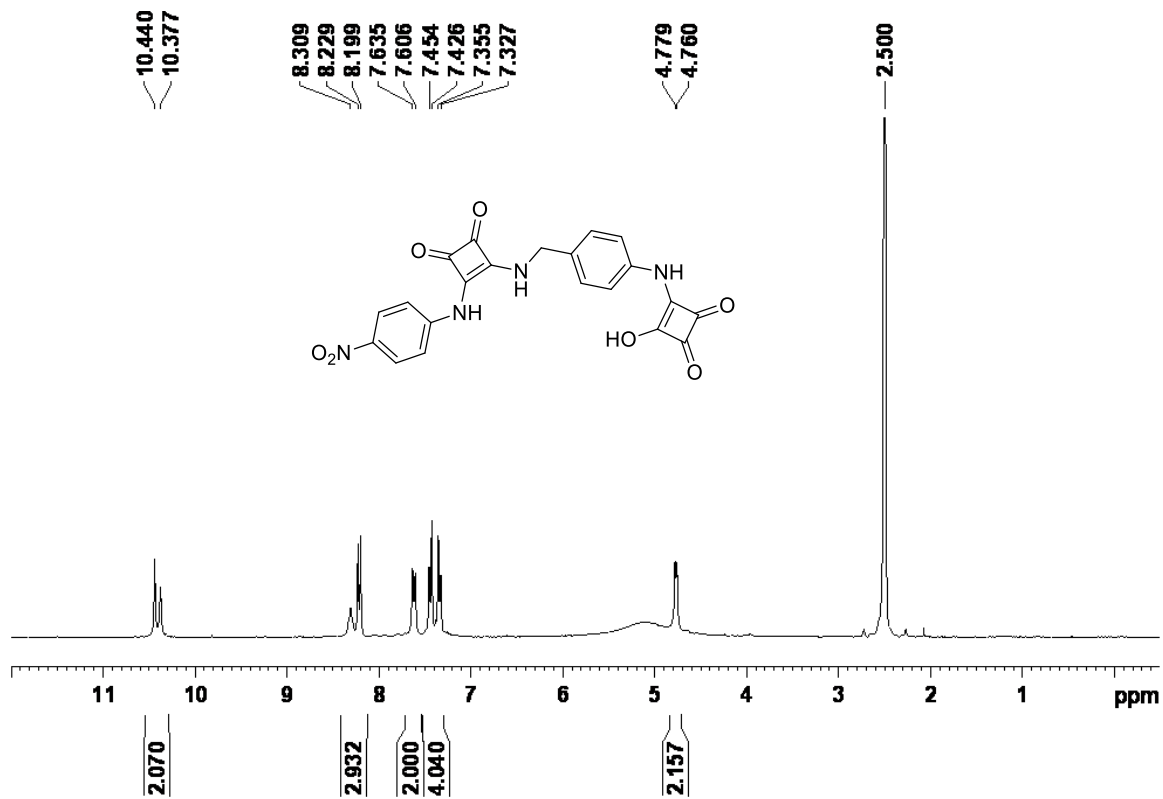
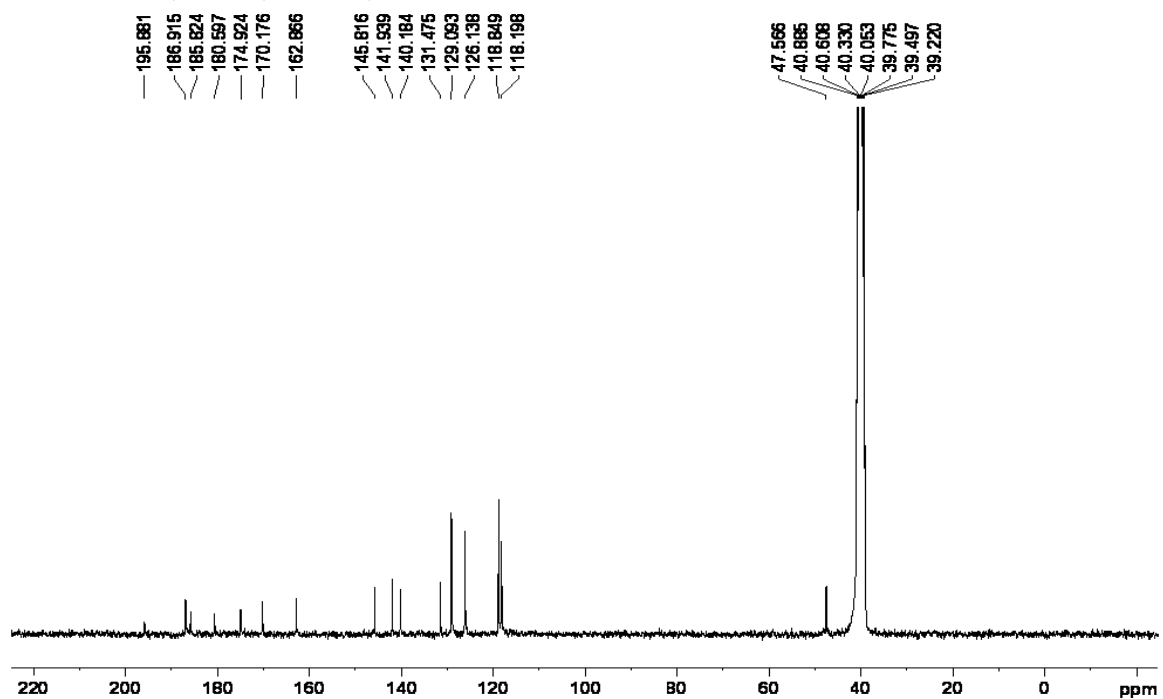


Figura E4.8. Valoración de **4** ( $1.06 \times 10^{-3}$  M) con TEAES ( $1.15 \times 10^{-2}$  M).

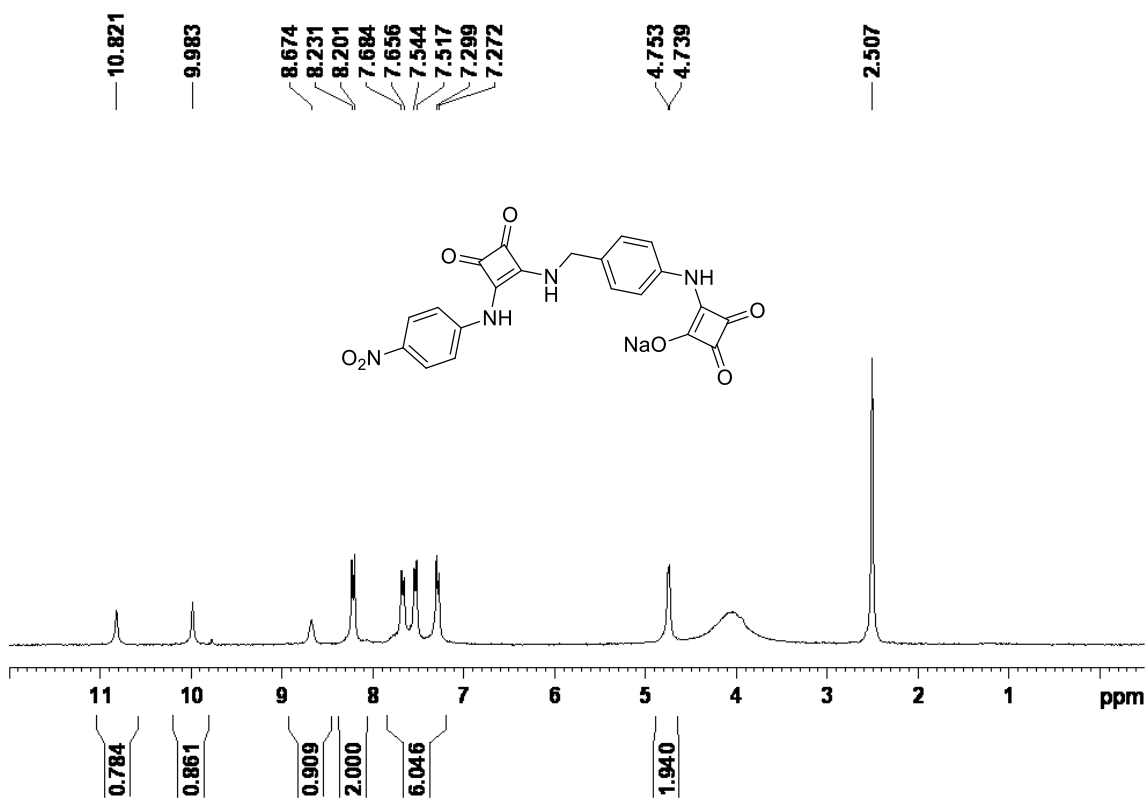
4.6.7. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR.

Ácido escuaramidodiescuarámico.

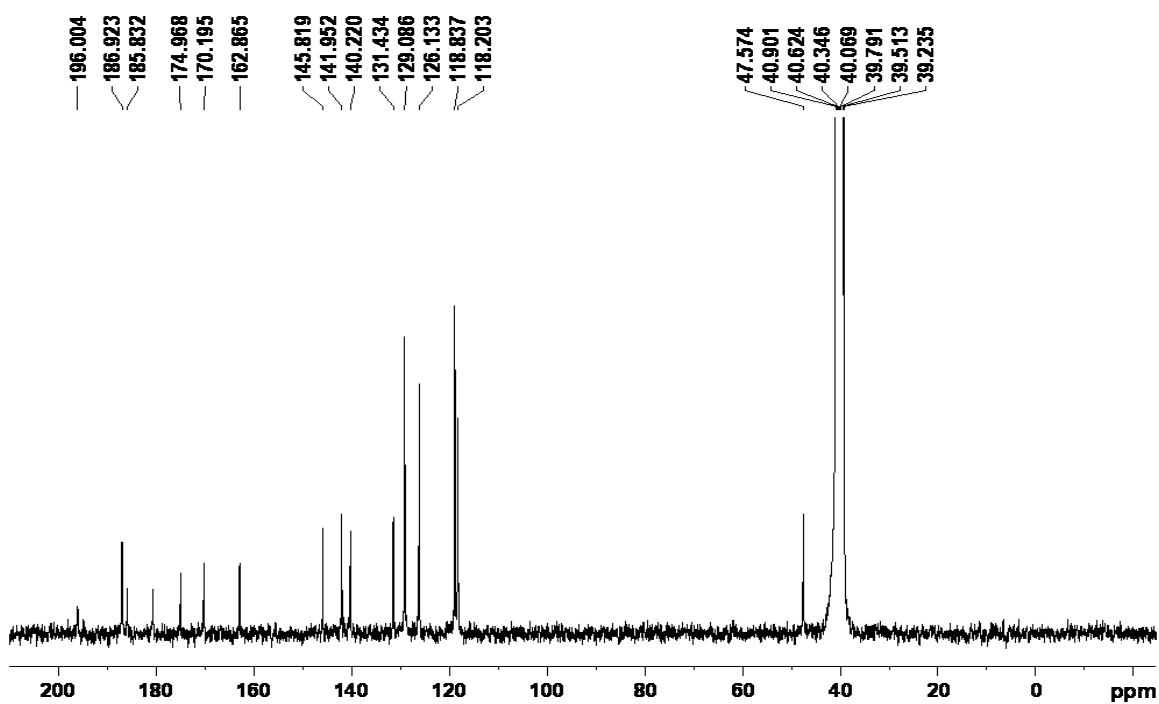
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

Receptor nitroescuaramido-escuaramato sódico (4).

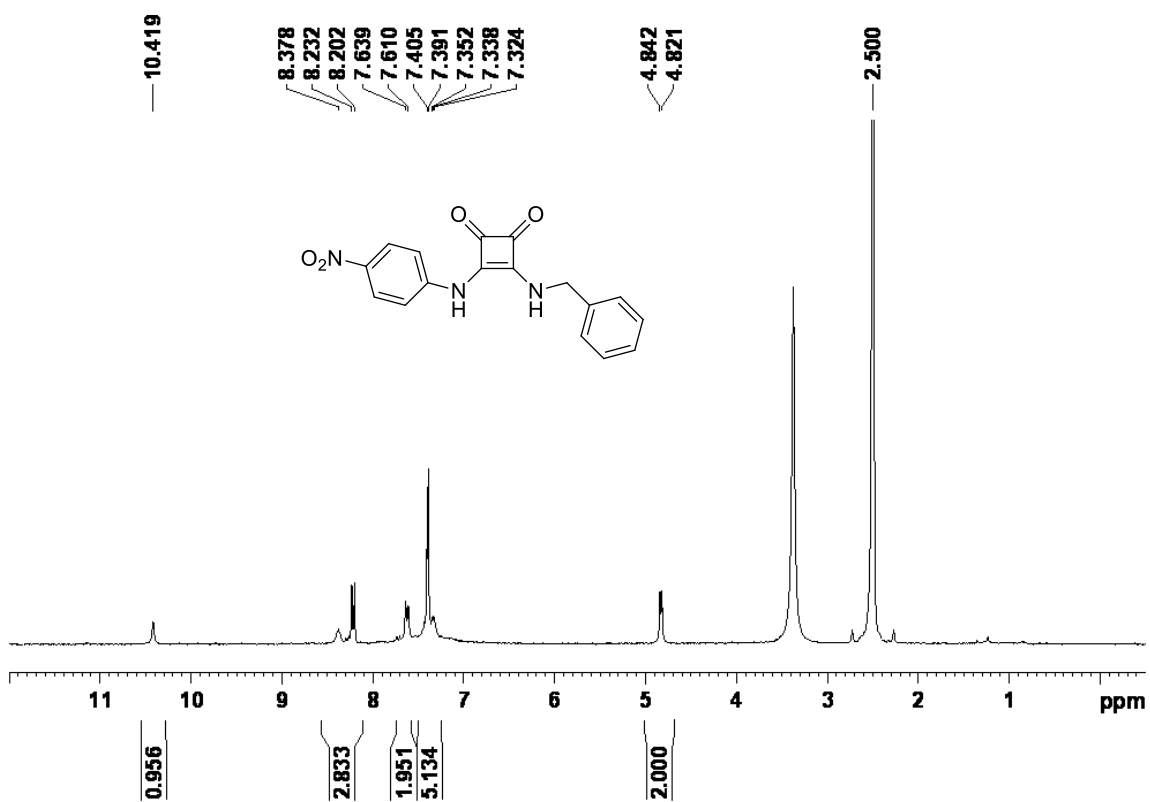
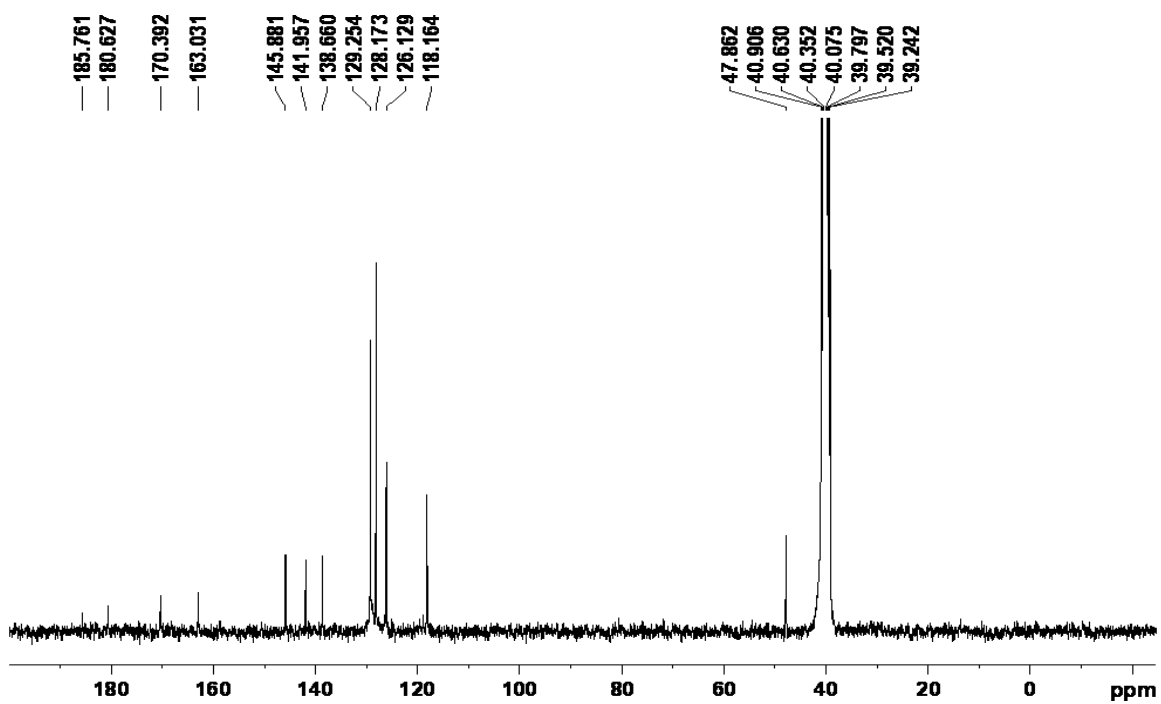
$^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



$^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

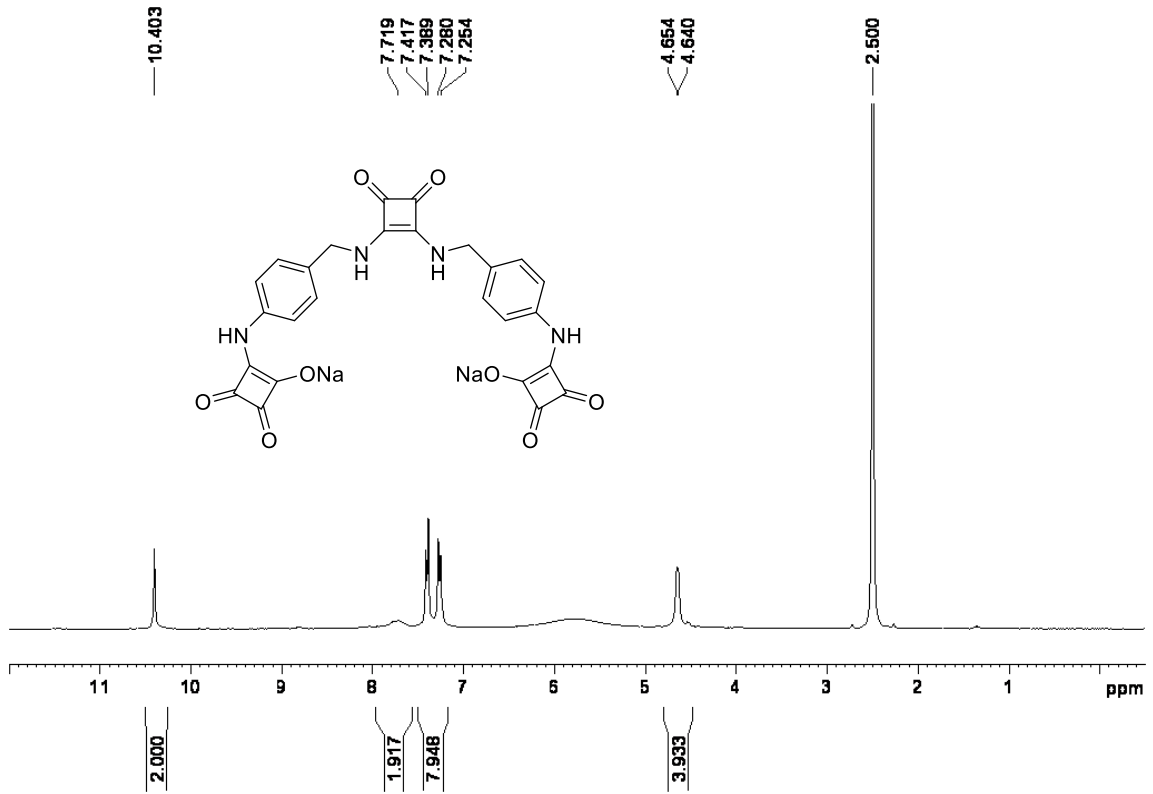


## 3-(benzilamino)-4-((4-nitrofenil)amino)ciclobut-3-en-1,2-diona (5).

 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

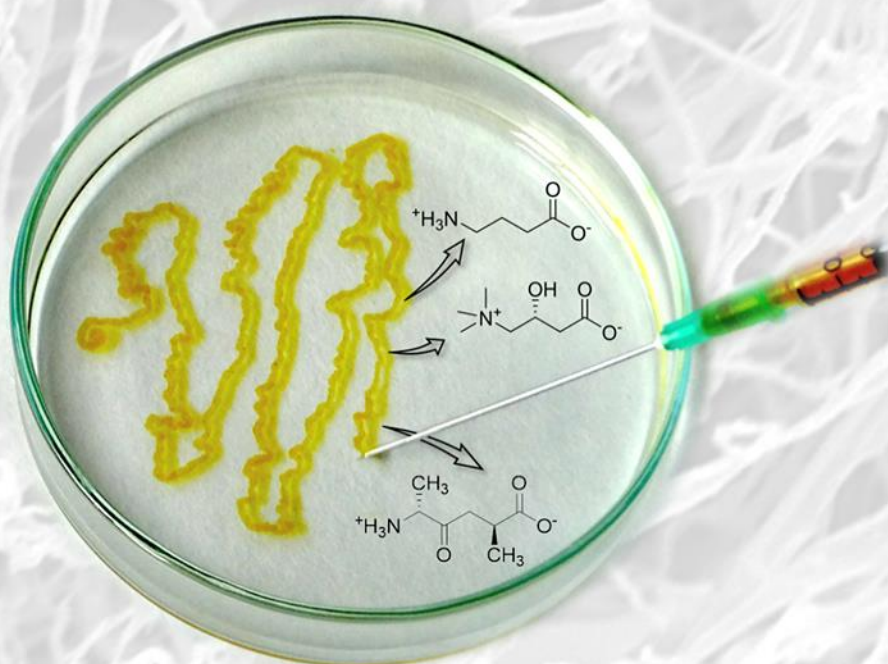
Receptor escuaramidodiescuaramato disódico (6).

$^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K





**Capítulo 5: Hidrogeles supramoleculares anfifílicos  
basados en escuaramido-escuaramatos.\***



***Supramolecular Hydrogels Based on Minimalist Amphiphilic Squaramide-Squaramates for Controlled Release of Zwitterionic Biomolecules***

Carlos López, Marta Ximenis, Francisca Orvay, Carmen Rotger and Antonio Costa

*Chem. Eur. J.* **2017**, DOI: 10.1002/chem.201701029

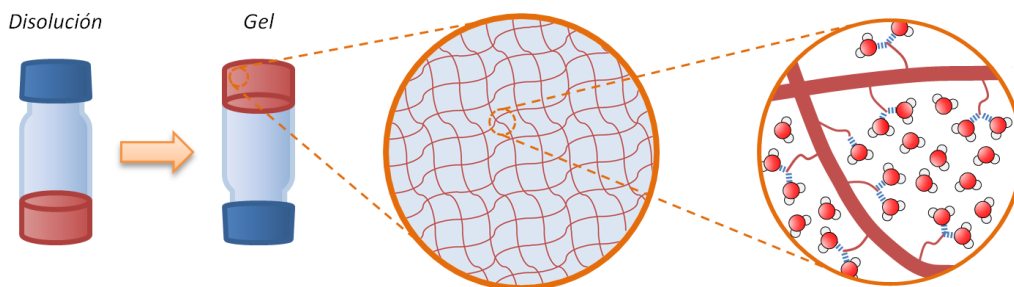


## 5.1. Introducción

### 5.1.1. Hidrogeles

Un hidrogel se puede definir como un sistema coloidal en el que la fase dispersa es un sólido compuesto por una red tridimensional de cadenas o fibras flexibles e hidrófilas, que retienen la fase fluida, que en este caso es agua o un medio acuoso. Las fibras están constituidas por pequeñas unidades moleculares que se unen entre sí ya sea mediante enlaces covalentes, formando una estructura polimérica, o bien mediante distintas fuerzas intermoleculares, constituyendo agregados supramoleculares.

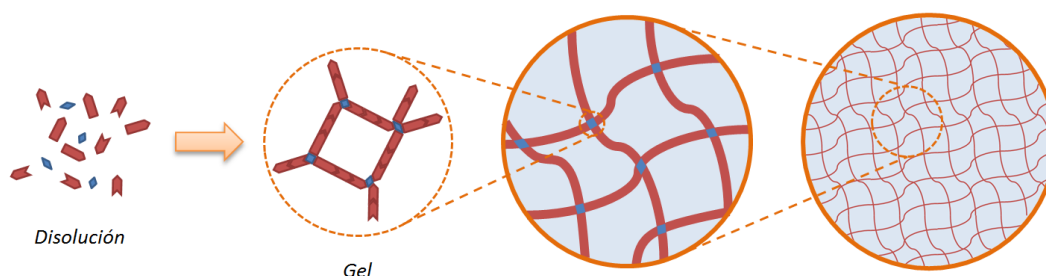
Los geles en general se consideran un estado de la materia en sí mismos, pues presentan propiedades físicas y mecánicas comunes tanto a sólidos como a líquidos. Los hidrogeles presentan una densidad similar al agua, ya que en algunos casos pueden llegar a contener más de un 99.9% de agua. Sin embargo su estructura se asemeja más a la de un sólido. De hecho, un gel se considera como tal cuando no fluye por acción de la gravedad, por ejemplo cuando se invierte el recipiente que lo contiene (Figura 5.1). Sin embargo tienen un grado de flexibilidad mucho mayor que un cuerpo sólido convencional, debido a su elevado contenido de agua, lo que hace que presenten unas características muy similares a las de tejidos orgánicos naturales.



**Figura 5.1.** Representación de la composición fibrilar de un gel, y de su capacidad de retención de agua.

### 5.1.2. Hidrogeles poliméricos

Inicialmente se estudiaron las propiedades de los hidrogeles poliméricos, mayoritariamente de origen natural, sobre los que se encuentran un gran número de publicaciones en la bibliografía. A lo largo de los años, los investigadores los han definido de muchas maneras.<sup>138</sup> La forma más común de entenderlos es como una red polimérica formada a partir de la reacción simple entre uno o más monómeros para formar puntos de entrecruzamiento (Figura 5.2). La estructura resultante es capaz de retener una gran cantidad de agua en el interior, pero sin llegar a disolverse, constituyendo así un hidrogel. Esta habilidad para la absorción de agua es debida a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos en las cadenas laterales del polímero. Por otra parte, la resistencia que presentan estos sistemas a disolverse deriva de la reticulación entre las cadenas poliméricas.



**Figura 5.2.** Representación de la composición de un gel polimérico a partir de fibras entrelazada mediante puntos de entrecruzamiento.

Durante las últimas dos décadas, los hidrogeles naturales se han complementado con la aparición de un número creciente de hidrogeles sintéticos. Estos últimos suelen presentar un tiempo de vida funcional más largo, así como una mayor capacidad de absorción de agua y una mayor fortaleza mecánica.

Dependiendo de las propiedades del polímero utilizado, y de la naturaleza y densidad de los puntos de entrecruzamiento, los hidrogeles resultantes pueden contener cantidades variables de agua. Para aumentar la capacidad de absorción es común el uso de polímeros sintéticos que antes de tener lugar el proceso de reticulación sean solubles en agua.

<sup>138</sup> (a) E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.* **2015**, 6, 105; (b) F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H. M. Akil, *Mater. Sci. Eng. C.* **2015**, 57, 414.

### 5.1.3. Hidrogeles supramoleculares

Los hidrogeles supramoleculares<sup>139</sup> se basan en la agregación de moléculas de bajo peso molecular o "Low Molecular Weight Hydrogelators" (LMWHs), y son materiales con un gran interés científico por su potencial uso en biomedicina,<sup>140</sup> catálisis<sup>141</sup> y química de materiales.<sup>142</sup>

En general, para preparar un hidrogel supramolecular se disuelve una pequeña cantidad del hidrogelante en agua caliente. Una vez enfriada la mezcla por debajo de la denominada temperatura de gelificación, el volumen completo de agua queda inmobilizado, de forma que no se aprecia flujo. En este caso nuevamente el fenómeno de gelificación<sup>143</sup> se debe a la formación de fibras nano o micrométricas que se entrelazan formando entramados capaces de interaccionar con el agua de manera que esta queda atrapada en su interior debido a la tensión superficial. En los hidrogeles supramoleculares no existen puntos de entrecruzamiento covalentes, de forma que los entramados se constituyen por solapamiento de fibras.

El mecanismo de formación de un hidrogel supramolecular se inicia a nivel molecular con la agregación de la molécula hidrogelante. Es necesario resaltar la necesidad de un diseño molecular adecuado que proporcione capacidad de autoagregación en un medio acuoso, que competirá con la solvatación del hidrogelante en el medio. Además es necesario que las moléculas utilizadas como hidrogelantes puedan mantenerse en disolución o dispersión estable. Los puentes de hidrógeno, por ejemplo, son muy útiles para conseguir agregación en disolventes orgánicos, pero pierden efectividad en agua, a no ser que se combinen varios de forma cooperativa y se protejan del disolvente. En cambio, el control de las fuerzas hidrofóbicas resulta clave para conseguir la agregación adecuada en agua.<sup>144</sup> Otras fuerzas que pueden tener mucho peso son los puentes salinos y la coordinación mediante metales de transición.<sup>145</sup>

<sup>139</sup> (a) B. Escuder, J. F. Miravet. *Functional Molecular Gels*, RSC Monograph, **2013**, SBN: 978-1-84973-665-7; (b) M. D. Segarra-Maset, V. J. Nebot, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7086-7098; (c) R. Dong, Y. Pang, Y. Su, X. Zhu, *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 937-954; (d) M. J. Webber, E. A. Appel, E. W. Meijer, R. Langer, *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 13-26; (e) D. Yuan, B. Xu, *J. Mater. Chem. B.* **2016**, *4*, 5638-5649.

<sup>140</sup> Como ejemplos recientes, ver: (a) E. V. Alakpa, V. Jayawarna, A. Lampel, K. V. Burgess, C. C. West, S. C. Bakker, S. Roy, N. Javid, S. Fleming, D. A. Lamprou, *Chem.* **2016**, *1*, 298-319; (b) M. J. Webber, E. A. Appel, E. W. Meijer, R. Langer, *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 13-26; (c) H. Shigemitsu, T. Fujisaku, S. Onogi, T. Yoshii, M. Ikeda, I. Hamachi, *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1744-1756.

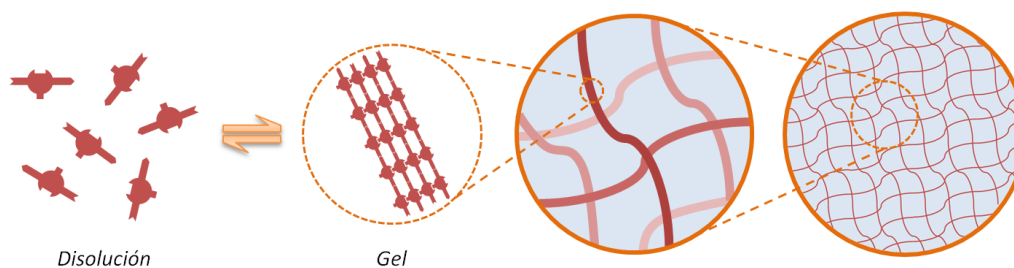
<sup>141</sup> N. Singh, K. Zhang, C. A. Angulo-Pachón, E. Mendes, J. H. van Esch, B. Escuder, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5568-5572.

<sup>142</sup> M. D. Konieczynska, J. C. Villa-Camacho, C. Ghobril, M. Perez-Viloria, K. M. Tevis, W. A. Blessing, A. Nazarian, E. K. Rodriguez, M. W. Grinstaff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9984-9987.

<sup>143</sup> L. A. Estroff, A. D. Hamilton. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201.

<sup>144</sup> S. S. Babu, V. K. Praveen, A. Ajayaghosh, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1973-2129.

<sup>145</sup> B. Xing, M. F. Choi, B. Xu. *Chem. Commun.* **2002**, 362.



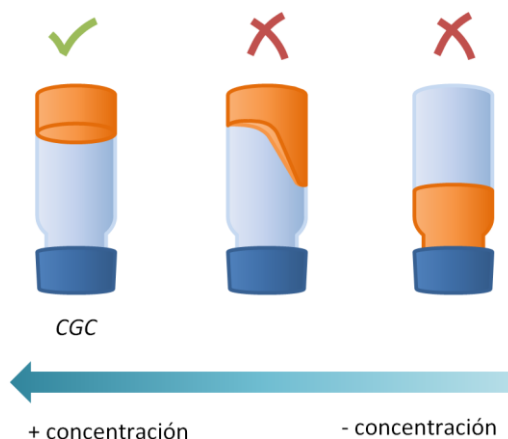
**Figura 5.3.** Representación de la formación reversible de un hidrogel supramolecular a partir de la superposición de fibras constituidas por moléculas individuales agregadas.

Es importante tener en cuenta que en muchos casos, los hidrogelantes necesitan disolverse previamente en un disolvente orgánico, ya que directamente en agua resultan insolubles. La adición posterior de agua desestabiliza la mezcla, impidiendo que el producto se mantenga en disolución, pero que sin llegar a precipitar, quedándose en el estadio coloidal intermedio de hidrogel.

En definitiva, si se comparan los hidrogeles poliméricos con los supramoleculares, a pesar de poseer ambos muchas características similares, la no covalencia que rige en estos últimos implica unas propiedades diferentes. Al fin y al cabo, las fibras se solapan y se entrecruzan mediante interacciones no covalentes, de la misma manera que los agregados que forman las fibras y que las moléculas individuales que se ensamblan formando los agregados. Una de las consecuencias directas de ello es la reversibilidad térmica que tienen la mayoría de hidrogeles supramoleculares. A una temperatura concreta, la energía térmica rompe uniones no covalentes que deshacen parcialmente la red fibrilar provocando que el sistema pase de estado gel a líquido. Este fenómeno se le conoce como equilibrio gel-sol.

### **5.1.3.1 Caracterización de hidrogeles supramoleculares**

**Análisis visual.** La primera prueba que indica que una disolución o suspensión ha gelificado es el aumento significativo en la viscosidad, de manera que al inclinar el vial en el que se encuentra el gel, éste apenas fluye. Así, a una muestra se la considerará un gel cuando no se observe flujo por acción de la gravedad al invertir totalmente el vial. A esta sencilla prueba se le llama el test de inversión. La mínima concentración de hidrogelante suficiente para superar el test se le denomina concentración de gelificación crítica (CGC) (Figura 5.4).

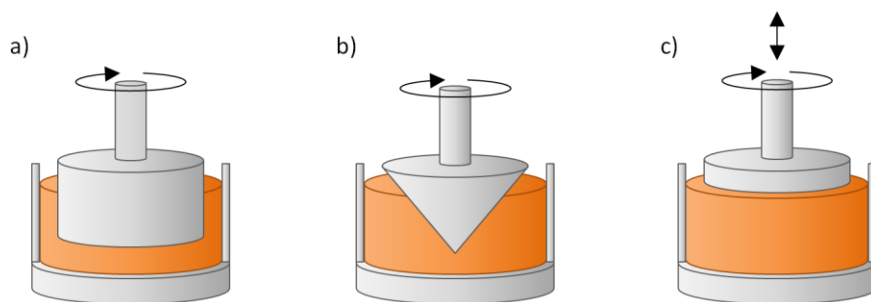


**Figura 5.4.** Representación del uso del test de inversión para la determinación de la concentración de gelificación crítica (CGC).

**Microscopía.** Para la caracterización de un hidrogel es fundamental el estudio de la morfología de las estructuras nano- o micrométricas que lo componen. Para ello las técnicas de microscopía son muy útiles. La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es la técnica que aporta mayor resolución, permitiendo discernir detalles estructurales como por ejemplo la dirección de rotación de una fibra helicoidal. Otras técnicas comúnmente utilizadas son la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la de barrido (SEM), que aportan información complementaria a la obtenida por AFM. Sin embargo, estas técnicas operan al vacío, por lo que la información que aportan no corresponde al hidrogel pues se extrae de una muestra deshidratada. En el caso de SEM, las muestras habitualmente deben liofilizarse, congelándose de forma brusca para intentar mantener en la medida de lo posible la estructura de la muestra inalterada. Una vez deshidratado, el sólido resultante se le conoce como xerogel. En TEM, en muchos casos es necesaria la adición de un agente de tinción para poder analizar las estructuras con un contraste adecuado, lo cual también puede alterar la morfología inicial.

**Reología.** Los análisis reológicos son los que aportan los valores de los parámetros físico-mecánicos que se traducen en el comportamiento viscoelástico que se observa en el análisis visual. La técnica se basa en la aplicación de un estrés mecánico oscilante al hidrogel para medir su respuesta y cuantificar sus propiedades elásticas, como son el módulo elástico  $G'$  (*storage modulus*) y el módulo de viscosidad  $G''$  (*loss modulus*). Para ello, según el instrumento se utilizan distintos sistemas para aplicar el estrés, tales como cilindros concéntricos, sistemas de cono y plato, y platos paralelos (Figura 5.5). De esta manera se estudia la variación de las variables mencionadas con la frecuencia de la oscilación, la magnitud del estrés aplicado o el tiempo.





**Figura 5.5.** Sistemas para la aplicación de estrés en reología: (a) cilindros concéntricos, (b) sistemas de cono y plato, y (c) platos paralelos.

En el caso de geles, se espera que el módulo  $G'$  sea en torno a un orden de magnitud superior al  $G''$ , indicando así sus propiedades viscoelásticas. Por otra parte, cuanto mayor sean los dos módulos en conjunto, menos blando se considera el gel. Además, los geles presentan una región viscoelástica lineal, es decir, un rango de frecuencias de oscilación y un rango de porcentaje de estrés aplicado en el que los módulos  $G'$  y  $G''$  presentan una respuesta lineal.

**Calorimetría.** La temperatura de gelificación es la temperatura a la cual las fuerzas no covalentes que mantienen estable la estructura del hidrogel estable se rompen. A nivel macroscópico se produce la fluidificación del mismo, lo que implica la no superación del test de inversión. Esta temperatura se determina de forma más precisa mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta técnica permite el estudio del equilibrio gel-sol, a la vez que permite la detección de procesos intermedios.

**Difracción de rayos X.** Las técnicas de difracción de rayos X, como pueden ser SAXS (small-angle X-ray scattering) y XRD (X-ray powder diffraction), siempre y cuando la muestra lo permita, aportan información muy valiosa acerca de la ordenación de las moléculas dentro del hidrogel, permitiendo determinar las interacciones entre ellas y la geometría de los agregados formados. De esta manera en algunos casos es posible estimar la forma de propagación de las estructuras observadas para formar las fibras que componen el hidrogel.

### **5.1.3.2. Tipos de hidrogeles supramoleculares**

En general se admite que una molécula orgánica apta para formar hidrogeles debe ser anfifílica, es decir, presentar una parte hidrofóbica y una hidrofílica. De esta manera, a partir de las interacciones entre las distintas unidades se formarán agregados estables en el medio acuoso, que podrán propagarse tridimensionalmente, permitiendo la retención de agua dentro de la estructura formada. Además, es habitual la alternancia de estructuras flexibles alquílicas con estructuras que aporten cierta rigidez.



Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de moléculas hidrogelantes.<sup>146</sup> A la hora de clasificar estas moléculas surgen distintos criterios. Así, por ejemplo se han descrito hidrogeles que combinan diferentes tipos de fragmentos hidrofóbicos e hidrofílicos de muchas formas para componer una molécula anfifílica con capacidad de formar hidrogeles. Sin embargo, hay una serie de grupos químicos que se utilizan de forma recurrente para cada una de las dos finalidades.

En lo que se refiere a estructuras destinadas a aportar hidrofobicidad al sistema, generalmente se utilizan tres tipos:

- Cadenas alquílicas: cadenas hidrocarbonadas de longitud variable, generalmente colocadas en un extremo de la molécula. Otra posibilidad es que se utilicen como parte central flexible de la molécula, sirviendo de unión hidrofóbica entre centros más polares y generalmente con mayor rigidez. Este último tipo de estructuras se denominan bolaamifilos, y se explicarán con más detalle más adelante.
- Grupos aromáticos sustituidos: aportan hidrofobicidad y rigidez a la molécula. Además, permiten la formación de interacciones de stacking o ión- $\pi$  que pueden llegar a tener mucho peso en la formación de agregados.
- Centros poliaromáticos: hidrocarburos policíclicos aromáticos que aportan todas las propiedades de los fenilos y polifenilos de forma mucho más significativa, siendo en muchos casos además fluorescentes. Habitualmente se sitúan en la parte central de la molécula hidrogelante.
- Estructuras alifáticas rígidas: estructuras derivadas del esterano que aportan hidrofobicidad y rigidez, a la vez que permiten muchas posibilidades de sustitución.

Tanto las cadenas alquílicas como los derivados fenílicos son las estructuras más utilizadas como centros hidrofóbicos. En cuanto a los fragmentos hidrofílicos de los hidrogelantes, el abanico de estructuras utilizadas es mucho más amplio. Sin embargo, es habitual el uso de grupos donadores de enlace de hidrógeno o grupos ionizables. Los grupos más habituales son los siguientes:

- Amidas: muy útiles como grupos de unión con capacidad de formación de enlaces de hidrógeno. De aquí deriva toda una familia de hidrogeles basada en el uso de aminoácidos y derivados peptídicos, de la cual se encuentran muchísimos ejemplos en la bibliografía.
- Ureas: capaces de interaccionar unas con otras formando agregados de tipo cabeza cola.
- Polialcoholes: aportan una gran solubilidad en agua. El ejemplo más típico es el uso de derivados de sacáridos, componiendo así otra gran familia de hidrogeles.

---

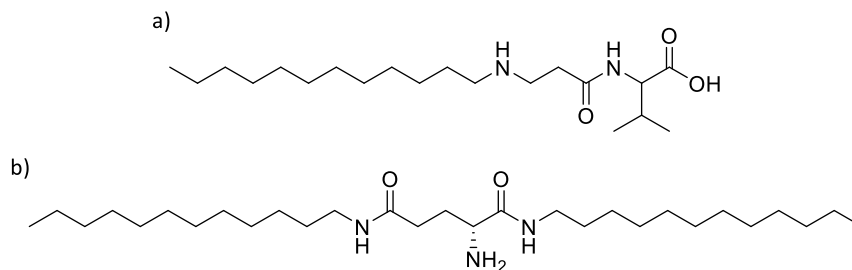
<sup>146</sup> X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 13165–13307.

A continuación se expone de forma más detallada cada uno de los tipos de hidrogeles enumerados en función de la estructura que presentan y de los grupos utilizados.

### **Hidrogeles basados en aminoácidos y péptidos.**

Este tipo de hidrogeles resultan de gran interés, debido a que su esqueleto está formado por estructuras biocompatibles. Además, su preparación se basa principalmente en los métodos de síntesis peptídica, métodos que son perfectamente conocidos. De esta manera se puede preparar un hidrogelante a partir de "piezas" individuales (aminoácidos o derivados) que aportan complejidad y versatilidad al sistema. El resultado es una molécula capaz de interactuar con agua y de autoagregarse mediante varios tipos de interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, de stacking o interacciones hidrofóbicas.<sup>147</sup>

Los hidrogeles basados en aminoácidos requieren un fragmento hidrofóbico, conformando así un anfífilo convencional, donde el propio aminoácido sirve de cabeza polar. Como cola hidrofóbica es común el uso de cadenas alquílicas, como en el caso del N-(n-dodecil-2-aminoetanol)-L-valinato sódico (Figura 5.6a),<sup>148</sup> un súper hidrogel<sup>149</sup> con una concentración de gelificación crítica (CGC) de 0.05 % en peso. Otra posibilidad es situar cadenas alquílicas en los extremos de la molécula, dejando el aminoácido en el centro como núcleo hidrofílico (Figura 5.6b).<sup>150</sup>



**Figura 5.6.** Ejemplos de hidrogeles basados en aminoácidos.

El uso de grupos aromáticos como fragmento hidrofóbico aporta interacciones de stacking más energéticas que las fuerzas de Van der Waals presentes entre cadenas alquílicas. Uno de los grupos más frecuentes es el [(fluorenilmetil)-oxi]carbonilo o Fmoc, ampliamente

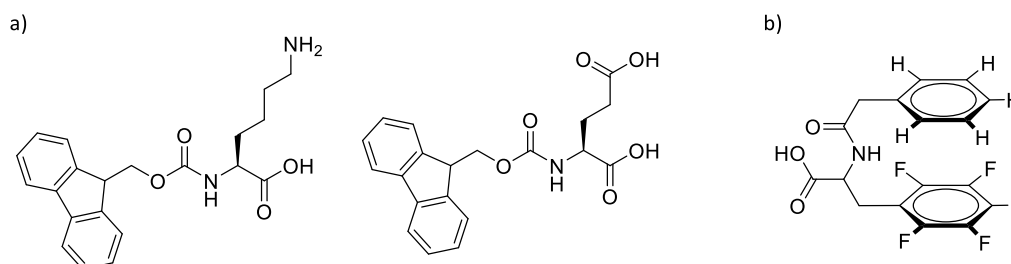
<sup>147</sup> I. W. Fu, C. B. Markegard, H. D. Nguyen, *Langmuir* **2015**, *31*, 315–324.

<sup>148</sup> D. Khatua, R. Maiti, J. Dey, *Chem. Commun; (Camb)*. **2006**, 4903–4905.

<sup>149</sup> Súper hidrogel: hidrogel cuya concentración de gelificación crítica (CGC) es inferior a 0.1 % en peso.

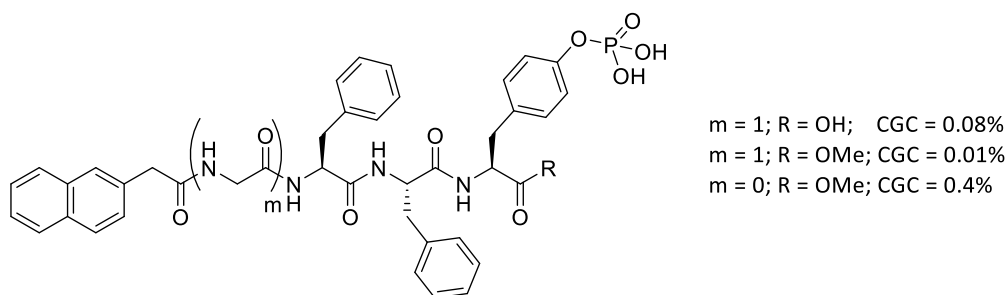
<sup>150</sup> Y. Kira, Y. Okazaki, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara, *Amino Acids*. **2010**, *39*, 587–597.

utilizado como grupo protector en síntesis de péptidos en estado sólido. Su uso cada vez más extendido se debe a la disponibilidad comercial de los aminoácidos protegidos con Fmoc y a su relativa facilidad de preparación. Un ejemplo de ello es el hidrogel formado por un equivalente de cada uno de los dos productos de la Figura 5.7a,<sup>151</sup> que constituyen un par iónico en disolución al presentar cadenas laterales cargadas de forma contraria. Otra forma recurrente de introducir grupos aromáticos es incluir residuos de fenilalanina (Figura 5.7b).<sup>152</sup>



**Figura 5.7.** Ejemplos de hidrogeles formados a partir de aminoácidos, donde la parte hidrofóbica la aportan (a) un grupo Fmoc o (b) residuos de fenilalanina.

Además de aminoácidos, existen oligopéptidos de mayor tamaño que también permiten la formación de hidrogeles. Así, tanto dipéptidos como Ile-Phe<sup>153</sup> como oligopéptidos como la insulina (25 residuos)<sup>154</sup> tienen capacidad para formar hidrogeles. Además, es común la inclusión de aminoácidos modificados o de cadenas alquílicas y grupos aromáticos o poli aromáticos en las secuencias peptídicas (Figura 5.8),<sup>155</sup> lo cual todavía amplía más la capacidad de modulación de las propiedades de los hidrogeles resultantes.



**Figura 5.8.** Ejemplo de hidrogel formado a partir de un oligopéptido.

<sup>151</sup> B. Adhikari, J. Nanda, A. Banerjee, *Soft Matter*. **2011**, *7*, 8913.

<sup>152</sup> S. M. Hsu, Y. C. Lin, J. W. Chang, Y. H. Liu, H. C. Lin, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 1921–1927.

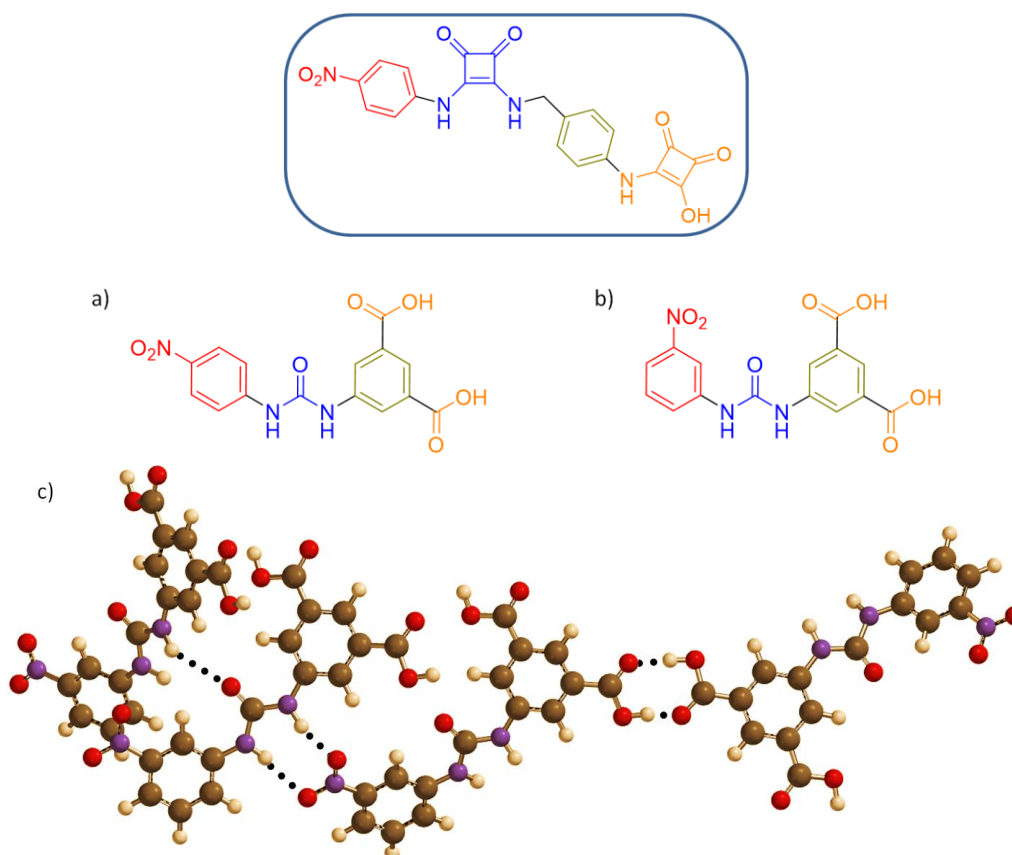
<sup>153</sup> N. S. de Groot, T. Parella, F. X. Aviles, J. Vendrell, S. Ventura. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1732–1741.

<sup>154</sup> K. G Hutchison. *J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 528–531.

<sup>155</sup> H. Wang, C. Yang, M. Tan, L. Wang, D. Kong, Z. Yang, *Soft Matter*. **2011**, *7*, 3897.



covalentes a priori podrían tener lugar entre moléculas del derivado escuaramido-escuarámico, puesto que presentan los mismos grupos clave o análogos.



**Figura 5.10.** a) Hidrogel derivado de urea similar estructuralmente al receptor de miltefosina explicado en el Capítulo 4 (arriba). b) Isómero posicional del hidrogelante (a) y el (c) patrón los enlaces de hidrógeno que presenta en estado sólido.

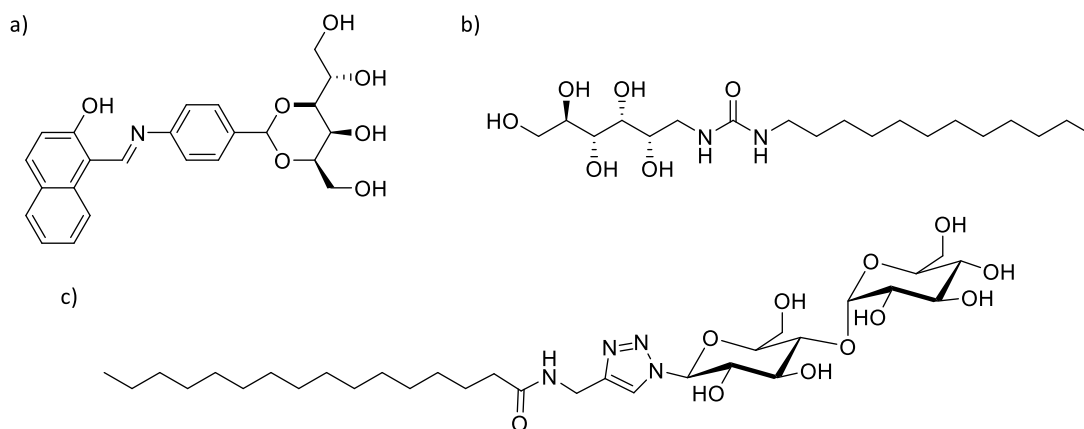
### ***Hidrogel basados en polialcoholes y sacáridos***

Las cadenas polihidroxiladas resultan muy útiles como cabezas polares de moléculas anfifílicas formadoras de hidrogeles. Ello es debido a la elevada solubilidad en agua que aportan y a la capacidad de formación de puentes de hidrógeno para así autoensamblarse formando agregados. El sorbitol es una de las moléculas más utilizadas como polialcohol, como en el caso del ejemplo de la Figura 5.11a.<sup>162</sup>

Los sacáridos engloban la mayoría de polialcoholes naturales, y son comúnmente utilizados para la preparación de hidrogeles. Así, podemos encontrar hidrogelantes

<sup>162</sup> K. Fan, J. Song, J. Li, X. Guan, N. Tao, C. Tong, H. Shen, L. Niu, *J. Mater. Chem. C.* **2013**, *1*, 7479.

sintetizados a partir de monosacáridos (Figura 5.11b)<sup>163</sup> o de oligosacáridos. En el ejemplo de la Figura 5.11c, el disacárido sirve de cabeza polar mientras que la parte hidrofóbica es de nuevo una cadena alquílica. La unión entre las dos partes se ha llevado a cabo en este caso mediante *click chemistry*, dando lugar a un anillo de triazol seguido de una amida.<sup>164</sup>



**Figura 5.11.** Hidrogeles polialcohólicos derivados de (a) sorbitol, (b) monosacáridos y (c) disacáridos.

### Clasificación estructural de hidrogeles

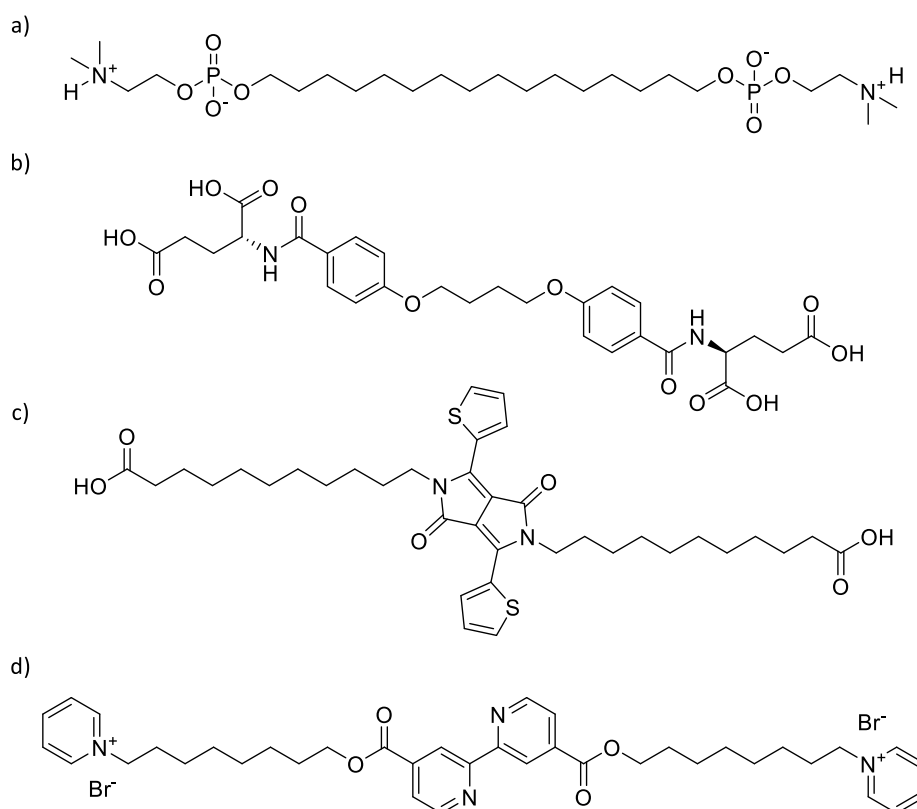
En función del diseño de la molécula hidrogelante y de la disposición que presenten los distintos grupos polares y apolares podemos encontrar cuatro grandes familias de hidrogeles. Hasta ahora, la mayoría de los ejemplos presentados se basan en una estructura convencional de **anfífilo**, que dentro de los distintos tipos estructurales de hidrogeles es el más abundante. En éste, un extremo de la molécula es polar e hidrofílica, y el otro extremo es apolar y por tanto hidrofóbico. En el caso de las moléculas más pequeñas, en ocasiones el esquema estructural no presenta una separación entre los distintos fragmentos tan clara, sino que se van alternando los grupos polares con anillos aromáticos.

El segundo tipo estructural lo componen los hidrogelantes que presentan la **parte hidrofílica en el centro** de la molécula, situando en los extremos las cadenas hidrofóbicas, generalmente alquílicas. De esa forma, en la mayoría de casos se trata de moléculas simétricas. Un ejemplo de ello es el compuesto de la Figura 5.6b.

<sup>163</sup> M. Avalos, R. Babiano, P. Cintas, A. Gomez-Carretero, J. L. Jimenez, M. Lozano, A. L. Ortiz, J. C. Palacios, A. A. Pinazo, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 5656 - 5669.

<sup>164</sup> (a) M. J. Clemente, J. Fitremann, M. Mauzac, J. L. Serrano, L. Oriol. *Langmuir*, **2011**, *27*, 15236–15247; (b) M. J. Clemente, P. Romero, J. L. Serrano, J. Fitremann, L. Oriol. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 3847–3858.

El tercer tipo, y siguiendo un esquema parecido al anterior, lo compone toda una familia de hidrogeles formados a partir de **bolaanfífilos**. Un bolaanfílico se compone de dos grupos polares, generalmente iguales, unidos entre sí mediante una cadena hidrocarbonada de longitud variable (Figura 5.12). Así, la solubilidad en agua se ve incrementada con la adición de una segunda cabeza polar en comparación con los anfífilos convencionales. Los grupos polares pueden ser cualquiera de los mostrados hasta ahora, desde grupos cargados (Figura 5.12a)<sup>165</sup> hasta aminoácidos (Figura 5.12b).<sup>166</sup> También es habitual colocar anillos aromáticos en el centro de la molécula, lo cual permite la existencia de interacciones de stacking aromático, además de aportar cierta rigidez a la molécula (Figura 5.12c,d).<sup>167,168</sup>



**Figura 5.12.** Hidrogeles bolaanfífilos con extremos polares cargados (a, c) o peptídicos (b), y con núcleos aromáticos (c, d)

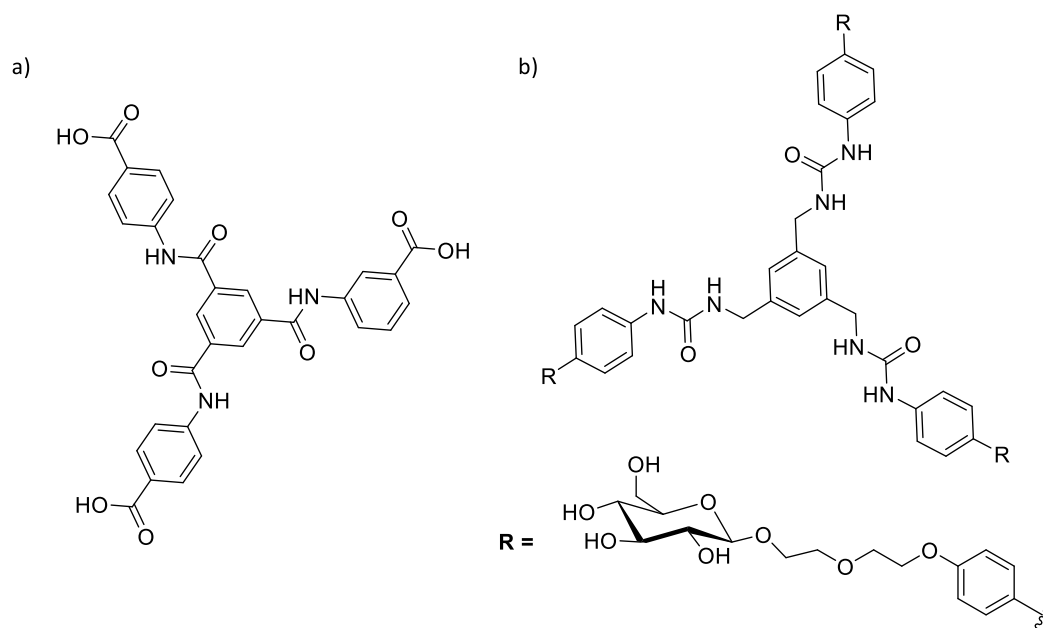
<sup>165</sup> K. Kohler, A. Meister, G. Forster, B. Dobner, S. Drescher, F. Ziethe, W. Richter, F. Steiniger, M. Drechsler, G. Hause, A. Blume. *Soft Matter*, **2006**, *2*, 77–86.

<sup>166</sup> T. Y. Wang, J. A. Jiang, Y. Liu, Z. B. Li, M. Liu. *Langmuir*, **2010**, *26*, 18694–18700.

<sup>167</sup> B. Song, H. Wei, Z. Q. Wang, X. Zhang, M. Smet, W. Dehaen. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 416–420.

<sup>168</sup> G. L. Wu, P. Verwilst, J. Xu, H. P. Xu, R. J. Wang, M. Smet, W. Dehaen, C. F. J. Faul, Z. Q. Wang, X. Zhang. *Langmuir*, **2012**, *28*, 5023–5030.

El cuarto tipo estructural lo constituye un grupo amplio de hidrogelantes de bajo peso molecular que presenta simetría  $C_3$ . Ésta se logra situando en el centro de la molécula generalmente un anillo de benceno 1,3,5-trisustituido por cadenas idénticas. En este caso, las partes hidrofóbicas e hidrofílicas se encuentran repartidas a lo largo de cada una de las cadenas. Mientras que los grupos hidrofóbicos suelen ser anillos aromáticos, los grupos polares pueden ser cualquiera de los grupos mostrados hasta ahora, tales como ureas, monosacáridos (Figura 5.13a),<sup>169</sup> o amidas y ácidos carboxílicos (Figura 5.13b).<sup>170</sup>



**Figura 5.13.** Hidrogeles con simetría  $C_3$  a partir de un núcleo de benceno 1,3,5-trisustituido.

#### 5.1.4. Aplicaciones de los hidrogeles supramoleculares

El conjunto de propiedades de un hidrogel, principalmente su elevada capacidad de retención de agua, dirige su utilización hacia el área de materiales, especialmente enfocados a aplicaciones biológicas y/o biomédicas.

Los hidrogeles supramoleculares en particular, al estar formados por agregados de moléculas pequeñas, resultan todavía más idóneos para este tipo de aplicaciones. Así, los esfuerzos se han centrado en el diseño de moléculas biocompatibles, capaces de formar hidrogeles biodegradables. Por ese motivo el campo de los hidrogeles derivados de aminoácidos y péptidos es actualmente el más extendido.

<sup>169</sup> K. Munenobu, T. Hase, T. Oyoshi, M. Yamanaka. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9924–9929.

<sup>170</sup> V. Nagarajan, V. R. Pediredi. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 1895–1901.



Los hidrogeles, al ser materiales blandos y constituidos principalmente por agua, se asemejan mucho al entorno celular, de ahí a que muchos trabajos se centren en la preparación de hidrogeles que puedan mimetizar la matriz extracelular y que permitan el cultivo de células en su interior.<sup>171</sup> De la misma manera también se trabaja con hidrogeles con citotoxicidades selectivas,<sup>172</sup> permitiendo por ejemplo la inhibición del crecimiento de células tumorales frente a otras líneas celulares.<sup>173</sup>

Los denominados hidrogeles supramoleculares inteligentes son capaces de responder a todo un abanico de estímulos químicos, físicos o biológicos, como por ejemplo la temperatura, el pH, la fuerza iónica, un campo eléctrico, determinados enzimas, etc. Ello hace que sean muy útiles como sensores químicos y biológicos. Por ejemplo, la detección de la formación de un hidrogel debido a la asistencia de ciertos enzimas se ha utilizado como indicador de la presencia de dichos enzimas.<sup>174</sup> Una característica muy utilizada de los hidrogeles supramoleculares es su capacidad para retener dentro de su estructura moléculas tales como indicadores o colorantes.<sup>175</sup> De esta manera, por acción de un estímulo químico, el hidrogel puede cambiar de color, o liberar el colorante retenido, o absorberlo de la disolución. Cualquiera de estos fenómenos sirve como indicador de la presencia del estímulo químico concreto.<sup>176</sup>

La capacidad de los hidrogeles para retener moléculas en su interior es comprensible si se tiene en cuenta que éstas pueden mantenerse disueltas en el agua retenida por el entramado de fibras que compone el hidrogel. Dependiendo del hidrogel, ante el estímulo adecuado, las moléculas retenidas son liberadas al medio. Por eso, una de las aplicaciones más importantes y estudiadas de los hidrogeles se orienta hacia el transporte y liberación selectiva de fármacos.<sup>177</sup>

---

<sup>171</sup> (a) X. Du, J. Zhou, L. Wu, S. Sun, B. Xu. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 2129–2133; (b) Q. Miao, Z. Wu, Z. Hai, C. Tao, Q. Yuan, Y. Gong, Y. Guan, J. Jiang, G. Liang. *Nanoscale*, **2015**, *7*, 2797–2804; (c) X. Du, J. Zhou, B. Xu. *Colloid Interface Sci.* **2015**, *447*, 273–277.

<sup>172</sup> (a) M. R. Reithofer, K. –H. Chan, A. Lakshmanan, D. H. Lam, A. Mishra, B. Gopalan, M. Joshi, S. Wang, C. A. E. Hauser. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 625–630. (b) M. R. Reithofer, A. Lakshmanan, A. T. K. Ping, J. M. Chin, C. A. E. Hauser. *Biomaterials*, **2014**, *35*, 7535–7542.

<sup>173</sup> Y. Kuang, Y. Gao, B. Xu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12625–12627.

<sup>174</sup> (a) B. G. Healey, D. R. Walt. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4471–4476; (b) A. Belay, A. Collins, T. Ruzgas, P. T. Kissinger, L. Gorton, E. Csoregi. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 93–105.

<sup>175</sup> C. Y. Cao, Y. Chen, F. Z. Wu, Y. Deng, G. L. Liang. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10320–10322.

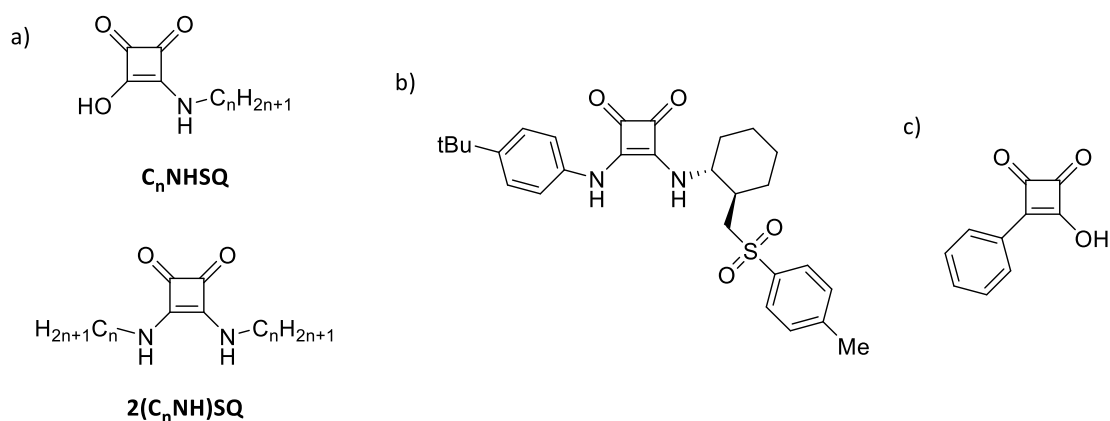
<sup>176</sup> (a) L. Qin, F. Xie, P. Duan, M. Liu, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 15419–15425; (b) L. Qin, P. Duan, F. Xie, L. Zhang, M. Liu, *Chem. Commun. (Camb)*. **2013**, *49*, 10823–5; (c) S. Song, L. Feng, A. Song, J. Hao, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12850–12856; (d) A. Reddy, A. Sharma, A. Srivastava, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 7575–7581.

<sup>177</sup> (a) J. Bachl, J. Mayr, F. J. Sayago, C. Cativiela, D. Díaz Díaz, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5294–5297. (b) R. Liang, Z. Luo, G. Pu, W. Wu, S. Shi, J. Yu, Z. Zhang, H. Chen, X. Li, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 76093–76098.

### 5.1.5. Antecedentes de la utilización de escuaramidas en geles

Tal y como se ha visto a lo largo de este trabajo, las escuaramidas disecundarias y los ácidos escuarámicos pueden establecer relaciones sinérgicas entre aromaticidad y formación de enlaces de hidrógeno que controlan los procesos de agregación<sup>43</sup> en estado sólido<sup>41,178</sup> y en disolución.<sup>42,179</sup>

Existen muy pocos precedentes de geles preparados a base de moléculas que contengan derivados de ácido escuárico. El grupo de Oshedo desarrolló una familia de ácidos escuarámicos y escuaramidas de cadena larga, capaces de formar organogeles en DMF (Figura 5.14a).<sup>180</sup> No obstante, los compuestos escuarámicos **C<sub>n</sub>NHSQ** presentaban una CGC de 15 % en peso, que es muy elevada, siendo además necesario enfriar la mezcla a -15 °C para que se formara el gel. Los compuestos escuaramídicos **2(C<sub>n</sub>NH)SQ** en cambio eran capaces de gelificar a temperatura ambiente a una concentración de 5 % en peso.



**Figura 5.14.** Geles basados en derivados de ácido escuárico. a) Familia de organogeles derivados de ácidos escuarámicos y diescuaramidas. b) Organogel escuaramídico similar al receptor de miltefosina explicado en el Capítulo 4. c) Hidrogel ácido fenilesquárico.

El segundo ejemplo de organogeles a partir de escuaramidas lo constituye el alcogel desarrollado por J. Schiller y col. (Figura 5.14b).<sup>181</sup> El producto utilizado presenta ciertas

<sup>178</sup> (a) A. Portell, M. Font-Bardia, R. Prohens, *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 4200-4203; (b) R. Prohens, A. Portell, M. Font-Bardia, A. Bauzá, A. Frontera, *Cryst. Growth. Des.* **2014**, *14*, 2578-2587, (c) C. Estarellas, M. C. Rotger, M. Capó, D. Quiñonero, A. Frontera, A. Costa, P. M. Deyà, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1987-1990

<sup>179</sup> J. Schiller, J. V. Alegre-Requena, E. Marqués-López, R. P. Herrera, J. Casanovas, C. Alemán, D. Díaz, *Soft. Matter.* **2016**, *12*, 4361-4374.

<sup>180</sup> Y. Oshedo, M. Miyamoto, A. Tanaka, H. Watanabe, *New J. Chem.* **2013**, *37*, 2874-2880.

<sup>181</sup> J. Schiller, J. V. Alegre-Requena, E. Marqués-López, R. P. Herrera, J. Casanovas, C. Alemán, D. Díaz, *Soft Matter* **2016**, 4361-4374.

similitudes con los compuestos que se utilizarán como hidrogelantes en este capítulo. En este caso se trata de una escuaramida sustituida por una parte por un anillo aromático y por otra parte por un grupo semirígido. Este compuesto es capaz de gelificar en presencia de una gran variedad de alcoholes, con CGCs del 0.3 al 1 % en peso.

El único ejemplo de hidrogel basado en derivados referibles al ácido escuárico, se encuentra en el ácido fenilescuárico (Figura 5.14c).<sup>182</sup> Éste, sin embargo, presenta una CGC del 20 % en peso, recristalizando tanto a concentraciones superiores al 50 % en peso como a concentraciones inferiores a la CGC. Por otra parte, las constantes reológicas  $G'$  y  $G''$  presentan valores muy similares, sin diferenciarse el orden de magnitud esperado en geles, indicando propiedades más típicas de un sólido. De hecho, la cristalización que tiene lugar fuera del rango de concentraciones de gelificación también parece tener lugar en el seno de la matriz del gel.

---

<sup>182</sup> Y. Ohseido, M. Miyamoto, M. Oono, K. Shikii, A. Tanaka, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 3844.



## 5.2. Objetivos

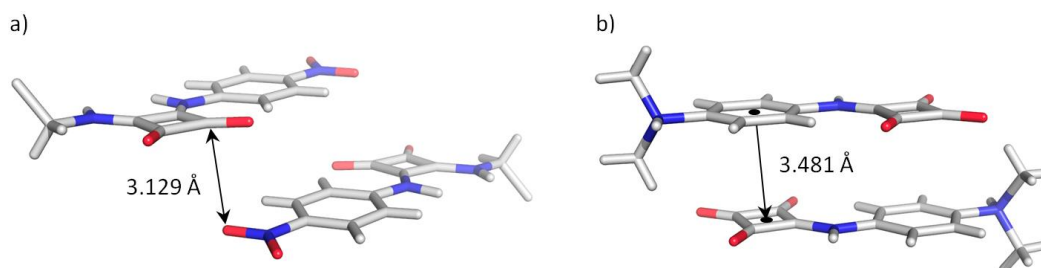
El objetivo principal de este capítulo es el estudio de la viabilidad del grupo escuaramato como parte hidrofílica de un hidrogelante. Dada la capacidad de autoagregación del receptor diseñado en el Capítulo 4, se estudiará su capacidad para dar lugar a hidrogeles. Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar hidrogelantes de base escuaramido-escuaramato, variando los sustituyentes de la parte aril-escuaramídica con el fin de modular las características del hidrogel resultante.
- Caracterizar los hidrogeles obtenidos, evaluándose su estabilidad química, térmica y mecánica.
- Estudiar la biocompatibilidad de los hidrogeles, con vistas a su utilización para aplicaciones biomédicas.
- Por último, dada la capacidad de interacción de estos hidrogelantes con moléculas zwitteriónicas estudiada en el Capítulo 4, se estudiará la posibilidad de cargar los hidrogeles con cantidades variables de moléculas zwitteriónicas de interés biomédico, y su posterior liberación al medio.



### 5.3. Diseño y síntesis de hidrogelantes de base escuaramido-escuaramato

Los ácidos escuarámicos N-sustituídos nunca se han utilizado para la construcción de hidrogeles. La elevada acidez que presentan, descrita en el Capítulo 2 de la Memoria, resulta crucial al utilizar los SQAs como parte hidrofílica de un hidrogelante, dado que asegura una ionización completa en un rango amplio de pH. Es importante recordar que los escuaramatos, al igual que las escuaramidas, presentan un carácter moderadamente aromático.<sup>41b</sup> Así, tanto las aril escuaramidas como los aril escuaramatos son planos y pueden formar dímeros antiparalelos por stacking en estado sólido (Figura 5.15).<sup>41b,74,183</sup> Con todo, la estabilidad hidrolítica<sup>132,184</sup> y la capacidad de agregación de escuaramidas y escuaramatos hacen que el planteamiento de su uso como parte de hidrogelantes de bajo peso molecular resulte atractiva.



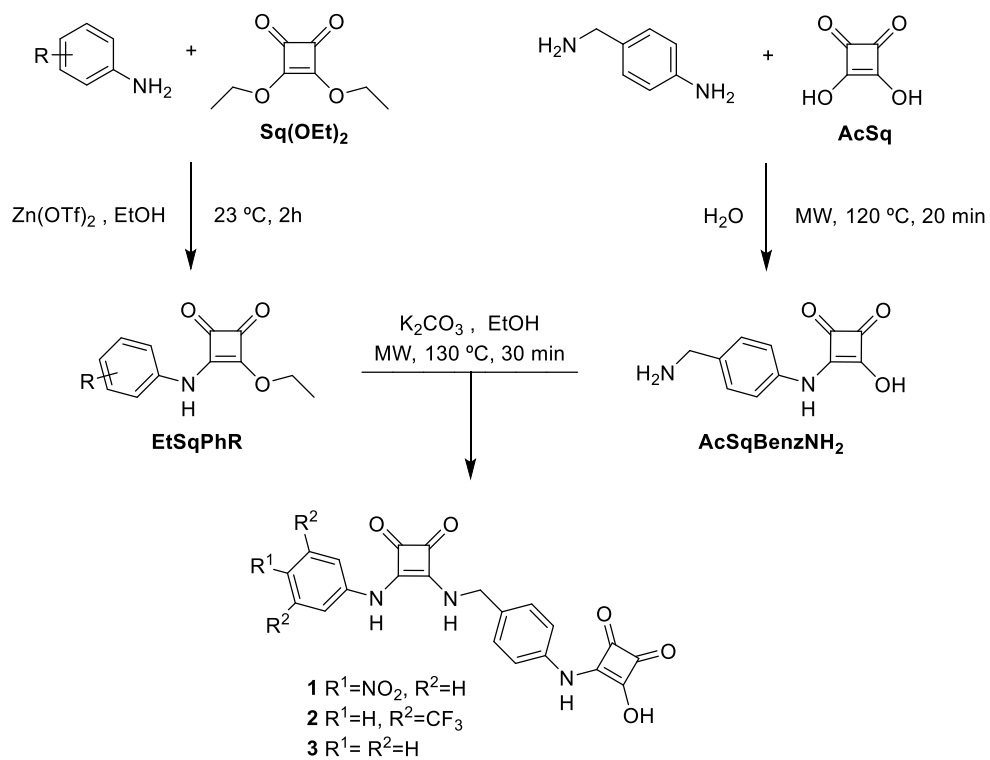
**Figura 5.15.** a) Estructura parcial de rayos X que ilustra la ordenación plana por stacking de la unidad *p*-nitrofenil escuaramida.<sup>183</sup> b) Estructura de rayos X del ácido *p*-dimetilamino fenilescuarámico.<sup>42</sup>

Teniendo en cuenta la capacidad de auto-agregación del receptor diseñado en el Capítulo 4, se ha utilizado como punto de partida para el diseño de hidrogelantes potenciales de base escuaramido-escuaramato. Así, se han preparado una serie de compuestos modificando los sustituyentes de la aril-escuaramida, con el fin de modular la intensidad de las interacciones por apilamiento de anillos aromáticos, a la vez que se altera la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno por parte de la escuaramida. La preparación de estos compuestos se basa en el procedimiento utilizado para la síntesis del receptor **4** del Capítulo 4, utilizando diferentes anilinas sustituidas con el propósito antes mencionado.

<sup>183</sup> M. Ximenis, E. Bustelo, A. G. Algarra, M. Vega, C. Rotger, M. G. Basallote, A. Costa, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 2160–2170.

<sup>184</sup> R. B. Elmes, P. Turner, K. A. Jolliffe, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5638–5641.

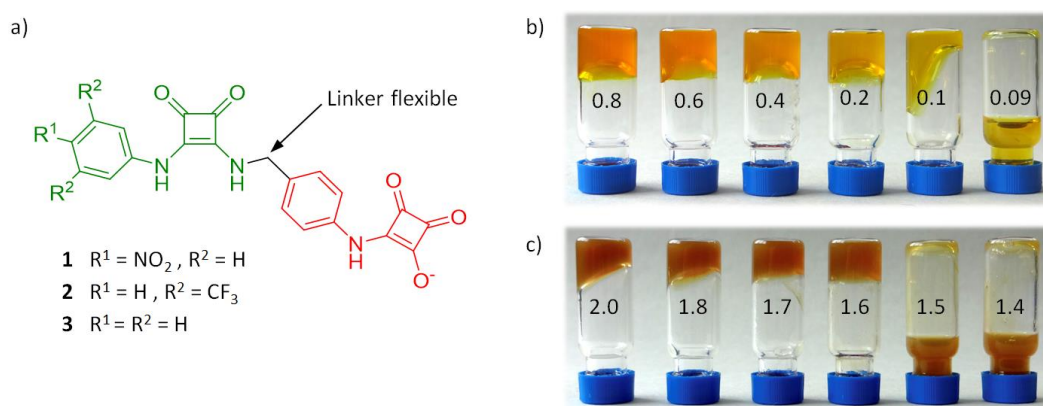
Esquema 5.1. Síntesis de los hidrogelantes.





## 5.4. Resultados y discusión

En este apartado se describe la caracterización inicial de los hidrogelantes de bajo peso molecular que contienen una unidad escuaramida y otra de escuaramato (Figura 5.16a), capaces de autoagregarse formando hidrogeles supramoleculares. La introducción de los sustituyentes  $-\text{NO}_2$  y  $-\text{CF}_3$  en la parte aril-escuaramídica (Esquema 5.1) pretende modular la agregación de los hidrogelantes, modificando así las propiedades macroscópicas de los hidrogeles resultantes.

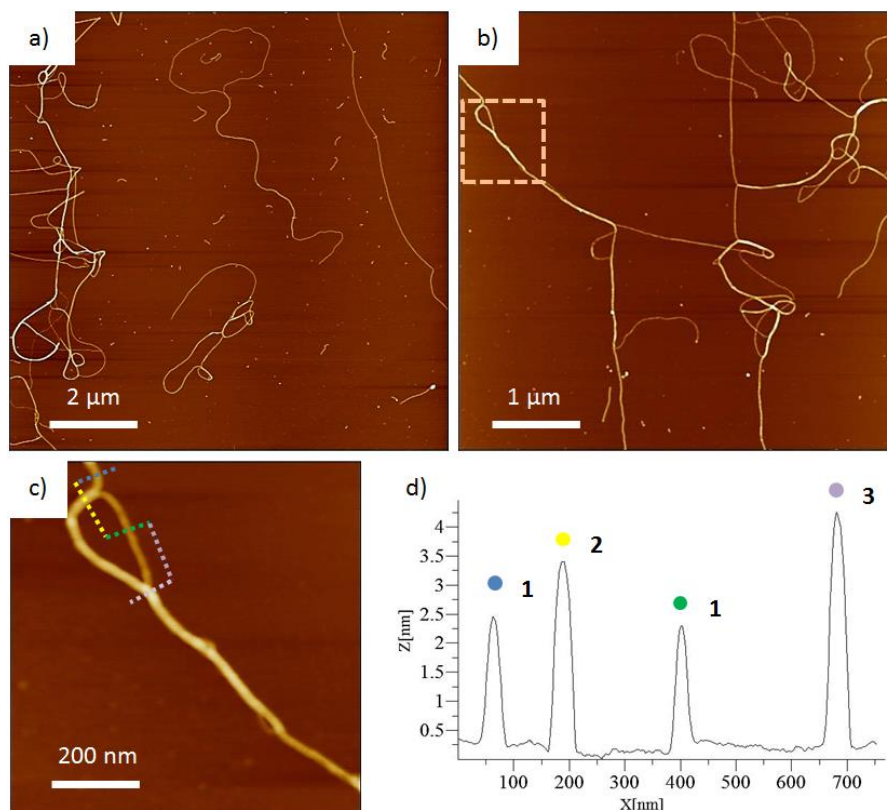


**Figura 5.16.** a) Estructura química de los hidrogelantes anifílicos **1-3** basados en unidades escuaramida y escuaramato. (c, d) Test de inversión de vial llevado a cabo con muestras enfriadas lentamente de (c) **1A** y (d) **2A**, después de una hora de calentamiento a  $70^\circ\text{C}$ . Los valores en los viales indican la concentración en % p/v de los hidrogelantes **1** y **2**, respectivamente.

Efectivamente, los hidrogelantes **1-3** sintetizados, a pesar de compartir el conjunto escuaramida-escuaramato, muestran propiedades de agregación sorprendentemente diferentes en agua. La adición de NaOH sobre la suspensión de **1** ( $\text{R}_1 = \text{NO}_2$ ;  $\text{R}_2 = \text{H}$ ) en agua da lugar a la auto-agregación y hidrogelificación del producto en cuestión de minutos en un rango de pH entre 3 y 9, con o sin aplicación de calor. El hidrogel resultante **1A** supera el test de inversión a una concentración relativamente baja (0.1-0.2 % p/v) (Figura 5.16b). De forma similar, la escuaramida **2** ( $\text{R}_1 = \text{H}$ ;  $\text{R}_2 = \text{CF}_3$ ) también gelifica, pero requiere la aplicación de calor para la obtención del hidrogel, siendo la concentración de gelificación crítica mayor (1.6 % p/v) (Figura 5.16c, Tabla E5.1). En contraste, la escuaramida **3** no gelifica y permanece en suspensión, incluso tras exhaustivos tratamientos térmicos y de sonicación.

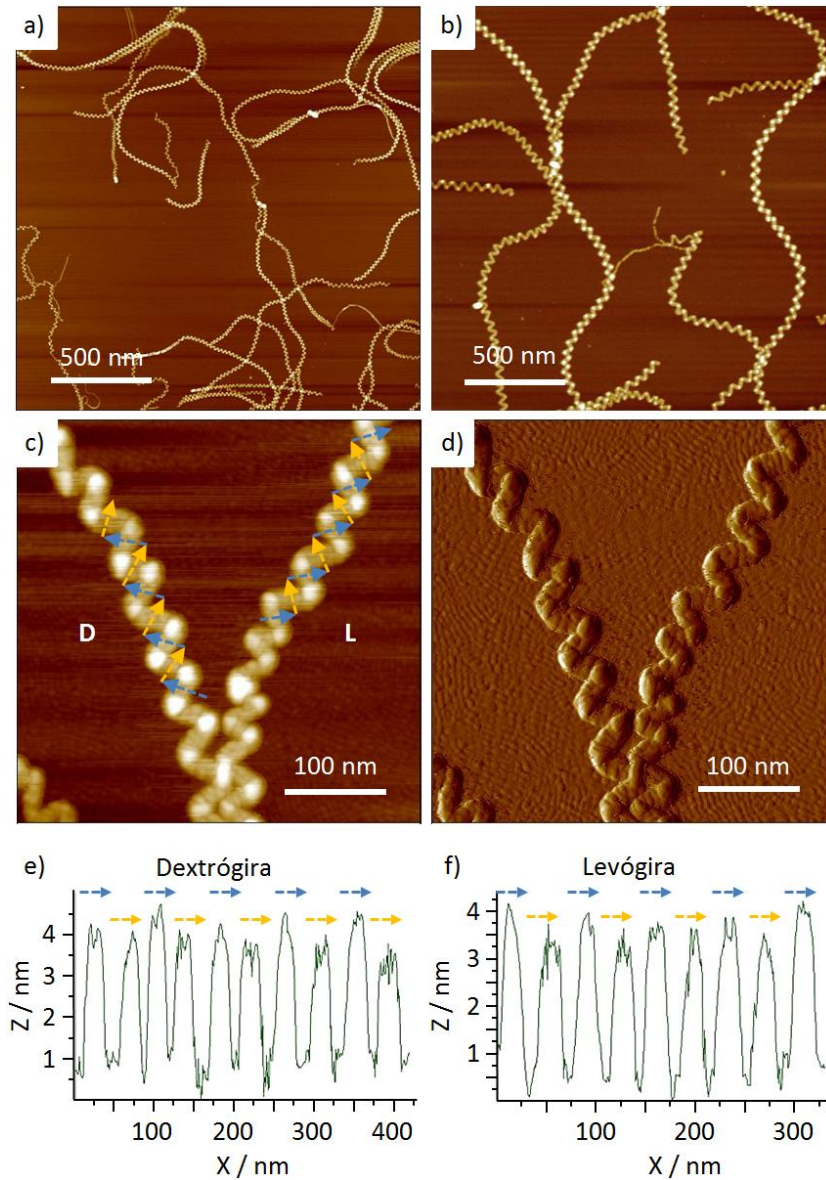
La comparación de las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) obtenidas a partir de muestras de los hidrogeles **1A** y **2A** revelan diferencias significativas en su morfología (Figura 5.17 y Figura 5.18). Además del entramado desordenado de fibras micrométricas

observado en ambas muestras, que es característico de hidrogeles, **1A** muestra haces fibrosos compuestos por una o más fibras con una anchura aparente de 42 nm (2 nm de altura) (Figura 5.17d). Por otra parte, la morfología de **2A** se compone de fibras helicoidales tanto dextrógiras como levógiras con un diámetro medio de 52 nm que se torsionan alrededor del eje central de la fibra (Figura 5.18c-f).



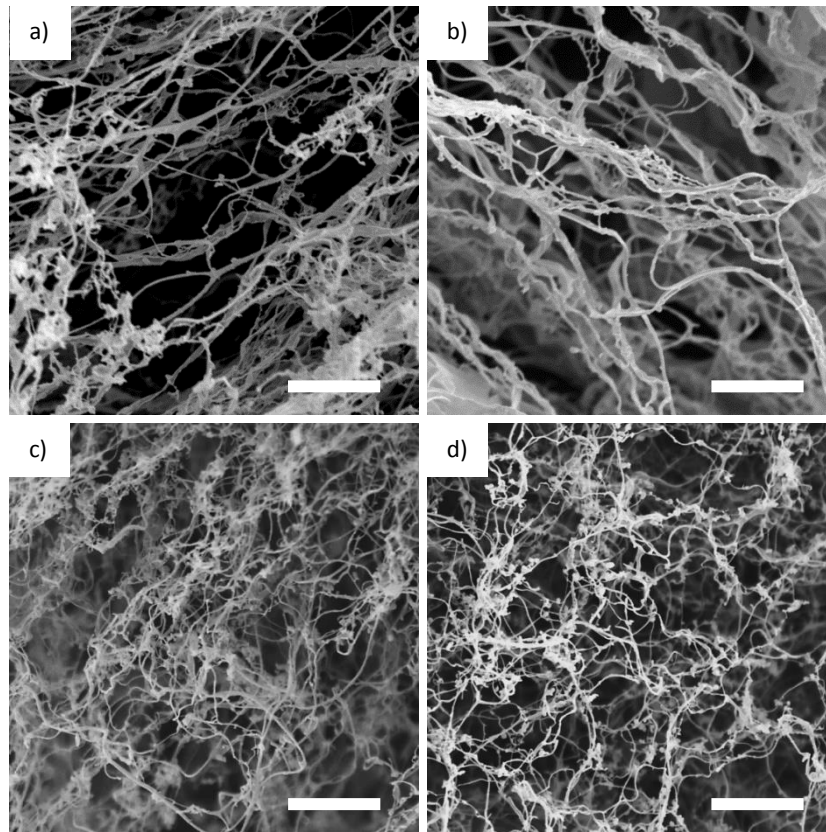
**Figura 5.17.** (a, b) Imágenes de AFM de **1A** mostrando un entramado de fibras micrométricas con un grueso aproximado de 42 nm. c) La imagen ampliada muestra que las fibras que componen el hidrogel no se ramifican, y que por tanto no presentan puntos de entrecruzamiento. El perfil de la sección transversal (d) se ha extraído siguiendo la línea de puntos de la imagen (c), y demuestra el apilamiento de las fibras. Los colores de los puntos situados sobre cada pico están referenciados al fragmento de la sección transversal a la cual corresponden. Los números sobre los picos indican el número de fibras que contienen.

Las imágenes obtenidas por SEM (Figura 5.19) y TEM (Figura 5.20) de muestras evaporadas de los hidrogeles **1A** y **2A** confirman la formación de redes de haces de fibras características de hidrogeles. Indudablemente, las diferencias en las morfologías presentadas por ambos hidrogeles y el fracaso en la hidrogelificación de **3** ponen de manifiesto la influencia de los sustituyentes del anillo aromático en la auto-agregación de los hidrogelantes precursores.

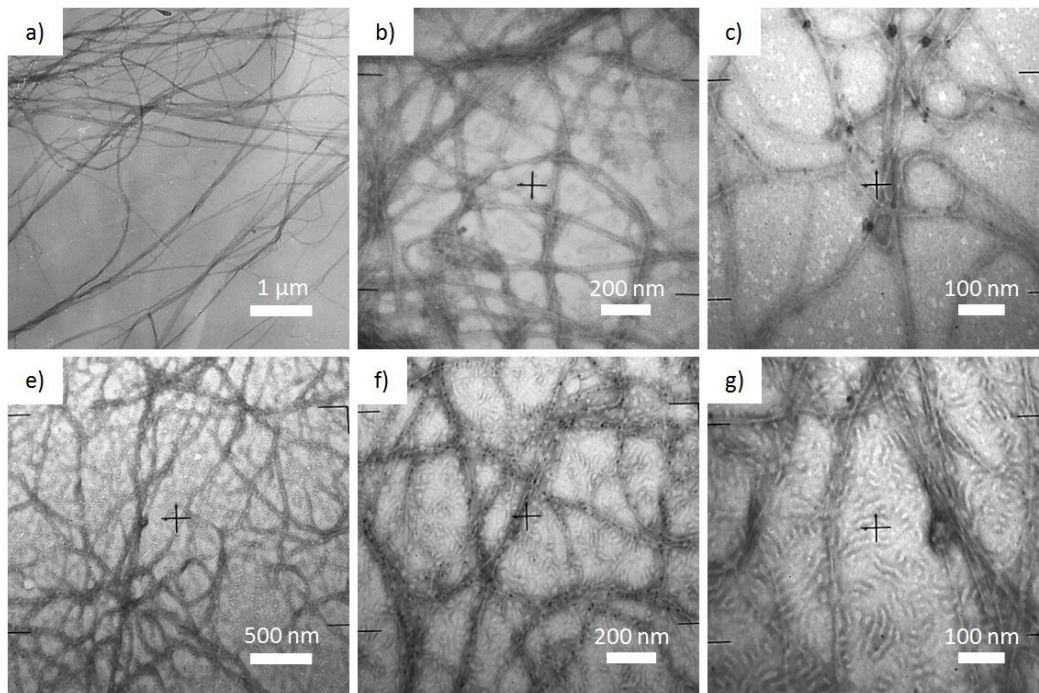


**Figura 5.18.** (a, b) Imágenes de AFM obtenidas depositando sobre mica alícuotas de 60  $\mu\text{L}$  de muestras diluidas del hidrogel **2A** (0.015 % p/v;  $c = 0.29$  mM). c) Imagen ampliada de dos hélices, una dextrógira (D) y otra levógira (L), y su correspondiente imagen de amplitud (d). (e, f) Perfiles de la sección transversal trazada siguiendo la línea de puntos de la imagen (c) indicando la dirección de rotación de las dos hélices. Los colores de las flechas sobre cada pico están referenciados a los fragmentos correspondientes de la sección transversal.



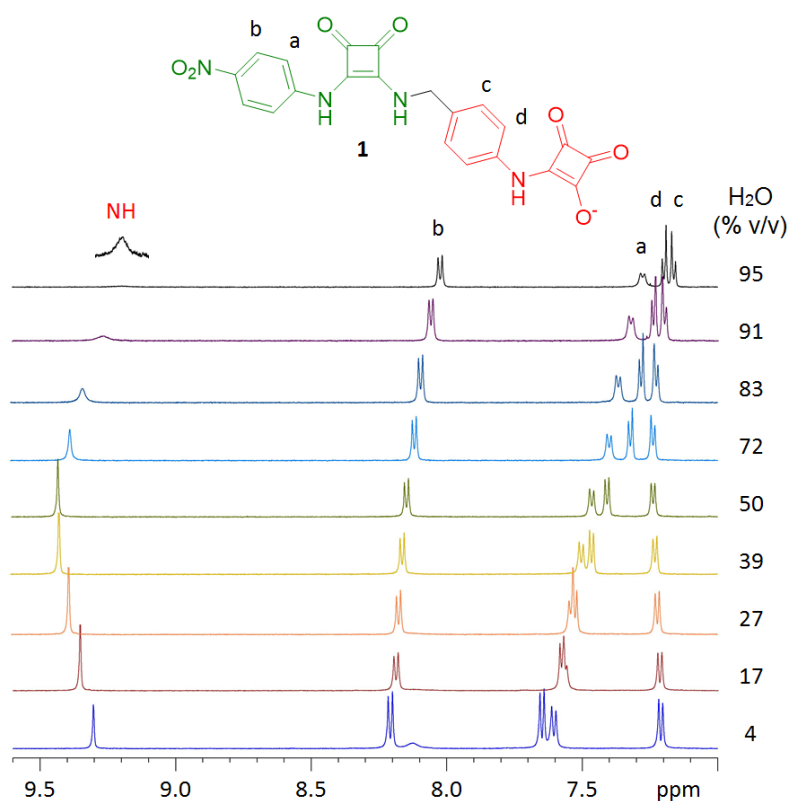


**Figura 5.19.** Imágenes de SEM de muestras de xerogel (0.1 % p/v) de **1A** (a, b) y **2A** (c, d). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.20.** Imágenes de TEM de muestras evaporadas de (a-c) **1A** (0.03 % p/v) y (e-g) **2A** (0.018 % p/v).

Con el fin de obtener información acerca del inicio del proceso de auto-agregación, se ha estudiado la evolución de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de disoluciones de **1** ( $1.0 \times 10^{-3}$  M) en mezclas DMSO- $d_6$ /H $_2$ O que contienen proporciones diferentes de los dos disolventes. Como resultado se observa que al aumentar la cantidad de agua en la mezcla, todos los protones aromáticos sufren un apantallamiento significativo (-0.1 a -0.5 ppm). Este resultado sugiere una influencia creciente de las interacciones por stacking de los anillos aromáticos presentes en agua (Figura 5.21). Por otra parte, es importante recordar el equilibrio dinámico entre las formas monomérica y dimérica gobernado por enlaces de hidrógeno en DMSO- $d_6$ , descrito en el Capítulo 4. De acuerdo con ello, el protón NH del escuaramato primero sufre un desplazamiento a campo bajo para luego invertir la dirección, desplazándose a campo alto debido a la rotura de los mencionados enlaces de hidrógeno en mezclas con un porcentaje de H $_2$ O superior al 50 %.



**Figura 5.21.** Espectro parcial de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) de una disolución de la sal sódica de **1** ( $1.0 \times 10^{-3}$  M) a temperatura ambiente en mezclas DMSO- $d_6$ /H $_2$ O con porcentajes crecientes de H $_2$ O. Todos los espectros se han registrado utilizando un sistema de pulsos WATERGATE para la supresión de agua.

El análisis llevado a cabo por espectrometría de masas de alta resolución ESI(-)-HRMS de disoluciones muy diluidas de **1-3** ( $c \approx 10^{-6}$  M) también aportan pistas sobre la agregación de estos precursores. La escuaramida **1** muestra una banda intensa a  $m/z$  433.0789 asignada al

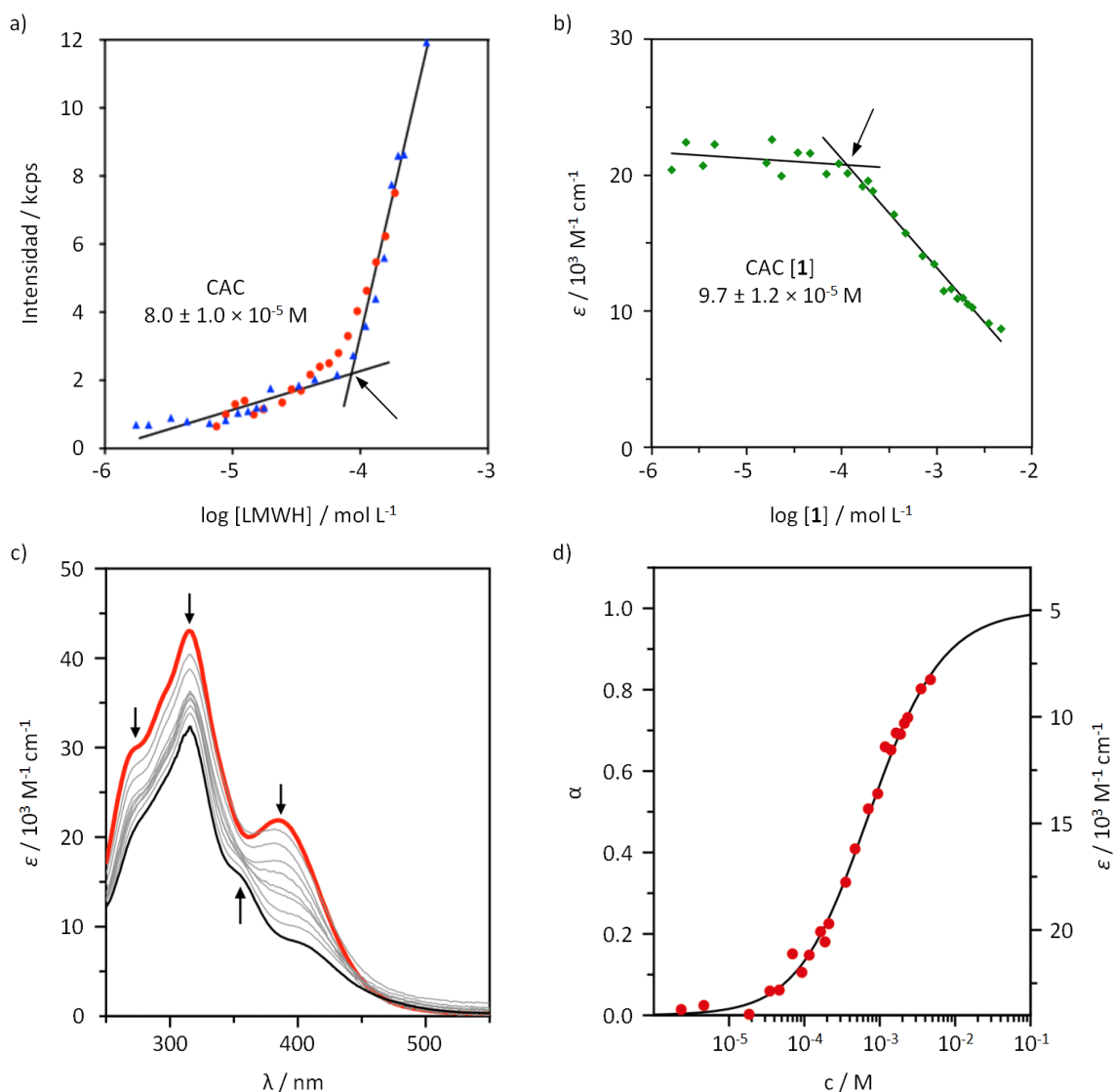
monómero aniónico [M-H]<sup>-</sup>, con una contribución del 44% del dímero doblemente cargado [2M-2H]<sup>2-</sup> (Figura E5.2). En el caso de **2**, el pico base aparece a m/z 524.0681, con una contribución de dímero que asciende a un 68% (Figura E5.3). En el espectro de ambos productos se pueden apreciar varios picos con valores más altos de m/z asignados a oligómeros mayores, con proporciones inferiores al 5% en comparación con el dímero. Por el contrario, el pico molecular de **3** a m/z 389.3670 contiene menos de un 3% de forma dimérica (Figura E5.4), indicando así la poca capacidad de agregación de **3**.

La formación de agregados de **1** y **2** se ha investigado mediante medidas de dispersión estática de luz (SLS) y de UV-vis. La representación gráfica de la intensidad de luz dispersada en función de la concentración muestra curvas prácticamente superponibles para ambos hidrogeles (Figura 5.22a). A partir de estos datos, la concentración de agregación crítica (CAC) para los dos hidrogeles, calculada a partir de la intersección de las rectas formadas por los valores experimentales, es de  $8.0 \pm 1.0 \times 10^{-5}$  M, muy similar a la encontrada para **1** a partir de los espectros de UV-vis (Figura 5.22b). Sin embargo, el cambio observado entre las dos rectas no es tan abrupto como el que cabría esperar en un modelo de agregación cooperativo.

Para recabar más información, se ha evaluado el proceso de agregación del hidrogel **1A** mediante espectroscopia de UV-vis. El precursor **1**, al ser más soluble que **2**, permite el estudio por UV-vis en un rango de concentraciones más amplio. Los espectros de las disoluciones de **1** en agua registrados por debajo del valor de CAC no muestran puntos isosbéticos, lo cual indica la ausencia de otros equilibrios, como ácido-base, etc.<sup>185</sup> La banda intensa a 318 nm es común a todas las escuaramidas y derivados escuarámicos, tal y como se ha visto en el Capítulo 2, y por tanto su valor de diagnóstico es mínimo. La banda de menor energía aparece aproximadamente a 388 nm (Figura 5.22c), y se ha asignado a la transición electrónica S<sub>0</sub> - S<sub>1</sub> del cromóforo 4-nitrofenil escuaramida. Al aumentar la concentración de **1**, la banda a 388 nm se desvanece por completo, y una nueva banda aparece en forma de hombro a 355 nm. Esta variación en el espectro sugiere una agregación H, que se traduce en el desplazamiento hipsocrómico de una banda debido al apilamiento de los cromóforos al aumentar la concentración. Curiosamente, la banda a 388 nm reaparece al calentar la muestra (Figura E5.6), indicando así el carácter reversible de la agregación y aportando una clara evidencia de que la agregación de **1** implica interacciones electrónicas entre los cromóforos de 4-nitrofenil escuaramida. De acuerdo con ello, el coeficiente de extinción molar aparente a 388 nm se puede ajustar a un modelo de agregación isodésmico (equal-K) (Figura 5.22d), dando lugar a una constante de asociación de  $800 \pm 75$  M<sup>-1</sup>, comparable con los valores publicados para agregaciones análogas.<sup>186</sup>

<sup>185</sup> X. Ni, X. Li, Z. Wang, J. P. Cheng, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1786-1789.

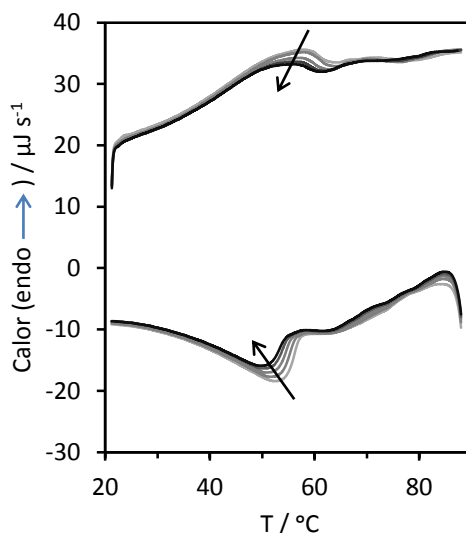
<sup>186</sup> Z. Chen, A. Lohr, C. R. Saha-Möller, F. Würthner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 564-584.



**Figura 5.22.** a) Intensidad de luz dispersada ( $s^{-1}$ ) en función de la concentración,  $\log$  [LMWH], de **1** (rojo) y **2** (azul). b) Coeficiente de extinción molar de **1** a 390 nm en función de la concentración de **1**. En ambos casos, el valor de CAC calculado en la intersección de las líneas está indicado. c) Espectros de UV-vis del hidrogel **1A** obtenidos en un rango de concentraciones entre  $4.6 \times 10^{-5}$  (línea roja) y  $7.0 \times 10^{-3}$  M (línea negra). Las flechas indican la dirección de movimiento de las bandas al aumentar la concentración de **1A**. d) Fracción molar ( $\alpha$ ) de moléculas agregadas en función de la concentración de **1A**. La línea se ha obtenido a partir del ajuste de los datos de UV-vis experimentales mediante un modelo isodésmico.

Los sustituyentes del anillo aromático escuaramídico de **1** ( $-\text{NO}_2$ ) y **2** ( $-\text{CF}_3$ ) no sólo modifican la capacidad de agregación hasta llegar a la formación del hidrogel, sino que afectan de forma significativa a su capacidad de respuesta frente a estímulos externos tales como calor y torsión mecánica. Se ha analizado el comportamiento térmico de los hidrogeles **1A** y **2A** mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) y mediante el test de inversión de vial

(Tabla E5.2). El termograma de DSC de **1A** (0.25 % p/v) en el rango de 25 a 90°C (Figura 5.23) muestra un pico endotérmico a  $T = 57$  °C. El pico depende de la concentración y su forma ancha revela el carácter continuo de la transición que tiene lugar en el hidrogel. Además, el hidrogel es termoreversible, es decir, pasa a estado líquido mediante la aplicación de calor, para luego volver al estado de hidrogel al enfriarlo a temperatura ambiente. En cambio, el termograma de DSC de **2A** registrado en el mismo rango de temperatura muestra una línea plana, indicando su naturaleza térmicamente estable.



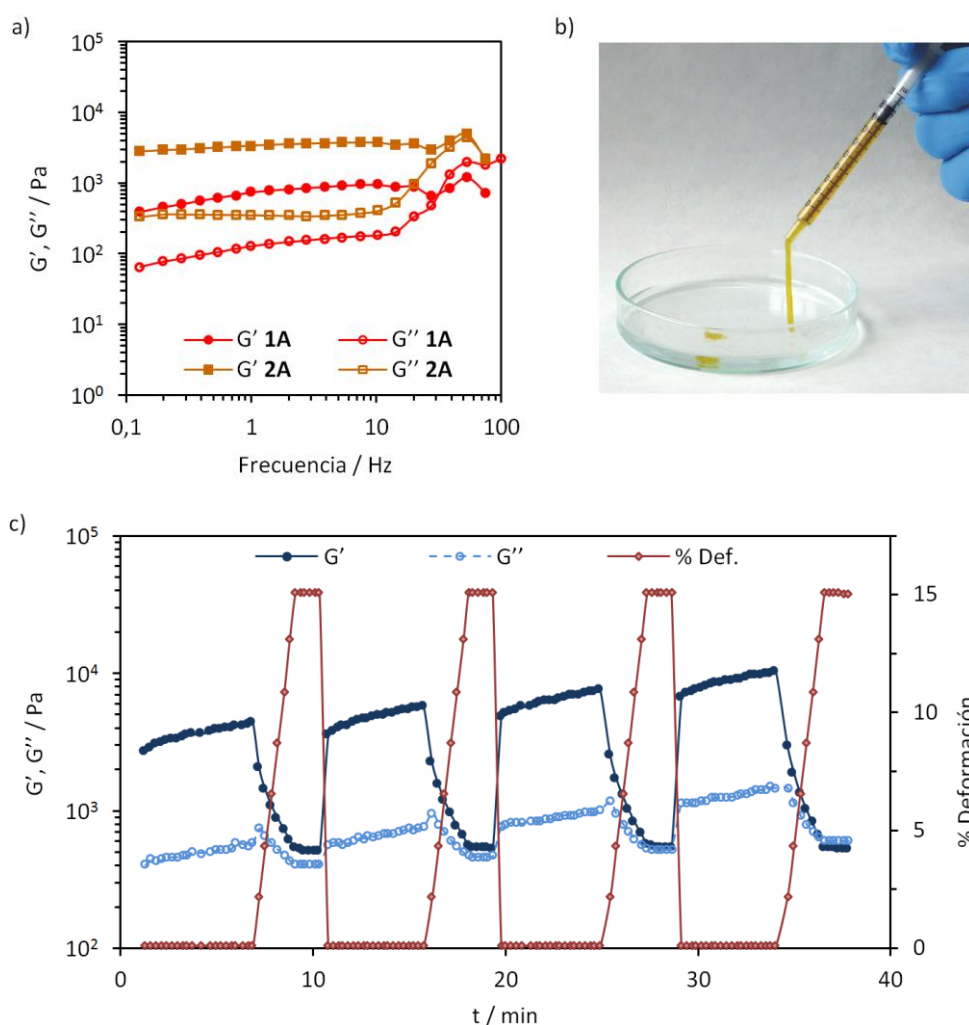
**Figura 5.23.** Estabilidad térmica de los hidrogeles evaluada Termograma de DSC **1A** (0.25 % p/v) desde 20 a 90 °C.

La condición de hidrogel se ha confirmado mediante experimentos de reología dinámica. Los experimentos de barrido de frecuencia muestran valores del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) diez veces mayores que los valores de módulo de pérdida ( $G''$ ) en todo el rango de frecuencia observado (1% de deformación, rango de frecuencia: 0.1-100 Hz) (Figura 5.24a), lo cual concuerda con el comportamiento de las redes fibrosas viscoelásticas. A la misma concentración (2% p/v), la magnitud del módulo  $G'$  para **2A** es diez veces mayor que en el caso de **1A**, demostrando así una mayor resistencia por parte de **2A** frente a la perturbación mecánica.

Las interacciones débiles por stacking que gobiernan la estructura de **1A** se traducen en un conjunto de propiedades de gran interés para posibles aplicaciones biotecnológicas. Así, además de la termorreversibilidad que presenta a una temperatura relativamente baja, el hidrogel **1A** es tixotrópico, lo cual significa que su viscosidad disminuye al aplicar compresión. Este hecho implica que **1A** es capaz de fluir a través de canales estrechos, y por tanto resulta fácilmente inyectable (Figura 5.24b). Para evaluar reológicamente este comportamiento



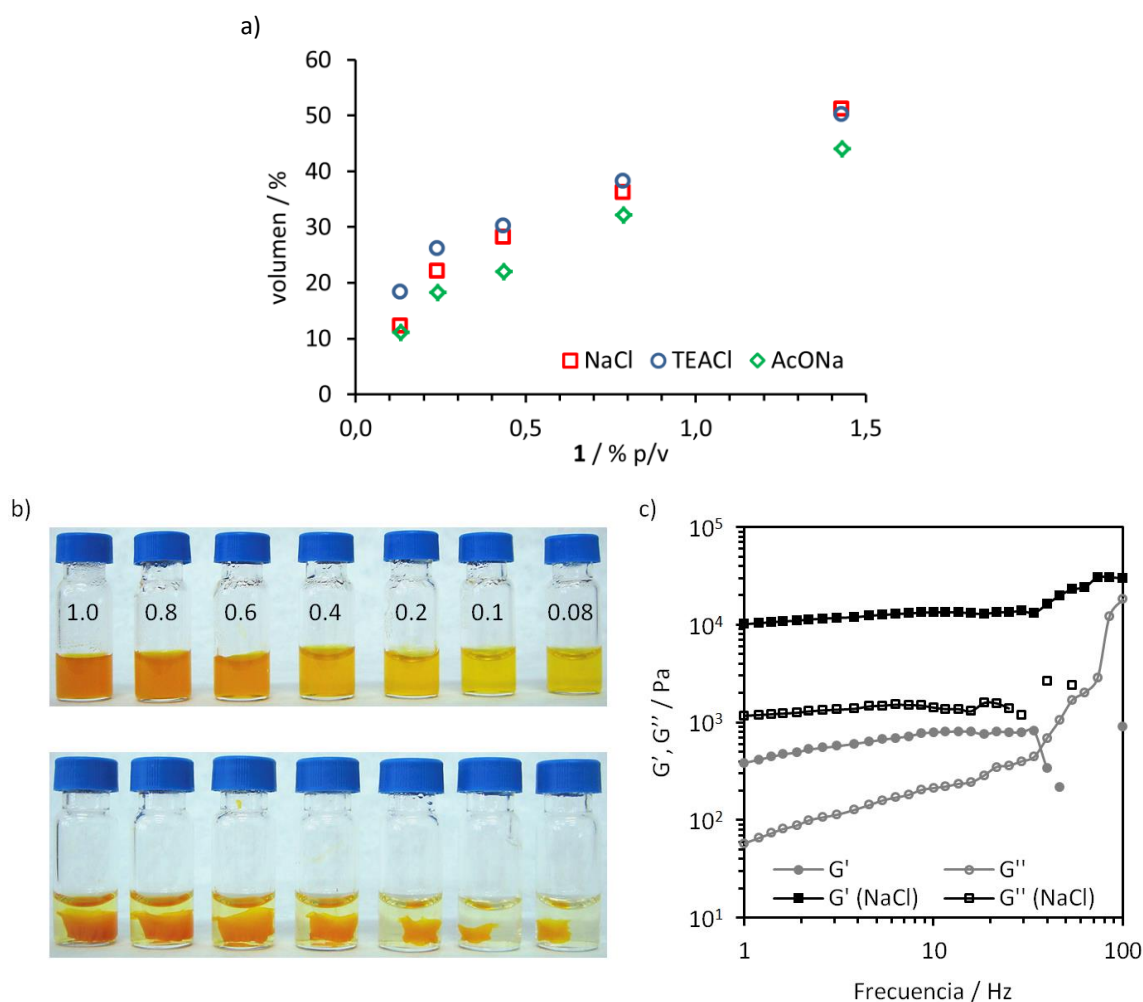
tixotrópico se han aplicado ciclos de alto y bajo estrés a una muestra de **1A** (2% p/v) (Figura 5.24c). Al aplicar un porcentaje de deformación pequeño, el hidrogel muestra valores del módulo de almacenamiento que son un orden de magnitud superiores a los valores de módulo de pérdida, lo cual es consistente con el estado de gel. Al aumentar el grado de deformación, ambos módulos disminuyen hasta alcanzar valores similares, indicando una transición de fase de gel a líquido.<sup>187</sup> Seguidamente, la aplicación de nuevo de deformaciones bajas permite la recuperación de los dos módulos hasta recuperar la magnitud que presentaban antes del incremento de estrés.



**Figura 5.24.** a) Experimento reológico de barrido de frecuencia sobre **1A** y **2A** (2.0% p/v) aplicando un 1% de deformación a 25°C. b) Fotografía que ilustra las propiedades típicas de un fluido del hidrogel **1A** (1.0% p/v). c) Experimento reológico de barrido de tiempo sobre **1A** (2.0% p/v) a 1 Hz aplicando ciclos de baja deformación (0.1%, 6 min) y alta deformación (15%, 90 s) a 25°C.

<sup>187</sup> H. Ye, C. Owh, X. J. Loh, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 48720–48728.

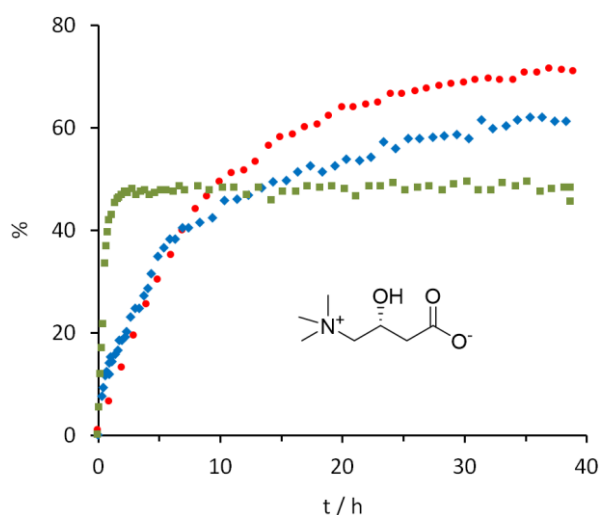
En cuanto a su estabilidad en disolución, el hidrogel **1A** permanece inalterado durante semanas cuando se sumerge en agua. Sin embargo, la adición de disoluciones de sales tales como NaCl, Et<sub>4</sub>NCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Me<sub>4</sub>NOAc, o cloruro de acetilcolina producen un encogimiento homogéneo e irreversible. Una vez que el hidrogel se ha encogido mantiene la forma del recipiente que lo contiene (Tabla E5.3). La magnitud de esta transición macroscópica de fase depende de la concentración de sal añadida y de la correspondiente relación molar con **1** (Figura 5.25a,b). La cinética del proceso es rápida, ya que transcurridas cuatro horas desde la adición de la disolución salina el hidrogel se ha encogido hasta alcanzar prácticamente su volumen final. Una vez alcanzado el equilibrio, la dureza del hidrogel resultante **1B** se incrementa considerablemente al compararla con **1A** (1Hz,  $G'_{1B}/G'_{1A} \approx 25$ ,  $G''_{1B}/G''_{1A} \approx 20$ ) (Figura 5.25c).



**Figura 5.25.** a) Porcentaje de reducción del volumen debido a la adición de sales en función de la concentración de **1**. b) Imagen de los hidrogel **1A** (500 μL) antes y después de la adición de 50 μL de una disolución de NaCl (50 mM), mostrando un encogimiento del hidrogel una vez alcanzado el equilibrio (24 h). c) Experimento reológico de barrido de frecuencia de **1A** (1% p/v) antes y después del encogimiento del hidrogel por acción de NaCl (4.6 mM, 2 equivalentes).

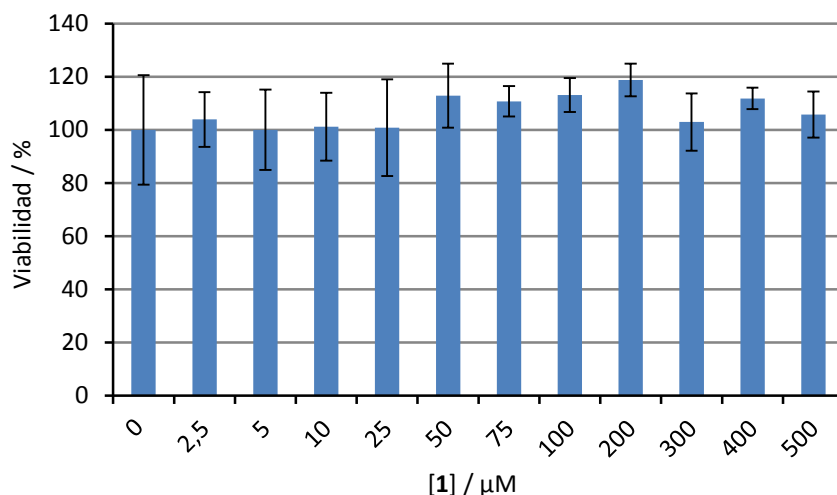
Finalmente, el hidrogel **1A** puede almacenar en su interior una gran variedad de moléculas zwitteriónicas, tales como L-carnitina, GABA, glicina, triptófano y DL-Ala-DL-Ala, sin perturbar la estructura del hidrogel, en contraste con el efecto de encogimiento producido por la adición de sales. Estas moléculas, adicionadas durante la preparación del hidrogel y antes de la aplicación de calor, pueden quedar contenidas en un exceso molar de hasta 240:1 con respecto a **1** (es el caso de la glicina, alcanzando los 41.5 g por gramo de **1**), sin alterar la estabilidad mecánica del hidrogel cargado resultante. Sin embargo, la adición sobre **1A** de sales orgánicas como el acetato de tetrametilamonio o el cloruro de acetilcolina, estructuralmente relacionadas con las moléculas zwitteriónicas anteriores, produce el encogimiento del hidrogel.

Los hidrogeles cargados al sumergirse en agua pueden liberar los zwitteriones contenidos en su interior de manera controlada (Figura 5.26 y Figura E5.7a). Dependiendo del compuesto cargado se ha liberado entre un 30 y un 70% del zwitterión en menos de 24 horas. De forma alternativa, al llevarse a cabo la adición de disoluciones salinas sobre hidrogeles cargados se produce el encogimiento correspondiente y se estimula la velocidad de liberación del compuesto almacenado, en detrimento de un descenso en la cantidad total descargada al alcanzar el equilibrio. Así, mientras que el 47% de L-carnitina se libera en agua tras 10 horas, en una disolución de NaCl 0.3 M, la misma cantidad se alcanza en tan solo 2 horas. En todos los casos evaluados, la liberación de compuesto previamente cargado sigue un modelo cinético de pseudo-segundo orden (Figura E5.7b-e), característico de los procesos de desorción sólido-líquido.



**Figura 5.26.** Comparación de los perfiles de liberación de L-carnitina (69 mM) cargados en el hidrogel **1A** (0.6% p/v, 100 μL) a 25°C al cubrirlo con 500 μL de agua (rojo), NaCl 100 mM (azul) o NaCl 300 mM (verde), respectivamente.

Con vistas a una potencial utilidad del hidrogel en el campo biomédico se ha estudiado la biocompatibilidad realizando ensayos de toxicidad a nivel celular. Los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con **1A** sobre células de glioblastoma humano (U87MG) demuestran una total viabilidad del hidrogel a todas las concentraciones exploradas (hasta 0.5 mM) (Figura 5.27). Estos resultados refuerza el potencial de este hidrogel para aplicaciones biotecnológicas.



**Figura 5.27.** Porcentaje de células U87MG viables tratadas con diferentes concentraciones de **1**.

Los experimentos explicados hasta este punto destacan las diferencias estructurales, térmicas y mecánicas existentes entre los dos hidrogeles **1A**, **1B** y **2A**. Ello es debido a las diferentes contribuciones de los sustituyentes de la aril escuaramida. Los resultados obtenidos aportan claras evidencias de que el stacking de la 4-nitrofenil escuaramida gobierna la agregación de **1** para formar **1A**. Sin embargo, los dos grupos  $\text{CF}_3$  de la 3,5-bistrifluorometilfenil escuaramida pueden establecer interacciones adicionales del tipo  $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}\cdots\text{F}-\text{C}(\text{sp}^3)$  y  $\text{C}(\text{sp}^3)-\text{F}\cdots\text{F}-\text{C}(\text{sp}^3)$ . Así, además del stacking aromático, las interacciones a partir de los átomos de flúor pueden contribuir a la agregación de **2**, tal y como se ha observado en las estructuras en estado sólido de derivados de escuaramida similares.<sup>184</sup>

## 5.5. Conclusiones

En conclusión, se ha demostrado la formación de hidrogeles basados en el conjunto escuaramida-escuaramato. Se han utilizado por primera vez los ácidos escuarámicos como componente hidrofílico de hidrogelantes minimalistas, unidos a una unidad aril-escuaramida como parte hidrofóbica. Los sustituyentes del anillo aromático escuaramídico ( $\text{NO}_2$  and  $\text{CF}_3$ ) inducen pronunciadas diferencias térmicas y mecánicas en la agregación de los hidrogeles. Así, el hidrogel que contiene la unidad 4-nitrofenil escuaramida es termoreversible, tixotrópico, inyectable y se puede cargar con una importante cantidad de biomoléculas zwitteriónicas, raramente utilizadas como cargas en geles. Con todo, se ha demostrado el potencial tecnológico de la pareja escuaramida-escuaramato como nueva herramienta para el diseño de hidrogeles supramoleculares.



## 5.6. Sección Experimental

### 5.6.1. Métodos e instrumentación

Todos los reactivos se han adquirido comercialmente y se han utilizado sin llevar a cabo ningún tipo de purificación previa. Las síntesis asistidas por microondas se han realizado mediante un reactor Biotage Initiator (potencia aplicable de 0-400 W con incrementos de 1 W, sensor de temperatura por IR, rango de presiones de 0-20 bar). La determinación de valores de pH se ha realizado mediante un pH-Meter 766 Calimatic de Knick. Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 300 y 600 Mhz) se han registrado en espectrómetros Bruker AVANCE en DMSO- $d_6$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm, y están referenciados a la señal residual del disolvente. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz. Los espectros de ESI-HRMS se han registrado en un espectrómetro Thermo Scientific Orbitrap Q Exactive equipado con un módulo de electrospray. Los espectros de absorción de UV-vis se han registrado en un espectrofotómetro Agilent Cary 60, equipado con un accesorio TrayCell compuesto de una celda de medida con fibra óptica y diferentes cabezales con espejos integrados, lo que permite cubrir un mayor rango de concentraciones.

### 5.6.2. Síntesis de los hidrogelantes

**Arilescuaramida monoésteres EtSqPhR.** La síntesis y caracterización de **EtSqNO<sub>2</sub>**, **EtSqCF<sub>3</sub>** y **EtSqPh** se han descrito previamente.<sup>59</sup> Los tres monoésteres se han sintetizado de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito. La síntesis de **EtSqNO<sub>2</sub>** se explica a continuación a modo de ejemplo. 0.97 g de 4-nitroanilina (7 mmol) en 25 mL de etanol se añaden a una disolución de escuarato de dietilo (Sq(OEt)<sub>2</sub>, 1.19 g, 7 mmol) y trifluorometanosulfonato de zinc (Zn(OTf)<sub>2</sub>, 0.51 g, 1.4 mmol) en etanol (25 mL). La disolución se mantiene en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se evapora al vacío y el residuo se suspende a continuación en 100 mL de NH<sub>4</sub>Cl 1M. Después de filtrar, el residuo sólido se recoge y se lava varias veces con NH<sub>4</sub>Cl, agua, y finalmente con acetonitrilo frío (10 mL). El sólido resultante se seca dando lugar al monoéster de 4-nitroanilina en forma de sólido anaranjado (1.6 g, 6.1 mmol, 87%).

**AcSqBenzNH<sub>2</sub>.** La síntesis y la caracterización de este compuesto se han descrito en el Capítulo 2.<sup>188</sup>

**Hidrogelantes escuaramido-escuarámicos.** Los hidrogelantes se han preparado de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito en el Capítulo 4.<sup>189</sup> La síntesis del

<sup>188</sup> Ácido escuarámico **5m**, reacción 12 y Sección Experimental (Sección 2.5.2).

<sup>189</sup> Receptor **3**, ver Capítulo 4, Sección Experimental (Sección 4.6.2)

hidrogelante **1** se describe a continuación a modo de ejemplo. Una mezcla de AcSqBenzNH<sub>2</sub> (300 mg, 1.37 mmol), EtSqNO<sub>2</sub> (300 mg, 1.14 mmol) y carbonato potásico (342 mg, 2.51 mmol) en 20 mL de etanol se adiciona, junto con una barra magnética, dentro de un vial de 10-20 mL y éste se sella herméticamente. La mezcla de reacción se calienta en un reactor de microondas a 130°C durante 33 minutos. La suspensión violeta oscuro resultante se evapora a sequedad. El residuo sólido se suspende en 50 mL de HCl 1M, se agita durante 30 min y, a continuación, se filtra y se lava con acetonitrilo. El sólido resultante se suspende en 40 mL de agua y el pH se ajusta a 10-11 mediante la adición de NaOH 1M, y se agita durante 10 min, adquiriendo la disolución un color rojo oscuro. Después, se adiciona HCl 1M gota a gota hasta llegar a pH 1, observando una lenta precipitación. El sólido se filtra y se lava con acetonitrilo. Este procedimiento de disolución-precipitación dependiente del pH se repite hasta tres veces. Finalmente, tras secar el sólido, el compuesto **1** se obtiene como un polvo rojo oscuro (414 mg, 68%). Los datos de caracterización del producto se detallan en el Capítulo 4.<sup>189</sup>

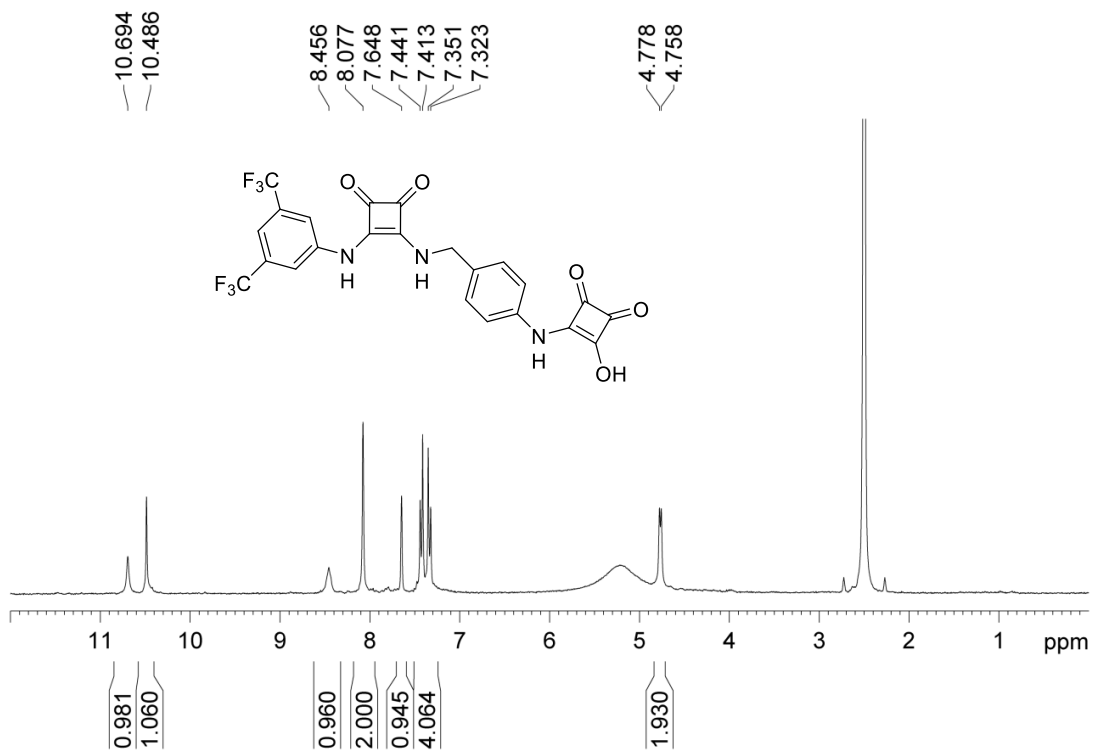
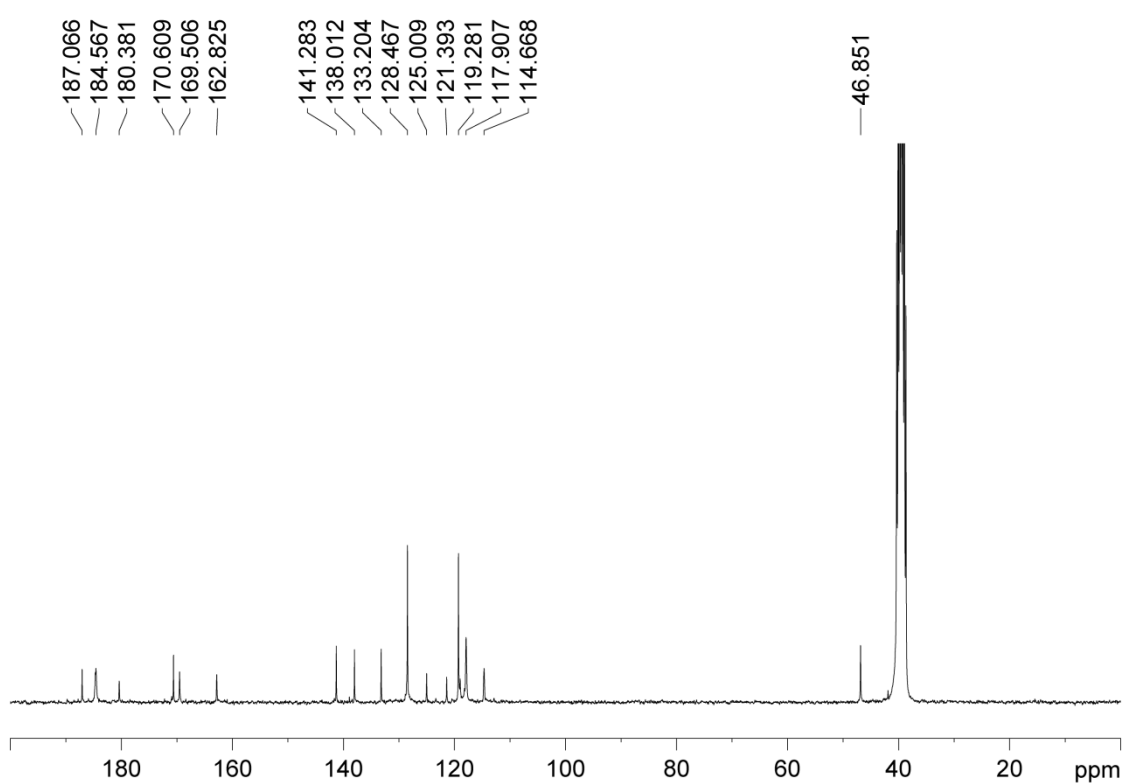
El hidrogelante **2** se obtiene como un sólido marrón (358 mg, 60%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 10.69 (s, 1H; NH), 10.49 (s, 1H; NH), 8.46 (s, 1H; NH), 8.08 (s, 2H; F<sub>3</sub>C-Ar-H), 7.65 (s, 1H; F<sub>3</sub>C-Ar-H), 7.43 (d, <sup>3</sup>J=8.4 Hz, 2H; Benz-H), 7.34 (d, <sup>3</sup>J=8.4 Hz; Benz-H), 4.77 ppm (d, <sup>3</sup>J=6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 25 °C): δ = 187.07, 184.57, 180.38, 170.61, 169.51, 162.83, 141.28, 138.01, 133.20, 128.45, 125.01, 121.39, 119.28, 117.91, 114.67, 46.85 ppm. HRMS (ESI<sup>-</sup>) para C<sub>23</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>F<sub>6</sub> calcd. 524.0687; experimental 524.0681 [M-H]<sup>-</sup>.

El hidrogelante **3** se ha obtenido como un polvo marrón anaranjado (364 mg, 82%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 10.34 (s, 1H; NH), 9.65 (s, 1H; NH), 7.99 (s, 1H; NH), 7.47-7.30 (m, 8H; Ar-H), 7.02 (t, <sup>3</sup>J=7.2 Hz, 1H; Ar-H), 4.75 ppm (d, <sup>3</sup>J=6.0 Hz, 2H; CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C): δ = 187.74, 184.69, 184.02, 180.32, 170.92, 168.79, 163.82, 139.02, 138.14, 133.25, 129.37, 128.57, 122.67, 119.26, 118.03 ppm. HRMS (ESI<sup>-</sup>) para C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub> calcd. 388.0939; experimental 388.0939 [M-H]<sup>-</sup>.



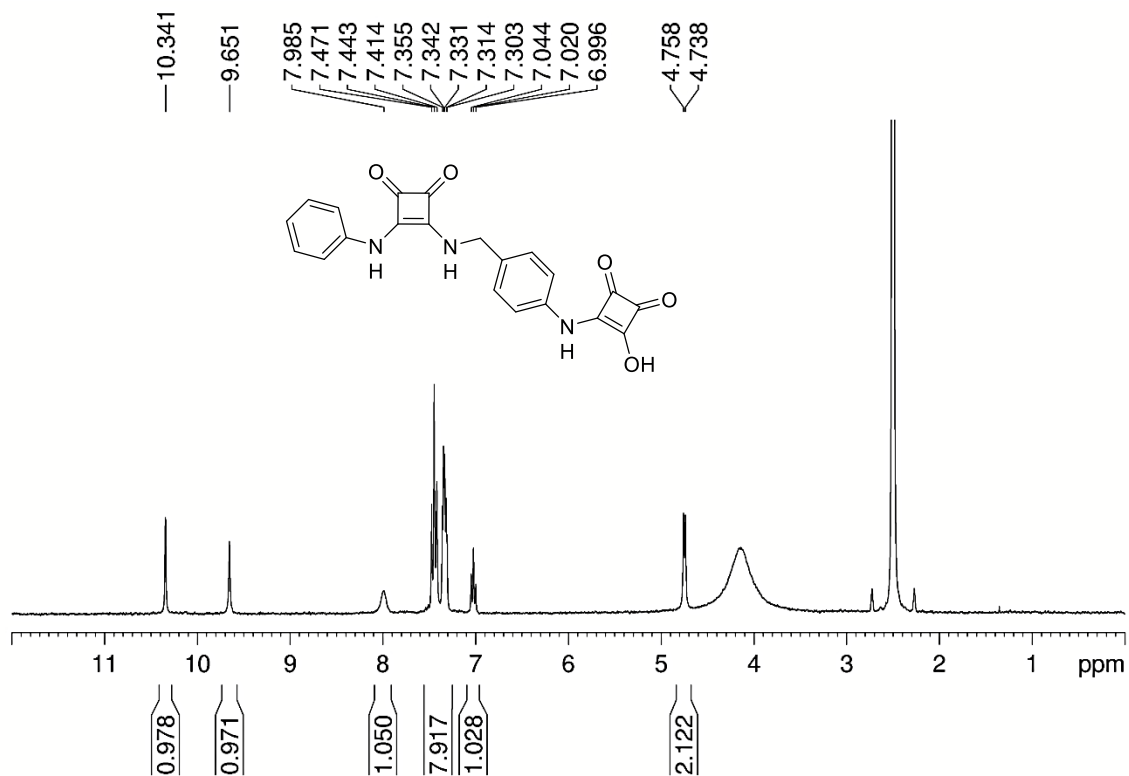
5.6.3. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ 

Hidrogelante 2

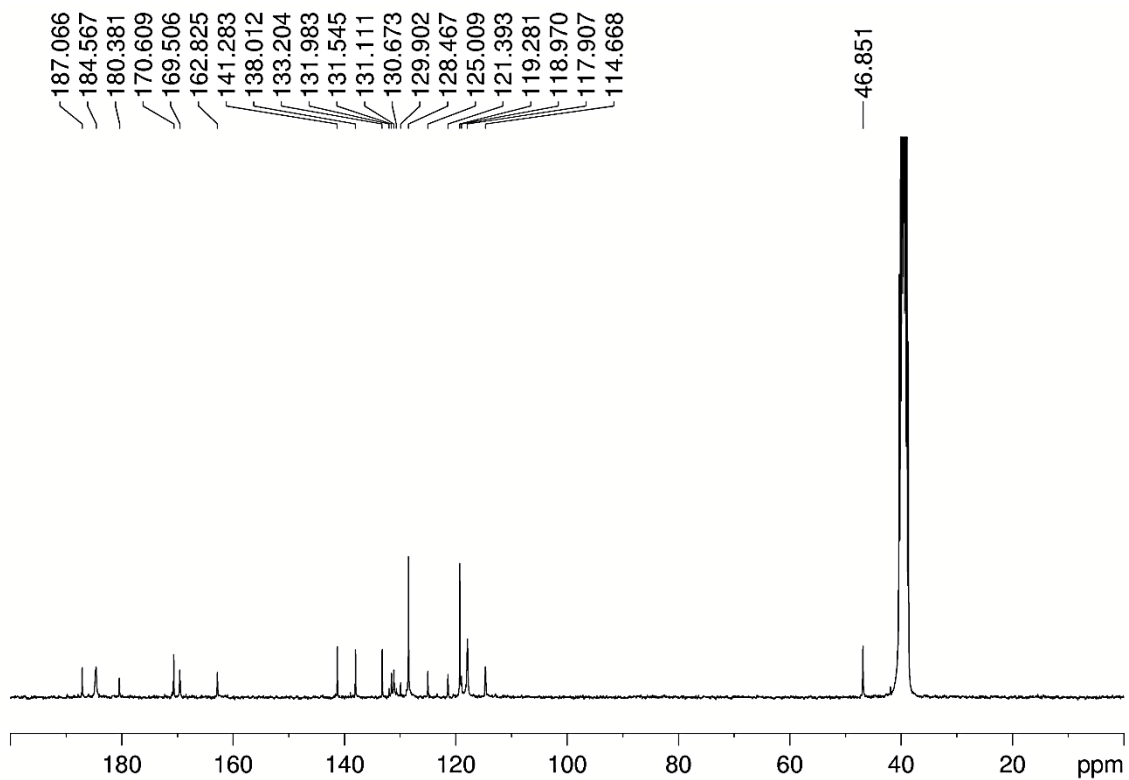
 $^1\text{H}$  NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K $^{13}\text{C}$  NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K

Hidrogelante **3**

<sup>1</sup>H NMR, DMSO, 300 MHz, 298 K



<sup>13</sup>C NMR, DMSO, 75 MHz, 298 K



#### 5.6.4. Preparación de los hidrogeles

La preparación del hidrogel **1A** (0.1 % p/v de **1**; 1 mg/mL, 2.3 mM) a pH 7 se describe a continuación a modo de ejemplo. 2.0 mg de **1** se introducen en un vial de 4 mL con 1.5 mL de agua Mili-Q y la suspensión resultante se agita durante 5 minutos. La mezcla se sonica durante varios minutos hasta que no se observan agregados y la suspensión es homogénea a la vista. En este momento y bajo agitación magnética, se añade la cantidad estequiométrica de NaOH 0.1 M (0.230 mL) necesaria para neutralizar el hidrogelante. A continuación, dependiendo del pH al que se quiera preparar el hidrogel, se adiciona el volumen correspondiente de NaOH o HCl 0.1 M. Finalmente se adiciona el volumen de agua restante para alcanzar el volumen total de 2 mL preestablecido. Una vez retirada la barra agitadora, la mezcla homogénea se calienta a 70° durante una hora, tras lo cual la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente. El hidrogel se considera formado cuando no se observa flujo por gravedad al invertir el vial, lo cual ocurre una hora después de haber retirado el vial de la fuente de calor. En cuanto a los hidrogeles preparados a concentraciones más elevadas, el proceso de gelificación resulta evidente incluso antes de que la mezcla alcance la temperatura ambiente.

Las series de diluciones de hidrogeles se consiguen mediante un procedimiento similar. Se prepara una disolución madre de hidrogelante tal y como se ha descrito. Una vez que la concentración y el pH están ajustados, y antes de aplicar calor, se llevan a cabo las diluciones utilizando agua Mili-Q con el pH ajustado, manteniendo la disolución madre con agitación magnética vigorosa para evitar una gelificación prematura. Después, todas las muestras se calientan y se enfrían a temperatura ambiente siguiendo el procedimiento habitual.

#### 5.6.5. Caracterización de hidrogeles

##### 5.6.5.1. Concentración de gelificación crítica (CGC)

La CGC se ha determinado mediante el test de inversión de vial. Con esta finalidad se preparan diluciones de los hidrogelantes **1-3** de acuerdo al procedimiento anterior (Sección 5.6.4). Se han introducido 0.5 mL de cada muestra diluida en viales de 2 mL, éstos se han sellado y calentado a 70° durante una hora. A continuación las muestras se han enfriado a temperatura ambiente durante 3 horas. Para evaluar la formación del gel, todos los viales se han invertido durante 5 minutos. Se considera que la gelificación ha tenido lugar cuando no se observa flujo por gravedad. Así, la concentración de gelificación crítica es la concentración más baja a la que se consigue superar el test de inversión. Los valores de CGC han sido 0.1% p/v (2.3 mM) a pH 6 para **1A** y 1.6% p/v (30 mM) para **2A**, mientras que **3** no se ha sido capaz de gelificar.

**Tabla E5.1.** Concentración de gelificación crítica (CGC) de **1A** y **2A** a diferentes valores de pH.

pH	CGC % w/v	
	<b>1A</b>	<b>2A</b>
9	0.3	1.7
8	0.3	1.7
7	0.2	1.6
6	0.1	1.6
5	0.3	1.6
3	0.6	2.0

### 5.6.5.2. Estabilidad térmica

Para evaluar la estabilidad térmica, muestras de 0.5 mL del hidrogel correspondiente a diferentes concentraciones y a pH 6 se han introducido en viales de 2 mL y se han sellado. Los viales se han colocado en un termoblock, mediante el cual se ha ido incrementando la temperatura a intervalos de 2°C, llevando a cabo el correspondiente test de inversión a cada temperatura después de 10 minutos de estabilización. Se ha anotado la temperatura a la cual no se supera el test de inversión.

**Tabla E5.2.** Estabilidad térmica de los hidrogeles evaluada mediante el test de inversión.

% p/v	T (°C) test inversión fallido	
	<b>1A</b>	<b>2A</b>
2,0	>100 <sup>[a]</sup>	>100 <sup>[a]</sup>
1,7	>100 <sup>[a]</sup>	>100 <sup>[a]</sup>
1,6	>100 <sup>[a]</sup>	34
1,5	>100 <sup>[a]</sup>	[b]
1,0	>100 <sup>[a]</sup>	[c]
0,6	>100 <sup>[a]</sup>	[c]
0,5	92	[c]
0,4	74	[c]
0,3	63	[c]
0,2	51	[c]
0,1	35	[c]
0,09	[b]	[c]

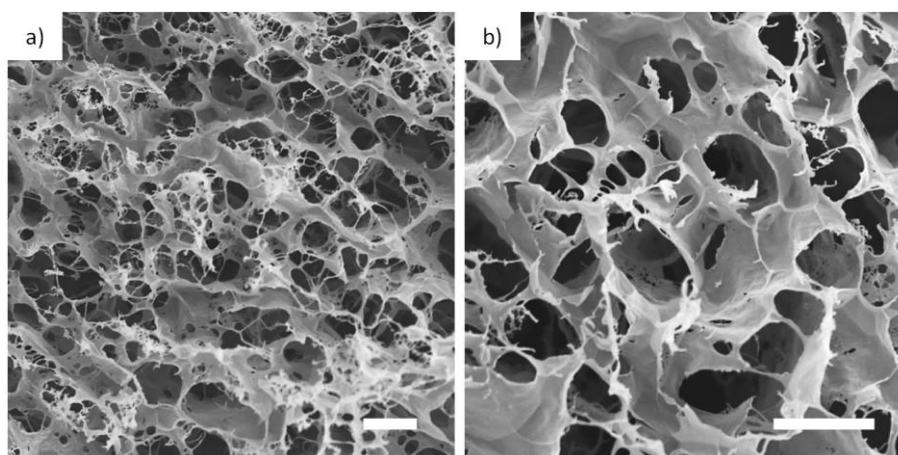
[a] Los hidrogeles liberan vapor de agua que se condensa en el cristal del vial, formando una capa sobre el gel, que se mantiene estable frente a la inversión. [b] Suspensión viscosa homogénea inestable frente a la inversión. [c] Suspensión líquida homogénea inestable frente a la inversión.

### 5.6.5.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para obtener las imágenes de AFM, 60  $\mu\text{L}$  de la solución de los hidrogeles (0.015% p/v, pH 7) se han colocado sobre un disco de mica. La muestra se ha dejado abierta al aire durante una hora y el exceso de hidrogel se ha desechado mediante un flujo de nitrógeno. Las imágenes de AFM (tapping mode) se han llevado a cabo en condiciones ambientales en un microscopio AFM MultiMode Veeco con un controlador NanoScope IV. Se han utilizado puntas de silicón HQ:NSC35/AIBS con una longitud de palanca (cantilever) de 90  $\mu\text{m}$ , una región de frecuencias de resonancia de 150–300 kHz y una relación de barrido de 1.0 Hz. Las secciones transversales se han obtenido mediante el software WSxM.<sup>190</sup>

### 5.6.5.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se han registrado mediante un microscopio Hitachi S-3400N con un voltaje de aceleración de 10 kV. Las muestras se han liofilizado antes de recubrirse con oro.



**Figura E5.1.** Imágenes de SEM de muestras liofilizadas (0.1 % p/v) de (a) **1A**, (b) **2A** y (c, d) **1B** con  $\text{MgCl}_2$  en un ratio molar de 1:2. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

<sup>190</sup> I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A. M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, 78, DOI 10.1063/1.2432410.

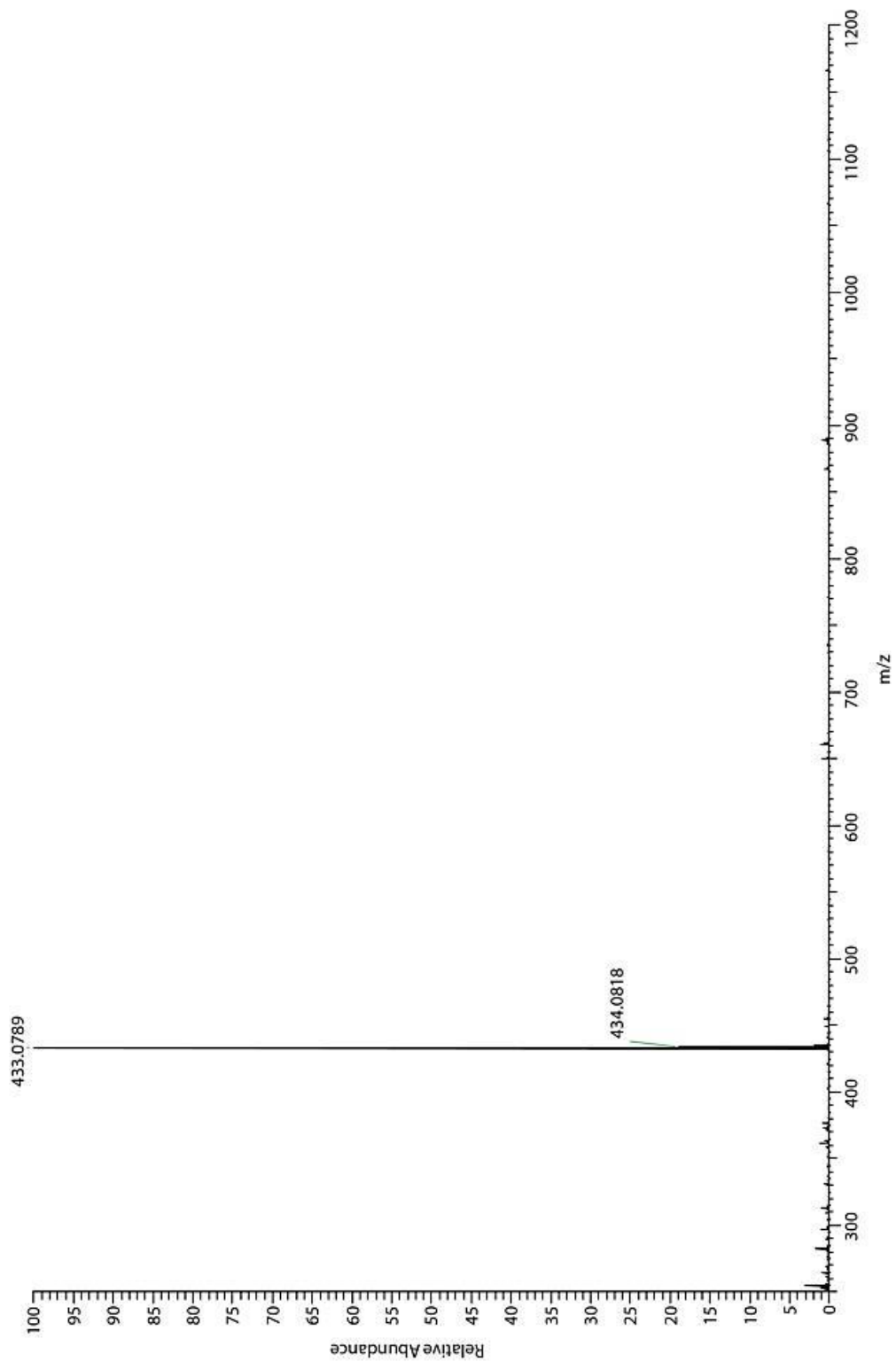
**5.6.5.5. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

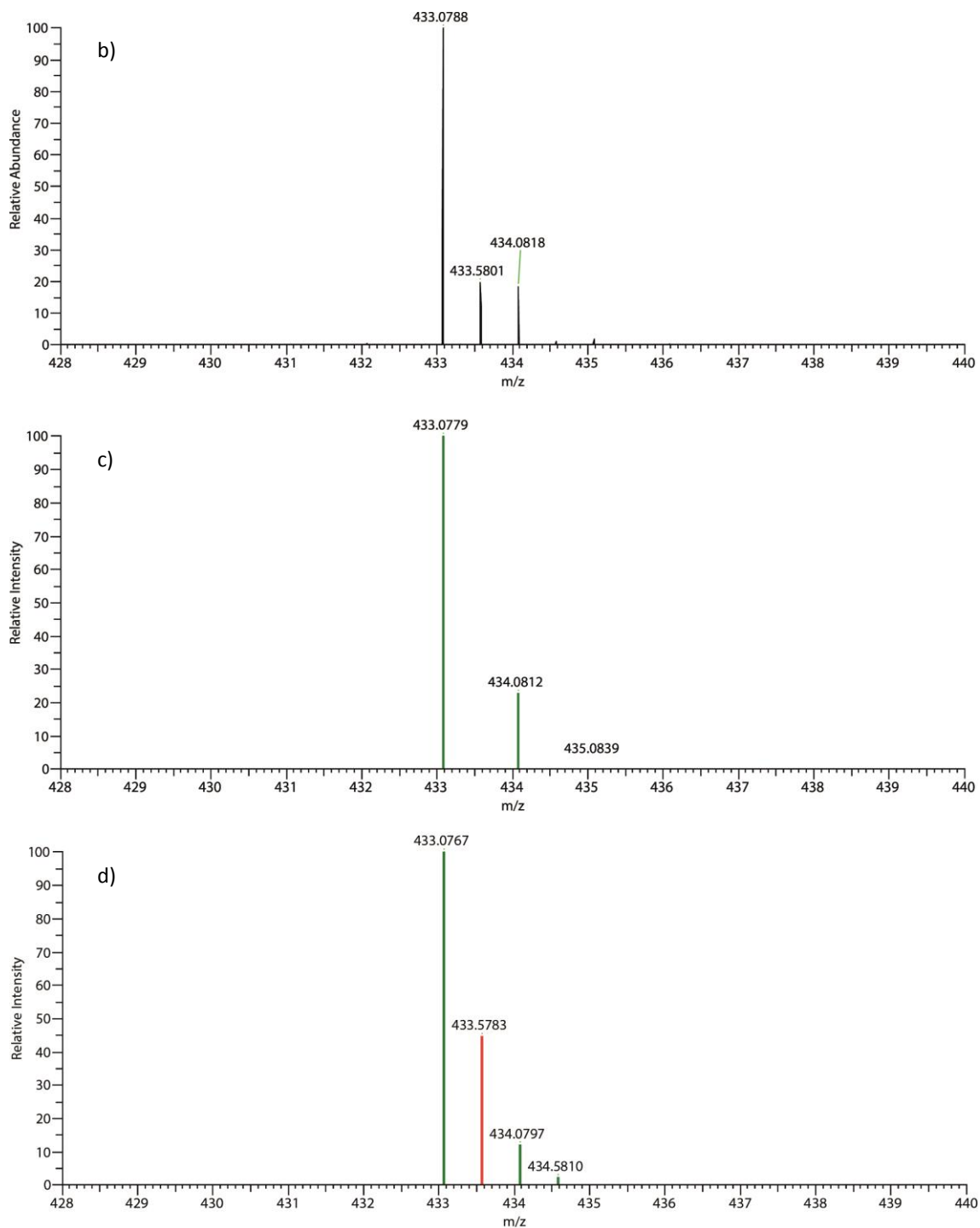
Para la obtención de imágenes por microscopía de transmisión electrónica (TEM), se depositan 20  $\mu\text{L}$  de disolución de hidrogel sobre una rejilla de TEM (rejilla de cobre, 3 mm, 300 mesh, recubrimiento de Formvar) durante dos minutos. El exceso de disolución se seca con papel de filtro. A continuación se lleva a cabo una tinción mediante la deposición de ácido fosfotungsténico 1% p/v durante dos minutos, y se elimina el exceso con 20  $\mu\text{L}$  de agua. Las rejillas de cobre se han observado mediante un microscopio TEM HITACHI H-600 a 100 kV. Las imágenes se han registrado mediante una cámara CCD Mako y se han procesado mediante micrografía digital (ImBioTEM).

5.6.5.6. HRMS

Hidrogelante 1

a)



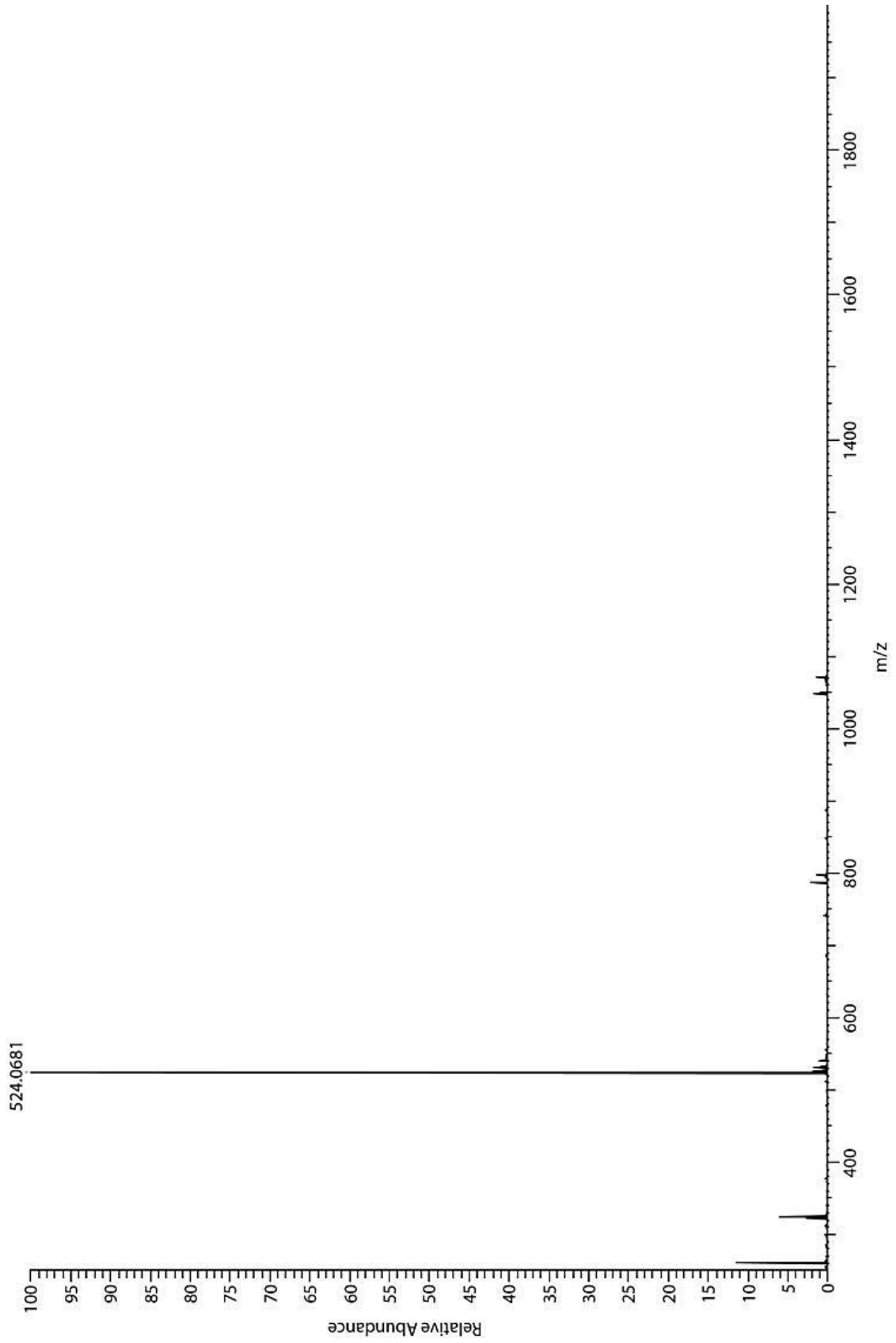


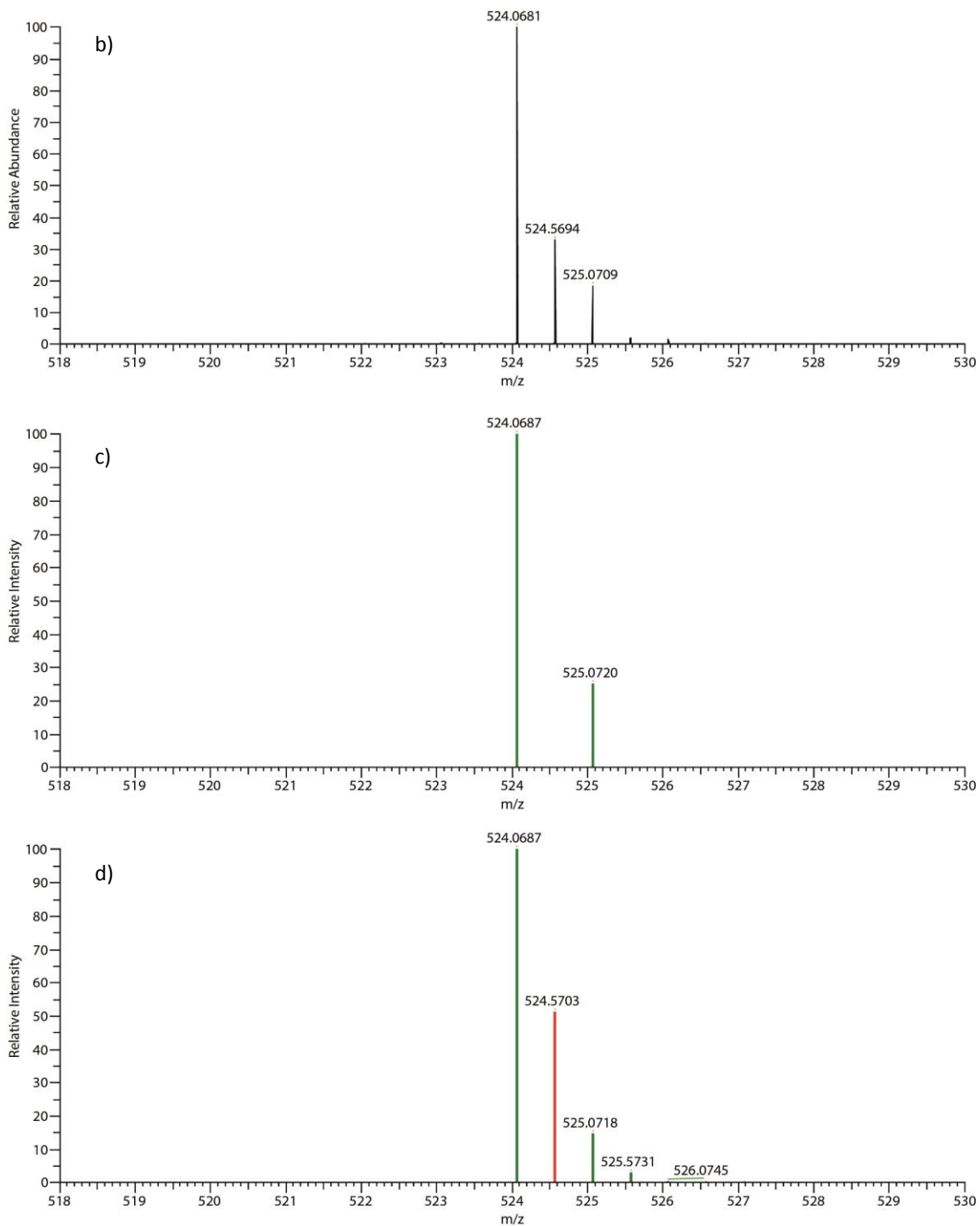
**Figura E5.2.** a) Espectro (-)HRMS completo de **1**. b) Ampliación del espectro con un pico a 433.0788 m/z correspondiente a las especies  $[M - H]^-$  y  $[2M - 2H]^{2-}$ . c) Patrón isotópico calculado de  $[M - H]^-$ . d) Patrón isotópico calculado de  $[2M - 2H]^{2-}$ .



Hidrogelante 2

a)

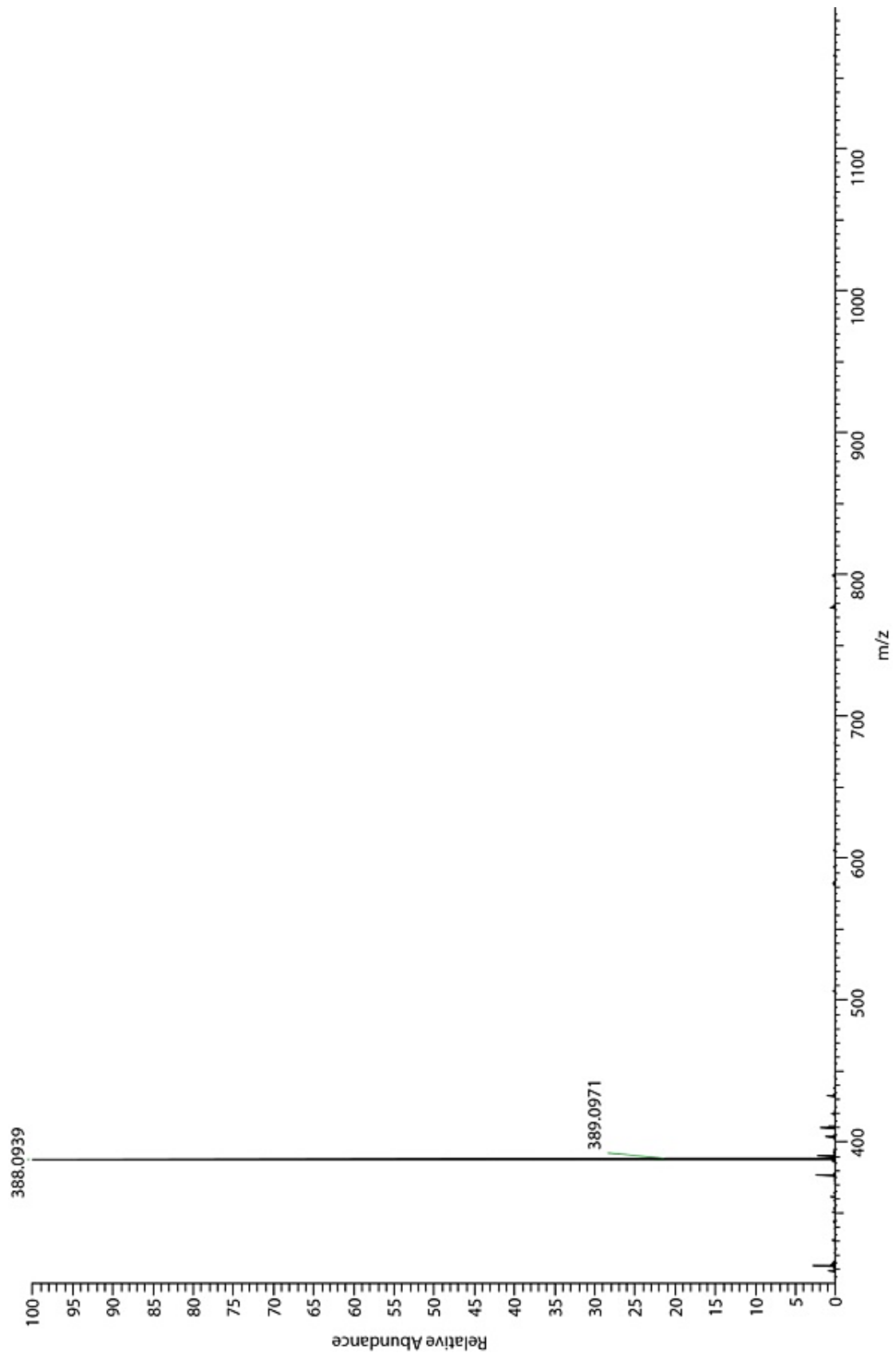


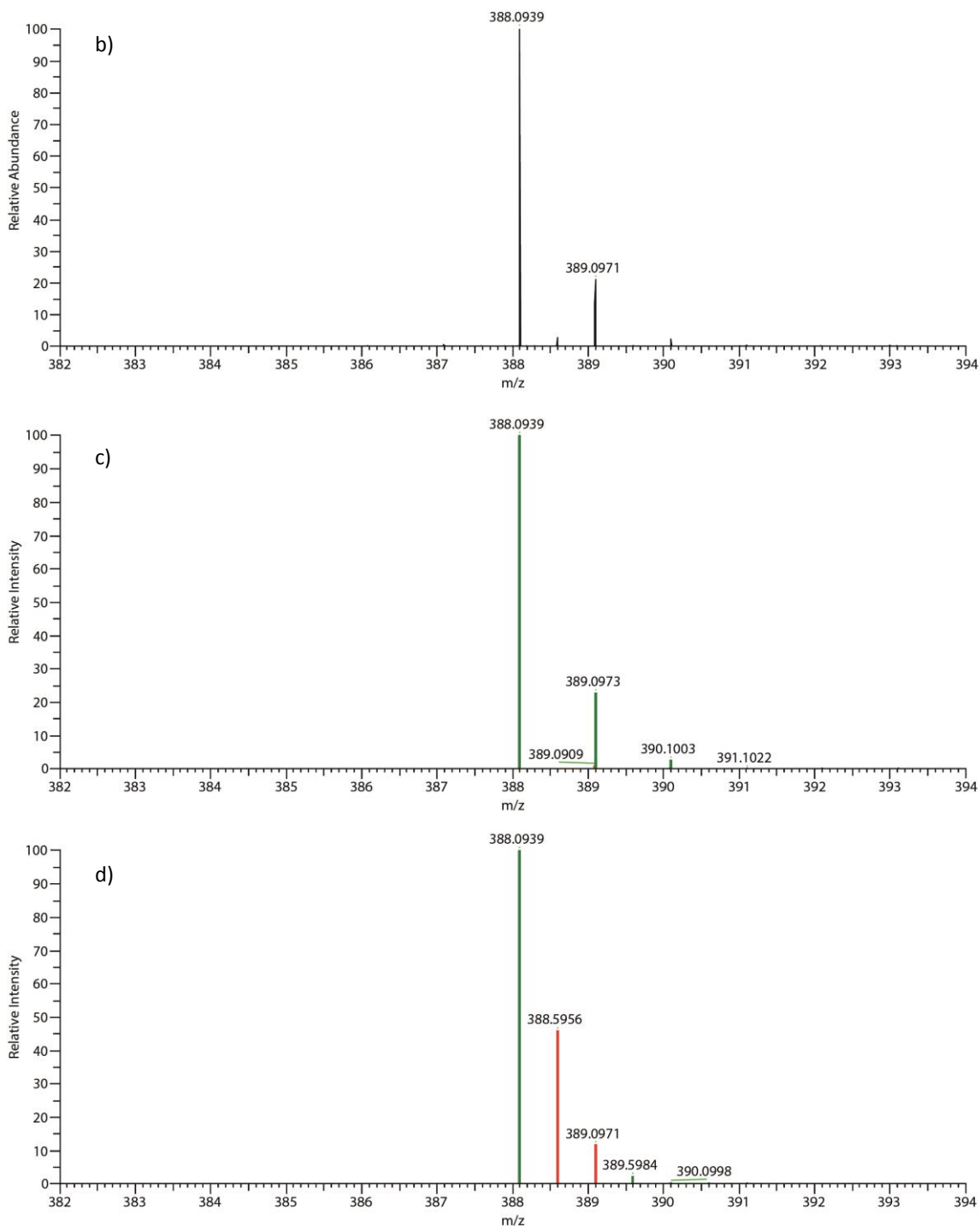


**Figura E5.3.** a) Espectro (-)HRMS completo de **2**. b) Ampliación del espectro con un pico a 524.0681 m/z correspondiente a las especies  $[M - H]^-$  y  $[2M - 2H]^{2-}$ . c) Patrón isotópico calculado de  $[M - H]^-$ . d) Patrón isotópico calculado de  $[2M - 2H]^{2-}$ .

Hidrogelante 3

a)





**Figura E5.4.** a) Espectro (-)HRMS completo de **3**. b) Ampliación del espectro con un pico a 388.0939 m/z correspondiente a las especies  $[M - H]^-$  y  $[2M - 2H]^{2-}$ . c) Patrón isotópico calculado de  $[M - H]^-$ . d) Patrón isotópico calculado de  $[2M - 2H]^{2-}$ .

### 5.6.6. Estudio de agregación por Static Light Scattering (SLS)

El proceso de agregación de **1** y **2** se ha estudiado a pH 7 mediante SLS. Se han preparado disoluciones de **1** en el rango de  $1.5 \times 10^{-2}$  % p/v ( $3.45 \times 10^{-4}$  M) a  $8 \times 10^{-5}$  % p/v ( $1.84 \times 10^{-6}$  M), y de **2** desde 0.01 % p/v ( $1.87 \times 10^{-4}$  M) a  $4 \times 10^{-4}$  % p/v ( $7.47 \times 10^{-6}$  M) de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 5.6.4. Las medidas de SLS se han llevado a cabo mediante un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). La longitud de onda del láser ha sido de 633 nm y el ángulo de dispersión de 90°. El estándar utilizado ha sido tolueno. Las medidas tanto del estándar como de las muestras se han registrado en cubetas de cuarzo mediante 15 repeticiones a 25°C, con un tiempo de estabilización previo a la medida de 120 segundos. Las medidas se han tomado por triplicado. El valor de CAC se ha obtenido a partir de la intersección entre las líneas dibujadas por los puntos correspondientes a los estados agregado y no agregado.

### 5.6.7. Estudio de agregación por espectroscopia de absorción en UV-vis

Se han preparado series de diluciones de **1** y **2** desde  $5 \times 10^{-3}$  M hasta  $1 \times 10^{-6}$  M a pH 7 de acuerdo al procedimiento explicado en la Sección 5.6.4. El espectro de absorción en UV-vis se ha registrado a 25°C en un espectrofotómetro Agilent Cary 60 utilizando cubetas de cuarzo y una longitud de paso óptico de 1 cm para muestras hasta  $4.7 \times 10^{-5}$  M. Para muestras más concentradas se ha equipado el instrumento con un accesorio TrayCell (Hellma Analytics) comprendido por una celda de medida con fibra óptica y diferentes cabezales con espejos integrados con pasos ópticos de 0.1, 0.05 y 0.01 cm. Así, se han depositado 10  $\mu$ L de cada muestra en la celda de medida y se ha cubierto con el cabezal apropiado dependiendo de cada concentración. Todas las lecturas de absorbancia se han transformado a coeficientes de extinción molar y se han representado juntos para llevar a cabo el estudio de agregación.

El proceso de agregación de **1** se ha evaluado a partir de la variación observada en la banda de menor energía que aparece a 388 nm, que se corresponde a la transición 0-0. Los datos obtenidos se han ajustado a un modelo de agregación isodésmico mediante el software ProFit (v8.0), a partir de las expresiones siguientes.<sup>191</sup>

$$\varepsilon_{0-0} = [(\varepsilon_{0-0})_{min} - (\varepsilon_{0-0})_{max}] \left( \frac{2Kc_0 + 1 - \sqrt{4Kc_0 + 1}}{2K^2c_0^2} \right) + (\varepsilon_{0-0})_{max}$$

$$\alpha_{agr} = 1 - \frac{2Kc_0 + 1 - \sqrt{4Kc_0 + 1}}{2K^2c_0^2} = \frac{\varepsilon_{0-0} - (\varepsilon_{0-0})_{max}}{(\varepsilon_{0-0})_{min} - (\varepsilon_{0-0})_{max}}$$

<sup>191</sup> J. Gershberg, F. Fennel, T. H. Rehm, S. Lochbrunner, F. Würthner. *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 1729-1737

## Capítulo 5

Donde  $\varepsilon_{0-0}$ : coeficiente de extinción molar a cada concentración

$(\varepsilon_{0-0})_{min}$ : coeficiente de extinción molar a concentración más baja (monómero)

$(\varepsilon_{0-0})_{max}$ : coeficiente de extinción molar a concentración más alta (agregados)

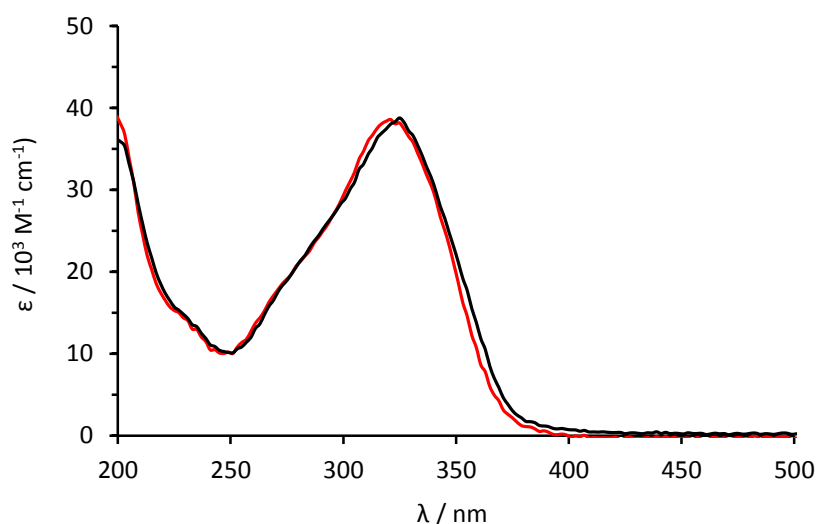
$K$ : constante de agregación

$c_0$ : concentración de **1**

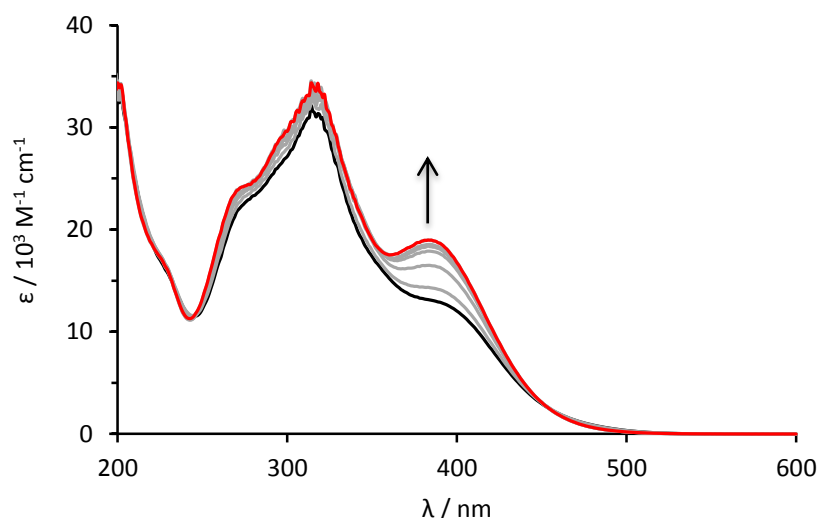
$\alpha_{agr}$ : fracción molar de la especie agregada.

En el caso de **2** no se han apreciado cambios en el espectro.

Para estudiar la evolución del proceso de agregación con la temperatura, se ha registrado el espectro de UV de una disolución de **1** 0.04 % p/v (0.93 mM) desde 25°C a 60°C en una cubeta de cuarzo. La temperatura se ha establecido mediante un accesorio Cary Single Cell Peltier (Agilent). Con el fin de estabilizar la temperatura, las muestras se han mantenido a cada temperatura durante 10 minutos antes de registrar el espectro.



**Figura E5.5.** Espectro de UV-vis de **2** desde 0.1 % p/v ( $2.0 \times 10^{-3}$  M) a 0.0005 % p/v ( $1.0 \times 10^{-5}$  M).



**Figura E5.6.** Espectro de UV-vis de **1** (0.04 % p/v, 0.93 mM) registrado desde 25 a 60°C.

### 5.6.8. Calorimetría diferencial de barrido

Se han introducido 300  $\mu\text{L}$  (0.25 % p/v, 5.76 mM) en la celda de un Nano DSC (TA Instruments). La muestra se ha estabilizado a 25°C durante 20 minutos. Las adquisiciones de DSC se han registrado desde 20 hasta 90°C y de 90 a 25°C con un ratio de 0.5°C/min. La línea base se ha registrado con agua. El mismo procedimiento se ha llevado a cabo con **2A**, dando lugar a una línea plana.

### 5.6.9. Citotoxicidad

Los estudios de citotoxicidad los ha realizado Guillem Ramis, del Departamento de Biología Fundamental de la Universidad de las Islas Baleares.

Cultivo celular: células U87MG, regalo de Joan Seoane (Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona). Las células U87MG se han cultivado subconfluentemente y pasado, llevando a cabo test de rutina para evaluar contaminación por micoplasma, y test morfológicos, así como análisis de las curvas de crecimiento a modo de control de calidad. Las células se han cultivado en DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) mediante suplementación con suero fetal de ternera (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un incubador húmedo a 37°C con un 5% de  $\text{CO}_2$ .

Medidas de viabilidad celular: el número de células viables en el cultivo se ha determinado mediante la cuantificación de ATP, derivado de las células metabólicamente activas, utilizando un kit de ensayo luminiscente Cell Titer-Glo (Promega, Madison, WI).

Siguiendo las instrucciones del fabricante, 5000 células se han sembrado en placas de 96 pocillos y tratado 24 horas después, para finalizar con la adición del reactivo Cell Titer-Glo. La luminiscencia se ha detectado utilizando un espectrofotómetro multi-pocillo Synergy Mx (Biotek, Winooski, VT).

### 5.6.10. Encogimiento de hidrogeles inducido por la adición de sales

#### 5.6.10.1. Evaluación cualitativa del encogimiento

Se ha preparado una serie de hidrogeles (0.5 mL, vial de 2 mL) con una concentración de **1** de 0.6% p/v o de **2** de 1.8% p/v de acuerdo al procedimiento detallado en la Sección 5.6.4. Después de haberse llevado a cabo el proceso de gelificación, se han adicionado 100 µL de una disolución de las siguientes sales: NaCl, Et<sub>4</sub>NCl, NaOAc, Me<sub>4</sub>NOAc, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub> o cloruro de acetilcolina). Tras la adición, la proporción molar de sal frente a la cantidad de **1** ha sido de X:1, donde X = 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 5. Los cambios se han evaluado ocularmente y mediante el test de inversión tras 18 horas.

**1A** sufre un proceso de encogimiento con todas las sales. En las mismas condiciones, el hidrogel **2A** no sufre ningún tipo de cambio.

**Tabla E5.3.** Efecto cualitativo de la adición de diferentes sales sobre **1A**.

mM	[sal]	NaCl	Et <sub>4</sub> NCl	NaOAc	Me <sub>4</sub> NOAc	NaHCO <sub>3</sub>	MgCl <sub>2</sub>	AcCol
	sal:1							
1,4	0.1:1	gel	gel	gel	gel	gel	gel	gel
2,8	0.2:1	gel	gel	gel	gel*	gel	gel	gel*
6,9	0.5:1	gel	gel*	gel*	sh	gel	sh*	sh
13,8	1:01	gel*	sh	sh	sh	gel	sh*	sh
27,6	2:01	sh	sh	sh	sh	gel*	sh*	sh
69	5:01	sh	sh	sh	sh	sh	sh*	sh

AcCol: cloruro de acetilcolina. Gel: la mezcla supera el test de inversión. Gel\*: el hidrogel presenta una apariencia más compacta. sh: el gel se encoge. sh\*: el gel se encoge de forma poco significativa.



#### 5.6.10.2. Cuantificación del encogimiento

Se ha preparado una serie de diluciones de **1** (0.5 mL en viales de 2 mL) siguiendo el procedimiento especificado en la Sección 5.6.4. Tras el proceso de gelificación se han adicionado 50  $\mu$ L de una disolución salina (NaCl, Et<sub>4</sub>NCl o NaOAc) 0.55 M. La cantidad de agua liberada tras el proceso de encogimiento se ha medido volumétricamente mediante una jeringa (Hamilton, 500  $\mu$ L). La concentración final de la sal ha sido de 50 mM y el encogimiento se ha considerado completado tras 24 horas. Sin embargo, los volúmenes obtenidos tras 4 horas apenas difieren de los medidos al final.

#### 5.6.11. Reología

Los experimentos de reología se han llevado a cabo a 25 °C en un analizador mecánico dinámico (DMA Q800, TA) en modo compresión con una geometría de platos paralelos (diámetro: 15 mm). La región lineal viscoelástica (LVR) de los hidrogeles se ha determinado mediante test de barrido de frecuencia (0.1-100 Hz) y barrido de deformación (1-100%). De acuerdo al LVR obtenido, los módulos de almacenamiento  $G'$  y de pérdida  $G''$  se han determinado a una frecuencia de 1 Hz y una deformación de un 1%.

Para evaluar el comportamiento tixotrópico de **1A** (2% p/v), se han aplicado cuatro ciclos de bajo (0.1, 6 min) y alto (15%, 90 seg.) porcentaje de deformación a una frecuencia de 1 Hz. Este incremento del porcentaje de deformación se ha llevado a cabo paulatinamente (120 s) y no súbitamente para evitar el colapso de la muestra.

El estudio de la variación de las constantes reológicas tras el proceso de encogimiento se ha llevado a cabo adicionando una disolución de NaCl sobre una muestra de **1A** (1 % p/v; 2.3 mM), para dar lugar a una mezcla que contiene dos equivalentes de NaCl (4.6 mM). Tras 24 horas, se ha llevado a cabo un barrido de frecuencias aplicando un 1% de deformación.

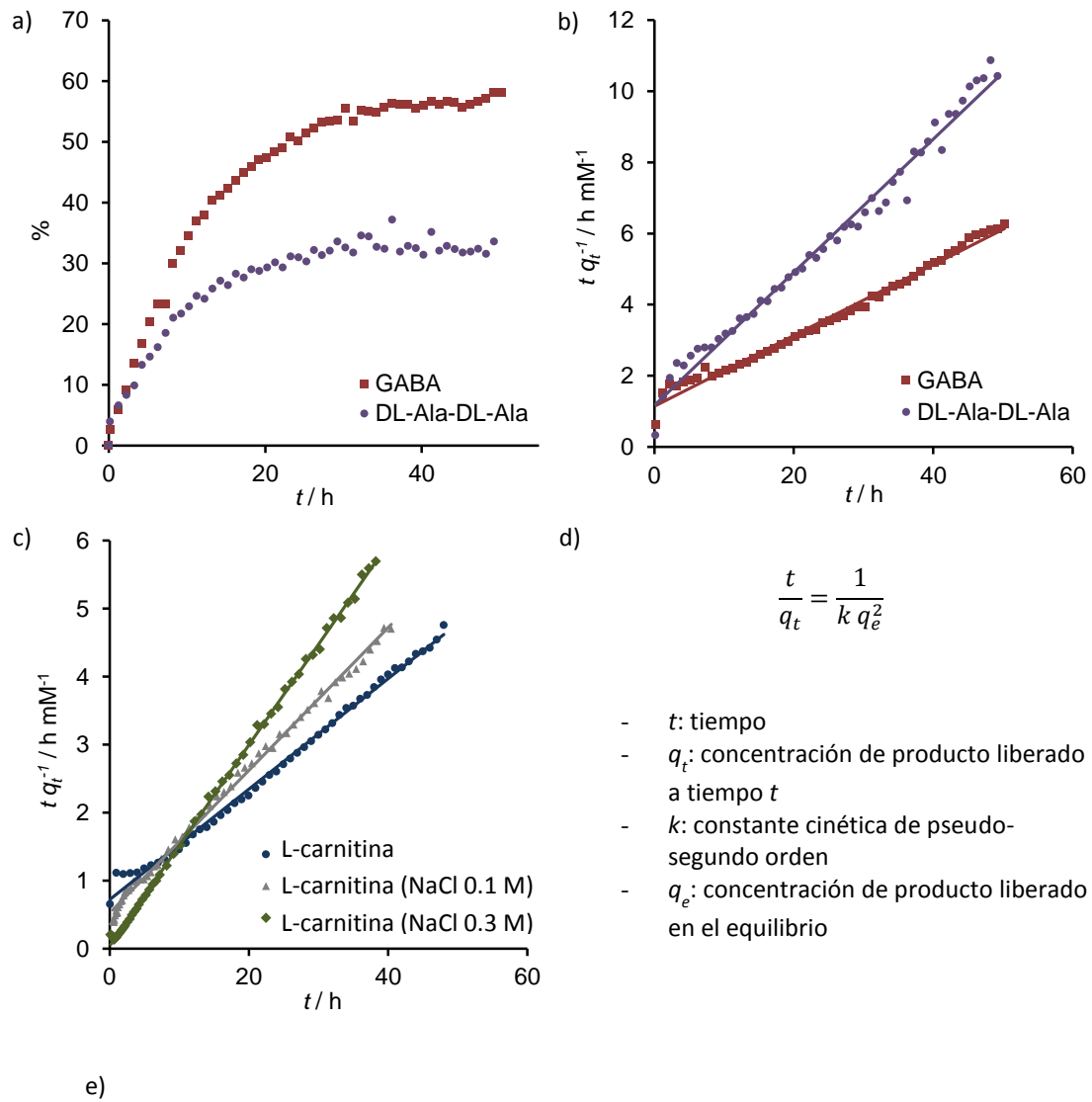
#### 5.6.12. Preparación de hidrogeles cargados

La preparación de hidrogeles cargados se ha llevado a cabo siguiendo un procedimiento similar al especificado en la Sección 5.6.4. En este caso, se ha adicionado una disolución del producto a cargar sobre la disolución de hidrogelante antes de llevar a cabo el ajuste de pH. A continuación, se ha ajustado el pH y el volumen final (pH 7, 0.6 % p/v de **1**; 13.8 mM) y se ha calentado y enfriado la mezcla de la manera habitual.

La liberación del producto cargado en el hidrogel se ha analizado mediante <sup>1</sup>H RMN. La disolución de la biomolécula objeto de estudio se ha llevado a cabo en agua con un 10% de

D<sub>2</sub>O, y se ha añadido dioxano como estándar interno (1.0 mM). Una vez que el proceso de calentado se ha completado, se han transferido 0.1 mL de la mezcla de hidrogel cargado aún caliente a un tubo de RMN caliente utilizando una jeringa Hamilton con una punta larga acoplada, de manera que el prohidrogel se deposite únicamente en la parte inferior del tubo de RMN. A continuación, el tubo se ha dejado enfriar a temperatura ambiente. Para evaluar la capacidad de liberación del hidrogel, se han adicionado 0.5 mL de agua (10% D<sub>2</sub>O y 1 mM de dioxano) y se ha monitorizado la concentración del producto en disolución a partir de las integrales de los picos de <sup>1</sup>H RMN correspondientes.

Para evaluar el efecto producido por la presencia de sales en la cinética del proceso de liberación de la carga, se han adicionado 0.5 mL de una disolución de NaCl (0.1 y 0.3 mM) en lugar del agua. Los datos experimentales se han ajustado a un modelo de pseudo-segundo orden.



Zwitterión	Modelo cinético de pseudo-segundo orden		
	$q_e$ (mM)	$k$ ( $\text{mM}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
L-Carnitina	12.30	$9.17 \times 10^{-3}$	0.9955
L-Carnitina (NaCl 0.1 M)	9.52	$2.11 \times 10^{-2}$	0.9965
L-Carnitina (NaCl 0.3 M)	6.77	$5.67 \times 10^{-1}$	0.9992
GABA	10.05	$8.65 \times 10^{-3}$	0.9881
DL-Ala-DL-Ala	5.34	$3.00 \times 10^{-2}$	0.9847

**Figura E5.7.** a) Porcentaje de GABA y DL-Ala-DL-Ala liberado por **1A** en función del tiempo. b, c) Cinética de liberación de acuerdo a un modelo de pseudo-segundo orden (d) de varios zwitteriones bajo diferentes concentraciones de NaCl, y sus correspondientes constantes cinéticas (e).



## ***Conclusiones***



## Conclusiones

El desarrollo de moléculas que sirvan de base para el desarrollo de estructuras supramoleculares y su potencial aplicación como materiales resulta fundamental. En esta Memoria se han estudiado los ácidos escuarámicos, un tipo de derivados del ácido escuárico muy poco conocidos hasta el momento. Así, se ha descrito la síntesis y caracterización de estos compuestos y se ha explorado su uso como unidad clave para la adsorción sobre superficies metálicas, para llevar a cabo reconocimiento molecular de zwitteriones y para la formación de hidrogeles.

En el Capítulo 2 se ha desarrollado un método de síntesis efectivo y versátil asistido por microondas de ácidos escuarámicos derivados de aminas alifáticas y aromáticas, con un amplio abanico de sustituyentes. Además se han caracterizado las constantes de ionización de estos compuestos, observándose una acidez del hidrógeno escuarámico comparable a la del ácido escuárico precursor. Por otra parte, los hidrógenos escuaramídicos presentan un descenso significativo en su correspondiente  $pK_a$  de ionización.

En el Capítulo 3 se ha perfeccionado un método para la quimisorción de ácidos escuarámicos de cadena larga sobre la superficie de aluminio. La caracterización de la capa molecular formada se ha llevado a cabo mediante una gran variedad de técnicas. A partir de las medidas de ángulo de contacto se ha demostrado la hidrofobicidad del recubrimiento formado, comparable a la que aportan ácidos carboxílicos de igual longitud de cadena. La aromaticidad del grupo escuaramato permite el seguimiento del proceso de quimisorción mediante espectroscopia de reflectancia en UV-vis, una técnica muy poco utilizada para este tipo de estudios. A partir de los datos obtenidos se ha demostrado que los ácidos escuarámicos presentan una mayor resistencia a la desorción por inmersión en isopropanol que los ácidos carboxílicos.

En el Capítulo 4, a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 2, se ha llevado a cabo el diseño de un receptor de base escuaramato-escuaramida para el reconocimiento de miltefosina, un fármaco zwitteriónico. Así, el receptor es capaz de interactuar con el grupo fosfato mediante el centro arilescuaramídico, a la vez que establece un par iónico con la amina cuaternaria mediante el grupo escuaramato. Este grupo, utilizado por primera vez como parte activa de un receptor, a su vez ejerce de “guardameta”, impidiendo en gran medida la interacción con aniones competentes como los haluros.

En el Capítulo 5 se ha estudiado la formación de hidrogeles a partir de compuestos basados en la combinación de las unidades escuaramida y escuaramato estudiadas en el Capítulo 4. La introducción de los grupos  $-NO_2$  y  $-CF_3$  inducen marcadas diferencias en las concentraciones de gelificación críticas y en la estabilidad térmica de los hidrogeles resultantes, así como en la morfología de las fibras que los componen. El hidrogel

## *Conclusiones*

nitroderivado es tixotrópico, inyectable y termoreversible, y da lugar a un proceso de encogimiento en medios salinos. Además, permite la incorporación de moléculas zwitteriónicas en su interior, que pueden liberarse al medio de forma lenta y controlada.





