

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química
(UPV-CSIC)



**NUEVAS SONDAS FOTOACTIVAS PARA EL ESTUDIO
DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES BASADOS EN
ÁCIDOS BILIARES**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Miguel Gómez Mendoza

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. M^a Luisa Marín García

Valencia 2013

D. Miguel Ángel Miranda Alonso, Catedrático de la Universitat Politècnica de València y Dña. M^a Luisa Marín García, Profesora Titular de la Universitat Politècnica de València,

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Nuevas sondas fotoactivas para el estudio de sistemas supramoleculares basados en ácidos biliares**” ha sido desarrollada por Miguel Gómez Mendoza, bajo su dirección, en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València.

Miguel A. Miranda Alonso

M^a Luisa Marín García

Lo que necesitamos es imaginación, pero imaginación encorsetada en una terrible camisa de fuerza que es el conocimiento.

Richard Feynman

A mis padres, hermanos y a Libertad

Agradecimientos

La vida es una sucesión de vivencias positivas y negativas en las que de cada detalle aprendemos y evolucionamos como personas. A lo largo de estos años he aprendido a conocerme mejor a mí mismo, a conocer mis límites y a valorar cada momento. A lo largo de estos años, he conocido a muchos compañeros, algunos de los cuales ya son amigos. Quiero agradecer en estas líneas a todas las personas que me han apoyado durante estos años.

En primera instancia, quiero agradecer a mis directores de tesis, el profesor Miguel A. Miranda Alonso y la Dra. María Luisa Marín García, por la oportunidad que me dieron en esta gran familia que es el ITQ. Siempre les estaré agradecido por la ayuda diaria y los medios facilitados para formarme en esta dura pero gratificante profesión.

Quiero agradecer al Ministerio de educación, cultura y deporte, la concesión de una beca FPU disfrutada durante esta etapa, así como las ayudas para la realización de una estancia en el extranjero.

En especial, quiero agradecer todo el esfuerzo que no sólo durante la etapa de la tesis doctoral, sino durante toda mi vida, han dedicado para apoyarme y ayudarme en momentos difíciles personales y profesionales, hablo, como no podía ser de otra manera, de mis padres y hermanos. Gracias por vuestro esfuerzo y lucha diaria en formarme como persona. Gracias a mi querido sobrino, que con sólo 4 años de vida ya me ha enseñado que con una sonrisa, la vida se lleva mucho mejor. Gracias a toda mi familia.

Quiero agradecer a mis amigos todos los consejos y apoyo durante los momentos duros que he tenido que pasar. En este apartado, agradezco en especial a Jesús Pastor, Toni Viñas y Carlos Pont una maravillosa amistad que nos une como a hermanos. También tengo un gran recuerdo de María L., Noelia, Clara y Bego. No puedo olvidar a los amigos que me acompañaron en Bristol, gracias a Diego, Verónica, Zaída, Thomas, Hennie, Tiddo, Marcos, Patricia, Alvaro, Nieves, Antonio M., Francesco, Laura, Beatriz V., Charley, James, Lydia y al Prof. Anthony Davis. Gracias por los bellos momentos, las risas, los viajes compartidos y la comprensión que me habéis ofrecido.

Quiero agradecer a mis compañeros de grupo su apoyo, consejos y en ocasiones, sus críticas positivas, que me han permitido evolucionar como lo ha hecho esta Tesis a lo largo de estos años. En especial, agradezco a José Ramón Cabrero Antonino la amistad que nos une, una amistad que abarca ya la década y en donde codo con codo hemos ido superando etapas y objetivos. También quiero agradecer a Vicky, Paula M., Gema, Alejandro, Carla, Chema, Francesca y Mireia los buenos ratos compartidos y el apoyo ofrecido. No me olvido de Santi, un gran amigo para siempre. A todos vosotros esta dedicada esta tesis.

Quiero recordar a todos los compañeros del grupo de fotoquímica que he tenido el placer de conocer: Virginie, Chelo C., Inma, Paco, Giacomo, Faber, Sara S., José, Eduarne, Magda, Patri, Sonia, Fifi, Antonio, Maya, Luis, Jana, Froso, Ceci, Alessandra, Pierre, Cleo, Francesco, Ana M^a, Sara y Hannes; así como los compañeros del departamento: Chelo J., Susana, Raúl, Dani, Neus, Nacho, Carlos, Rafa, Pavel, Paula B., Rosa y Dolors.

No me puedo olvidar de Tiziana, Saray, Abdessamad, Tania, Carmina, Victoria, Juan, Estefanía, Karen, Fran G., Amparo, Belén, Tatiana, Raquel N., Raquel S., Beatriz H., María B., Ada, Carmentxu, Angela, Paula R., y un largo etc.

En definitiva, quiero agradecer a cada uno de mis compañeros del ITQ los buenos y/o malos momentos que hemos pasado. Me llevo un gran recuerdo de todos, del primero al último, y os deseo lo mejor en vuestras carreras profesionales y personales.

Quiero agradecer el apoyo de compañeros que he conocido durante los congresos y cursos asistidos, los cuales muchos de ellos son amigos hoy en día. En especial me llevo un gran recuerdo de Eliana, Liliana, Guissi, Cinzia, Rosa Adam, Alicia, Nacho y Salva.

Por último, quería agradecer y dedicar esta tesis doctoral a una persona muy especial, que me ha hecho sentir lo que significa ser libre, y en donde, cada día, a su lado, es un sueño hecho realidad. Gracias Libertad porque sin tu apoyo no habría llegado hasta el final. A partir de ahora somos uno, pues eres la luna que mueve la marea de mis sentimientos y la estrella que me guía a querer ser mejor persona. Esta tesis, al igual que mi corazón, también es tuya; gracias por este maravilloso camino que recorreremos juntos y gracias por haber cambiado mi vida. ¡Gracias a todos!

Abreviaturas y símbolos

A	Absorción
AB	Ácido biliar
AcTrpMe	Metil ester del N-acetil-triptófano
CA	Ácido cólico
CDCA	Acido quenodesoxicólico
Ch	Colesterol
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
cmc	Concentración micelar crítica
DCA	Acido desoxicólico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIEA	N,N-diisopropil-N-etilamina
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dns-Cl	Cloruro de dansilo
Dns-Gly	Dansilglicina
δ	Desplazamiento químico
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
E_s	Energía de singlete
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
ϕ_T	Rendimiento cuántico de triplete
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
J	Constante de acoplamiento
k_q	Constante de desactivación
k_q^S	Constante de desactivación de singlete
k_q^T	Constante de desactivación de triplete
KP	Ketoprofeno
L	Lecitina

LCA	Acido litocólico
λ	Longitud de onda
MM	Micelas mixtas
NaCA	Colato sódico
NaCDCA	Quenodesoxicolato sódico
NaDCA	Desoxicolato sódico
NaGCA	Glicocolato sódico
NaGCDCA	Glicoquenodesoxicolato sódico
NaTCA	Taurocolato sódico
NaTCDCA	Tauroquenodesoxicolato sódico
NaUDCA	Ursodesoxicolato sódico
NPX	Naproxeno
NPXMe	Éster metílico del naproxeno
P	Fosforescencia
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RP-18	LiChropep® RP-18
RV	Relajación vibracional
S	Singlete
SB	Sal biliar
SiO₂	Sílica gel 60
τ_F	Tiempo de vida de fluorescencia
τ_T	Tiempo de vida de triplete
T	Triplete
TE	Transferencia de energía
Te	Transferencia electrónica
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
Trp	Triptófano
TrpMe	Ester metílico del triptófano

ua	Unidades arbitrarias
UDCA	Ácido ursodesoxicólico
UV-Vis	Ultravioleta visible
4-Pr-Py	4-Pirrolidinopiridina

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Ácidos biliares: Estructura química	3
1.2. Biosíntesis de los ácidos biliares	4
1.3. Funciones de los ácidos biliares	6
1.4. Circulación enterohepática	6
1.5. Sistemas supramoleculares basados en ácidos biliares	8
1.5.1. Agregados de sales biliares	9
1.5.2. Vesículas	13
1.5.3. Micelas Mixtas	16
1.6. Resumen de conceptos fotofísicos y fotoquímicos generales	19
1.7. Análisis de la situación	25
Capítulo 2. Objetivos / Aims	29
Capítulo 3. Síntesis de derivados fotoactivos de ácido cólico y colesterol	33
3.1. Introducción	35
3.2. Derivados de ácido cólico y colesterol incorporando el cromóforo dansilo	38
3.2.1. Derivados de ácido cólico: 3α- , 3β- y 7α-Dns-CA	38
3.2.2. Derivados de colesterol: Dns-Ch	39
3.3. Derivados de ácido cólico y colesterol incorporando el cromóforo naproxeno	40
3.3.1. Derivados de ácido cólico: (R)-NPX-CA y (S)-NPX-CA	40
3.3.2. Derivados de colesterol: (R)-NPX-Ch y (S)-NPX-Ch	41
3.4. Derivados de ácido cólico incorporando el cromóforo triptófano	42
3.5. Derivados de ácido cólico incorporando el cromóforo ketoprofeno	45
3.6. Método experimental	46
3.6.1. Instrumentación	46
3.6.2. Síntesis	46
3.6.2.1. Síntesis de Dns-Ch	47

3.6.2.2. Síntesis de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-NPX-CAMe	49
3.6.2.3. Síntesis de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-NPX-CA	52
3.6.2.4. Síntesis de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-NPX-Ch	56
3.6.2.5. Síntesis de 3 β -Dns-CA-TrpMe	60
3.6.2.6. Síntesis de 3 β -Dns-CA-Trp	63
3.6.2.7. Síntesis de 7 α -Dns-CA-TrpMe	66
3.6.2.8. Síntesis de CA-TrpMe	69
3.6.2.9. Síntesis de CA-Trp	71
3.6.2.10. Síntesis de Dns-TrpMe	73
3.6.2.11. Síntesis de 3 α - y 3 β -(<i>S</i>)-KP-CAMe	75
3.6.2.12. Síntesis de 3 α - y 3 β -(<i>S</i>)-KP-CA	78
3.7. Conclusiones	82

Capítulo 4. Dansil derivados de ácido cólico empleados como herramientas para construir el diagrama de especiación de la agregación de sales biliares 83

4.1. Introducción	85
4.2. Resultados y discusión	88
4.2.1. Propiedades fotofísicas de los derivados de dansilo en disolución	88
4.2.2. Propiedades fotofísicas de los derivados de dansilo en presencia de sales biliares	89
4.3. Conclusiones	105
4.4. Método experimental	106

Capítulo 5. Nuevos compuestos fotoactivos como sondas para demostrar la incorporación de ácido cólico y colesterol en micelas mixtas 109

5.1. Introducción	111
5.2. Resultados y discusión	113
5.2.1. Caracterización física de las micelas mixtas	113

5.2.2. Estudios de fluorescencia	114
5.2.3. Estudios por fotólisis de destello láser	117
5.3. Conclusiones	119
5.4. Método experimental	120

Capítulo 6. Sondas fotofísicas para evaluar el potencial de los agregados de ácido cólico como transportadores de fármacos 121

6.1. Introducción	123
6.2. Resultados y discusión	125
6.2.1. Estudio de la desactivación de la fluorescencia en estado estacionario y tiempo resuelto	126
6.2.2. Estudio de la desactivación del triplete por fotólisis de destello láser	140
6.3. Conclusiones	147
6.4. Método experimental	148

Capítulo 7. Desactivación de fluorescencia en diferentes sistemas supramoleculares 149

7.1. Introducción	151
7.2. Resultados y discusión	153
7.2.1. Desactivación de la fluorescencia en derivados conteniendo el cromóforo triptófano	153
7.2.2. Desactivación de la fluorescencia en derivados conteniendo el cromóforo dansilo	161
7.2.3. Caracterización fotofísica de las nuevas sondas bidentadas dansilo-cólico-triptófano	163
7.2.4. Desactivación de la fluorescencia mediante anión yoduro de una sonda bidentada en diferentes sistemas supramoleculares	171
7.3. Conclusiones	178
7.4. Método experimental	179

Capítulo 8. Instrumentación	181
Capítulo 9. Referencias bibliográficas	185
Conclusiones generales / conclusions	197
Resúmenes	205
Contribuciones a congresos	217
Anexo: Publicaciones	221

Capítulo 1

Introducción

1.1 Ácidos biliares: Estructura química

Los ácidos biliares (ABs) son una familia de esteroides solubles en agua biosintetizados en los hepatocitos del hígado a partir del colesterol.^{1,2} Químicamente, los ABs poseen como estructura básica un sistema de anillos de pentanoperhidrofenantreno,³ con una fusión inusual *cis* entre los anillos A y B, dos metilos angulares, una cadena corta de cinco átomos de carbono con un grupo carboxilo terminal y un número variable de grupos hidroxilo en la cara α (**Figura 1.1**).

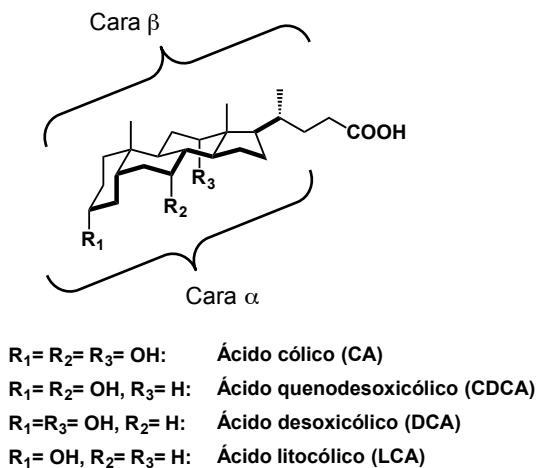


Figura 1.1. Estructura química de los ácidos biliares.

Como consecuencia de esta inusual estructura y de los grupos hidroxilo, los ABs exhiben anfifilia facial; así, su cara β convexa posee carácter hidrofóbico, mientras que la cara cóncava α muestra un carácter más hidrofílico.^{4,5} Por ello, en disolución acuosa, tienden a formar agregados que aumentan de tamaño con la concentración.

A pesar de que en disolución acuosa y a pH fisiológico se encuentran fundamentalmente en forma de sales, en la literatura aparecen nombrados más habitualmente como ácidos que como sales biliares (SBs). A lo largo de la presente Tesis Doctoral se utilizarán de forma indistinta ambas denominaciones.

1.2 Biosíntesis de los ácidos biliares

La síntesis completa de los ácidos biliares se produce en múltiples compartimentos intracelulares de los hepatocitos del hígado y en ella participan un gran número de enzimas.⁶ De forma esquemática se muestra en la **Figura 1.2**. Así, la síntesis de los ácidos biliares se inicia con la epimerización del grupo hidroxilo del colesterol en la posición 3β a la orientación α . A continuación, se produce una reducción del doble enlace entre C-5 y C-6, seguida de la hidroxilación del colesterol en las posiciones C-7 ó C-7 y C-12 por la acción de las enzimas 7α - y 12α -hidroxilasas.^{7,8} Posteriormente, se produce un acortamiento de la cadena lateral con formación de un grupo ácido carboxílico, dando lugar a la conversión del colesterol, una molécula insoluble en agua que forma parte de la membranas, a ácido biliar, una molécula anfifílica, soluble en agua a pH fisiológico y que actúa como detergente. Los productos finales son los ácidos cólico (CA) y quenodesoxicólico (CDCA).^{9,10} La distribución de estos dos ácidos biliares viene determinada por la actividad de la enzima 12α -hidroxilasa. Los productos intermedios de la reacción de reducción del doble enlace que interaccionan con ésta se convierten en CA, mientras que los que escapan a su acción se convertirán en CDCA. En general, estos dos productos (los ácidos biliares primarios) suponen alrededor del 80% del total en la bilis humana¹¹ y, aunque pueden permanecer en forma libre, en más de un 90% se conjugan a través de una unión peptídica con los aminoácidos glicina (~70%) y taurina (~20%).¹² La amidación con glicina reduce el pKa aproximadamente hasta un valor de 3,9 y con taurina a menos de la unidad,³ aumentando, por tanto, su solubilidad a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

Más adelante, en el colon, se produce el proceso de 7α -deshidroxilación, en el que se pierde el grupo OH en posición C-7 y además, los microorganismos del colon se encargan de eliminar la glicina y taurina de los ácidos biliares primarios para dar lugar a los correspondientes ácidos biliares secundarios, los ácidos desoxicólico (DCA) y litocólico (LCA), derivados del ácido cólico y quenodesoxicólico, respectivamente.

Generalmente, la cantidad de ácidos biliares secundarios representa alrededor del 20% del total. En menor proporción se encuentra el ácido ursodesoxicólico (UDCA), la forma epimérica 7 β - del ácido quenodesoxicólico. El UDCA se emplea en el tratamiento de la hepatitis crónica y en la disolución de piedras biliares.¹³⁻¹⁵

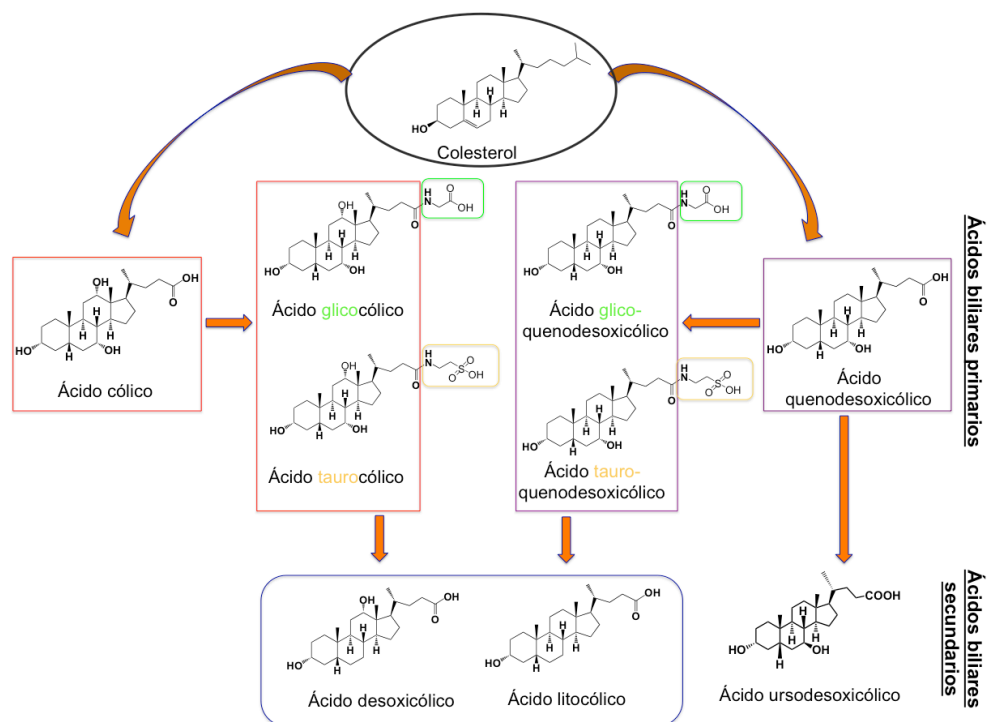


Figura 1.2. Esquema general de obtención de los ácidos biliares primarios y secundarios.

1.3 Funciones de los ácidos biliares

Los ácidos biliares juegan un papel importante en una gran variedad de funciones fisiológicas, incluyendo (i) la eliminación de colesterol mediante la conversión en ácidos biliares y su posterior excreción en las heces, (ii) transporte de lípidos durante la digestión a lo largo del tracto gastrointestinal,^{16,17} (iii) prevención de la precipitación del colesterol^{18,19} en la vesícula biliar, (iv) estimulación de fosfolípidos en secreciones biliares,^{1,2} (v) absorción intestinal de vitaminas liposolubles en las grasas como la A, D, K y E, (vi) aumento del poder de absorción del hierro, (vii) estimulante del peristaltismo intestinal, (viii) inhibición de la colinesterasa, aumentando las contracciones del intestino ó (ix) ligero agente bacteriostático, inhibiendo el excesivo crecimiento del colibacilo.

1.4 Circulación enterohepática

Las etapas más importantes de la circulación enterohepática de los ABs consisten en un proceso de secreción y recaptación, en donde se produce la secreción de los ABs desde el hígado a la vesícula biliar, de ésta al intestino delgado superior y, finalmente, su reabsorción en el epitelio del intestino delgado inferior hacia la sangre portal, regresando de nuevo al hígado, pudiendo tener lugar este proceso hasta diez veces al día (**Figura 1.3**).^{20,21}

Así, como se ha mencionado anteriormente, los ABs primarios se biosintetizan en los hepatocitos pericentrales del hígado a partir del colesterol,^{1,2} y éstos son los responsables de mantener la reserva de ABs en un adulto, entre 2 y 3 g, reemplazando con ello los 0,6 g perdidos diariamente en la excreción.

Antes de que los ABs primarios (CA y CDCA) sean secretados al canalículo son conjugados en los peroxisomas a través de un enlace amida con los aminoácidos glicina (Gly) o taurina (Tau) dando lugar a glico- y tauroconjugados, respectivamente.²² Este proceso aumenta la naturaleza anfipática de los ácidos biliares, facilitando su secreción.

A continuación, los ácidos biliares primarios glico y tauro-conjugados son secretados desde el hígado para entrar en los canalículos biliares y de éstos son conducidos a la vesícula biliar por la proteína exportadora de sales biliares,²³⁻²⁵ donde se almacenan para su uso futuro.

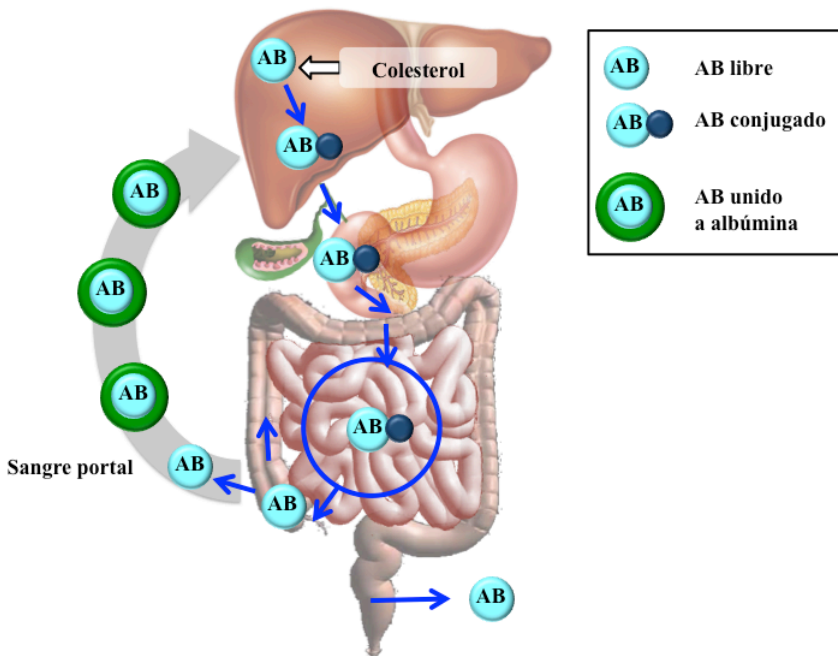


Figura 1.3. Representación esquemática de la circulación enterohepática.

La secreción de la bilis permite que los ABs conjugados pasen al tracto gastrointestinal, en donde en un gran porcentaje son absorbidos por difusión pasiva no iónica por las células endoteliales, principalmente mediante el mecanismo dependiente de sodio.²⁶ Una fracción menor no se reabsorbe en el intestino delgado y continúa hasta ser absorbidos en el íleon y desde allí, son transportados al colon, donde la acción de la enzima 7α -hidrolasa provoca la eliminación del OH en C-7 y se inicia un proceso de desconjugación dando lugar a los ácidos biliares secundarios (DCA y LCA). Estos ABs secundarios son lipofílicos y atraviesan el colon pasivamente por difusión, entrando al suministro de sangre para regresar a su vez al hígado a través de la circulación portal.

De hecho, hasta el 95% del total de ácidos biliares sintetizados por el hígado son absorbidos por el íleon y devueltos al hígado. Solamente una pequeña fracción no se reabsorben y continúan por el colon hasta ser eliminados en las heces. En la sangre, durante su viaje de vuelta al hígado, los ABs se encuentran fundamentalmente unidos a la albúmina sérica humana, o en menor grado, a lipoproteínas.²⁷ Posteriormente, en contacto con la membrana de los hepatocitos; los ABs se disocian de la albúmina o lipoproteína siendo introducidos en los mismos, e iniciando de nuevo el proceso de la circulación enterohepática.

1.5 Sistemas supramoleculares basados en ácidos biliares

La bilis está compuesta de agua, colesterol, fosfolípidos, pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina), iones bicarbonato y sales biliares, siendo éstas el componente mayoritario.^{28,29} Las sales biliares (SBs) participan activamente en la emulsión de las grasas y el transporte de lípidos¹⁶ mediante la formación de distintas estructuras supramoleculares. Así, son capaces de formar agregados por asociación de un número variable de moléculas entre sí, u otras estructuras más complejas en las que participan otras moléculas anfipáticas, como los fosfolípidos, el colesterol y los monoglicéridos, denominándose en este caso micelas mixtas.²⁸⁻³¹ Por otro lado, los fosfolípidos y el colesterol se asocian formando vesículas esféricas,^{30,32} que se caracterizan por presentar una bicapa de fosfolípido que favorece la captación de moléculas liposolubles, y en ocasiones, las vesículas pueden además contener un pequeño porcentaje de sales biliares. Estos tres sistemas son esenciales para lograr la solubilización del colesterol en el organismo.^{33,34}

Además, los sistemas supramoleculares basados en ácidos biliares han sido utilizados como receptores de varios tipos de huéspedes e iones. Debido a su esqueleto químico, constituyen un pilar importante en el estudio del reconocimiento molecular, de la química huésped-anfitrión y de la química biomimética.³⁵⁻³⁸ A continuación, se explicarán con más detalle tres de estos sistemas supramoleculares como son los agregados de ácidos biliares, las vesículas y las micelas mixtas.

1.5.1 Agregados de sales biliares

Tal como se ha comentado, los ácidos biliares (ABs) son una familia de esteroides naturales biosintetizados en el hígado a partir del colesterol^{1,2} que juegan un papel clave en diversas funciones fisiológicas siendo las más importantes el transporte de ácidos grasos para su posterior absorción en las células epiteliales intestinales, la solubilización y posterior excreción del colesterol y la estimulación de la secreción biliar de fosfolípidos.^{2,39} Además, son los principales productos finales del metabolismo del colesterol.

Los ácidos biliares se caracterizan por presentar una cara β convexa que posee carácter hidrofóbico y una cara cóncava α con carácter más hidrofílico.^{4,5} Este hecho provoca que tiendan a la autoasociación en el medio fisiológico cuando la concentración suficientemente supera la concentración micelar crítica (cmc),⁴⁰ dando lugar a la formación de agregados.^{3,22,41,42}

Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los últimos años, centrándose su estudio en los diferentes valores de concentración micelar crítica, cuyo análisis no resulta sencillo ya que, el concepto de cmc aplicado a las sales biliares no es aceptado universalmente. Así, mientras autores como Ekwall⁴³ sugieren un proceso de agregación de tres etapas con concentraciones críticas características, investigadores como Kratochvil⁴⁴ afirman que no existe una verdadera cmc, sino que la formación de agregados es progresiva.

Estas discrepancias nacen, en parte, de la diferente sensibilidad de las metodologías utilizadas para el estudio de la agregación de las SBs que incluyen la tensión superficial, la conductividad, dispersión de luz dinámica o fluorescencia.⁴⁵

Además, la cmc de los agregados de las sales biliares es sensible a variables como la temperatura,^{46,47} la fuerza iónica, o el pH del medio, siendo necesario controlar las variables en las condiciones experimentales utilizadas para su determinación. Por ejemplo, un valor de pH demasiado bajo, que no asegure la completa ionización del grupo carboxilo, conduce a la formación de geles.⁴⁸

La dificultad en la obtención de valores concordantes de cmc, ha provocado que durante los últimos 30 años, diferentes autores hayan propuesto diversas estructuras para explicar el comportamiento en la agregación de los ácidos biliares, algunas incluso claramente contrapuestas entre sí.

Actualmente, el modelo de agregación primario/secundario propuesto por Small³⁹ y sus colaboradores, basado en las diferencias observadas en el ensanchamiento de las señales en la parte hidrófoba e hidrófila por resonancia magnética nuclear, está comúnmente aceptado.^{2,39,49} Según este modelo, por asociación de 2 a 8 monómeros⁵⁰ se forman agregados primarios por la cara β apolar originando zonas hidrofóbicas.⁵ Al aumentar la concentración de sal biliar, estos agregados se unen por puentes de hidrógeno para dar lugar a agregados secundarios, que generan sitios hidrofílicos (**Figura 1.4**).^{5,20,21,51}

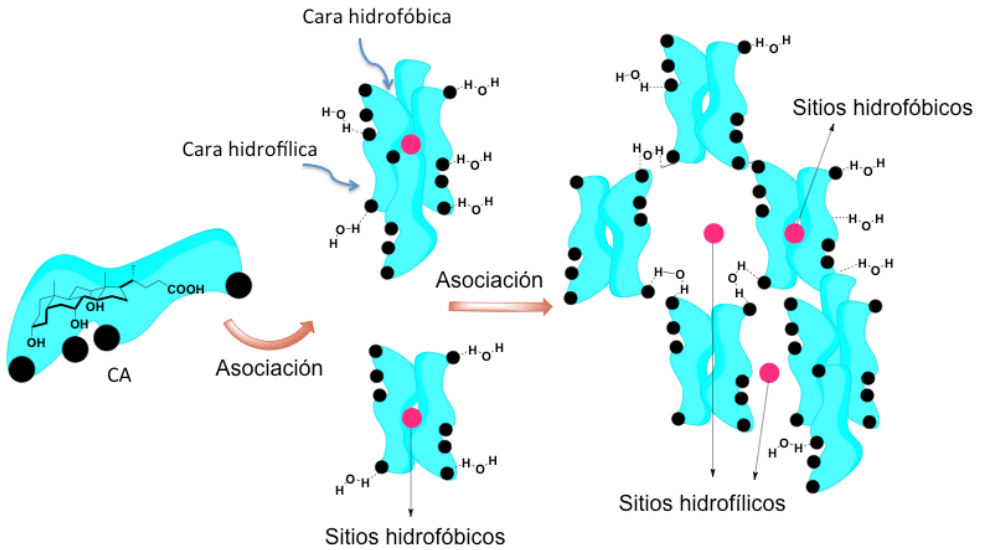


Figura 1.4. Representación esquemática de los agregados de ácido cílico (CA) según el modelo de Small.³⁹

Además, Kawamura⁵² y sus colaboradores propusieron mediante el estudio de medidas de resonancia de espín electrónico, que la interacción entre las caras β se realiza de manera que hace que los agregados tengan una forma de disco con la cara hidrofóbica orientada hacia el interior del agregado y la cara hidrofílica dirigida hacia el disolvente. Estudios de sondas fluorescentes incorporadas a los agregados corroboraron esta hipótesis.⁵³ Además, este modelo fue completado por Coello⁴⁵ y sus colaboradores, indicando que los componentes de los agregados se orientan alternativamente hacia arriba y hacia abajo, de manera que para un número de monómeros superior a 3, al menos dos grupos carboxílicos se orientan en la misma dirección (**Figura 1.5**), colocándose un contraión entre los dos grupos carboxilato apantallando repulsiones electrostáticas desfavorables.

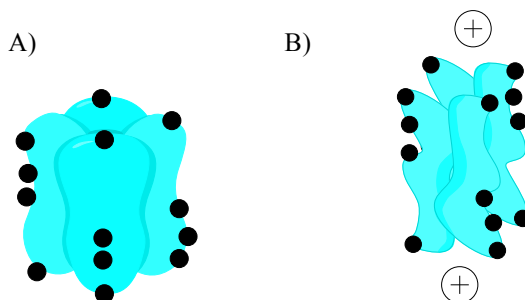


Figura 1.5. A) Representación esquemática de los agregados de ácido cólico (CA) en forma de disco según el modelo de Kawamura.⁵² B) Ubicación de los contraiones en el modelo de Coello.⁴⁵

Por otro lado, este modelo está de acuerdo con estudios de medidas de fluorescencia de sondas incorporadas en los agregados de SBs. Estos estudios sugieren que los agregados protegen a la sonda del entorno acuoso mediante su incorporación al entorno más hidrofóbico proporcionado por el interior de los agregados. Así, Vethamuthu⁵⁴ y sus colaboradores estimaron, mediante estudios con pireno, que el porcentaje de éste en el agua es tan sólo del 4% cuando está solubilizado en colato sódico, porcentaje que se ve reducido al 0% en los agregados de desoxicolato.

Un segundo modelo fue propuesto por Giglio⁵⁵ a partir de las estructuras cristalinas de sales biliares. Este modelo es contrapuesto al anterior y sugiere que la estructura de los agregados es helicoidal, estando los contraiones en el interior de la hélice, donde también se ubican las moléculas de agua. La molécula sería neutra puesto que las cargas positivas de los contraiones neutralizarían las cargas negativas de los monómeros de sal biliar, y los grupos polares se ubicarían en la cara lateral de la hélice, recordando la estructura de una micela inversa (**Figura 1.6**).

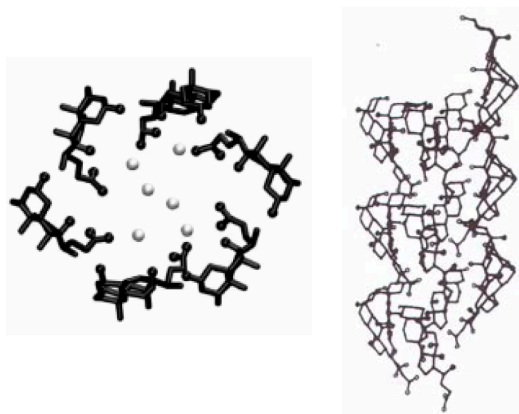


Figura 1.6. Representación esquemática de los agregados de ácido cólico (CA) según el modelo de Giglio.⁵⁵

1.5.2 Vesículas

El componente mayoritario de las vesículas es la lecitina (L), un fosfolípido compuesto por una cola apolar (región hidrofóbica) y una cabeza polar (región hidrofílica), que posee dos cadenas carbonadas de ácidos grasos (**Figura 1.7**).

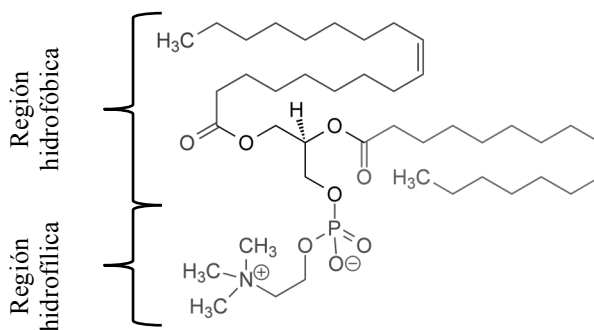


Figura 1.7. Estructura química de la lecitina.

El segundo componente de las vesículas es el colesterol (Ch), que posee como estructura básica un sistema de anillos de pentanoperhidrofenantreno, varios grupos metilo, una cadena alifática y un grupo hidroxilo en posición C-3 β (**Figura 1.8**).

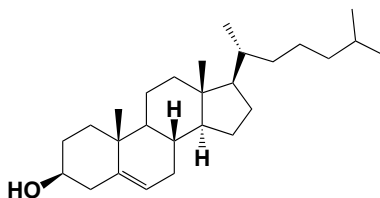


Figura 1.8. Estructura química del colesterol.

Estructuralmente, las vesículas son esféricas, con una membrana compuesta fundamentalmente por una doble capa de lecitina, que es hidrófila en su parte exterior y lipófila en su interior, donde se aloja el colesterol, manteniéndose así en disolución.

Las vesículas se pueden clasificar en dos grupos: a) vesículas unilaminares⁵⁶ y b) vesículas multilaminares,⁵⁷ también denominadas cristales biliares líquidos que se forman por fusión de las unilaminares. Ambas están formadas por lecitina (L) y colesterol (Ch)^{30,32} y en ocasiones, contienen una pequeña cantidad de SB como surfactante.⁵⁸ Su tamaño oscila entre los 50 nm en vesículas unilaminares hasta las μm en el caso de las multilaminares. En la **Figura 1.9** se muestran a modo representativo una vesícula uni- y multilaminar formada por fosfolípidos y colesterol, así como una imagen de microscopía de transmisión electrónica (TEM)⁵⁹ que contiene ambos tipos de vesículas.

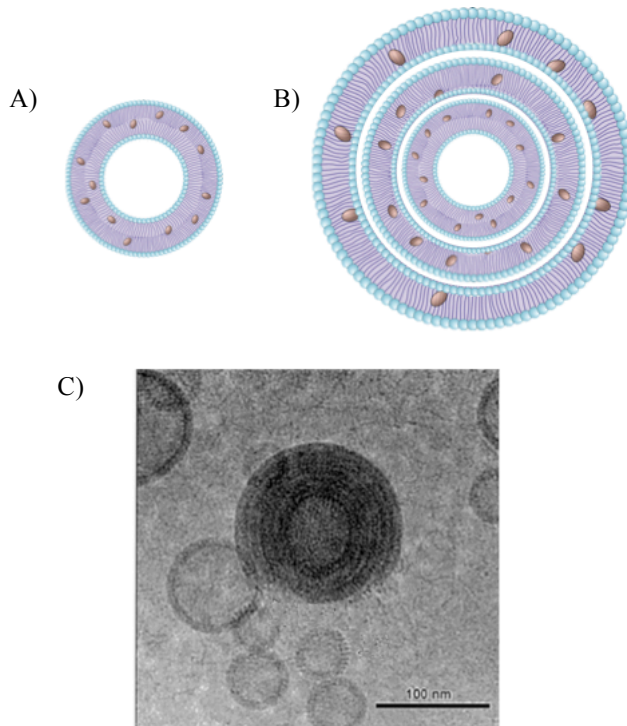


Figura 1.9. Representación esquemática de vesículas de lecitina y colesterol. A) Vesícula unilaminar. B) Vesícula multilaminar. C) Imagen de TEM.⁵⁹

Además de mantener el colesterol en disolución, las vesículas absorben y transportan sustancias hidrosolubles (como vitamina C) y sustancias liposolubles (como vitamina E) entre el exterior e interior de la célula. Asimismo, su capacidad para transportar antibióticos y fármacos ha sido ampliamente estudiada.⁶⁰

1.5.3 Micelas Mixtas

La formación de las MM (**Figura 1.10**) tiene lugar por interacción de las SBs con vesículas unilaminares de Ch y L en un proceso que se puede dividir en dos etapas:⁶¹⁻⁶³ i) a bajas concentraciones de SB, éstas se distribuyen entre la disolución y las vesículas de manera que aumentan su tamaño y ii) posteriormente, al aumentar su concentración, alcanzan la concentración de saturación en las vesículas y estas últimas se fragmentan y se recombinan formando las MM. En esta segunda etapa coexisten en equilibrio las vesículas con las MM; sin embargo, a medida que aumenta la concentración de SB, el equilibrio se desplaza a la formación de MM.

Las MM están formadas por SB (68%), L (22%) y Ch (9%), y son las principales responsables de la solubilización del Ch en el intestino delgado,¹⁰ que puede verse incrementada en más de un millón de veces en presencia de éstas.⁶⁴

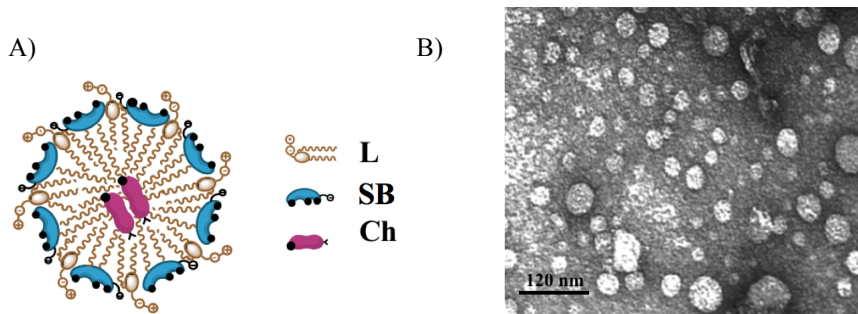


Figura 1.10. A) Representación esquemática de las micelas mixtas. B) Imagen de TEM.⁶⁵

En la formación de MM, la L y las SBs orientan sus regiones hidrofílicas hacia la fase acuosa, manteniendo sus regiones hidrofóbicas en el interior de la MM, donde se disuelve el Ch. En la **Figura 1.10** se muestran a modo representativo una micela mixta formada por lecitina, sal biliar y colesterol, así como una imagen de microscopía de transmisión electrónica (TEM)⁶⁵ que contiene ambos tipos de vesículas.

La morfología y tamaño de las MM han sido ampliamente estudiados mediante técnicas como la dispersión de luz dinámica,^{66,67} la calorimetría,^{40,68} la electroforesis,⁶⁹ la ultracentriguación⁷⁰ o la microscopía electrónica de transmisión.^{65,71} Estos análisis han permitido conocer que las MM son cuasi-esféricas, termodinámicamente estables y con un diámetro que varía entre 10 y 70 nm.^{72,73}

En la **Figura 1.11** se muestra un diagrama de fases donde se representan en porcentaje molar los componentes mayoritarios de la bilis. Se observa que en las condiciones de formación de las MM, éstas predominan,⁷⁴ con un pequeño porcentaje de vesículas. Sin embargo, cuando el porcentaje es mayor para L o Ch, la bilis se hace rica en una mezcla de vesículas y micelas mixtas o incluso aparecen además cristales líquidos de colesterol.

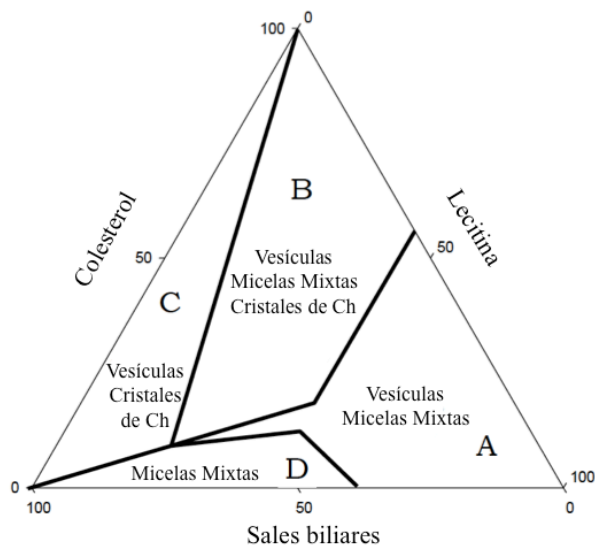


Figura 1.11. Diagrama de fases en porcentaje molar de SBs, L y Ch. [A] Zona donde coexisten vesículas y micelas mixtas. [B] Zona donde coexisten vesículas, micelas mixtas y cristales de colesterol. [C] Zona donde coexisten micelas mixtas y cristales de colesterol.[D] Zona de predominio de micelas mixtas.

Por otro lado, el carácter hidrofóbico del interior de las MM las convierte en excelentes transportadores de fármacos poco solubles⁷⁵⁻⁷⁹ ya que poseen una composición similar a los fluidos fisiológicos gastrointestinales y no presentan toxicidad. En este contexto, se ha estudiado la solubilización de fármacos como los ansiolíticos diazepam,⁸⁰ tetrazepam⁸¹ y clonazepam,⁸² el anticancerígeno taxol,⁸³ el antiinflamatorio no esteroideo indometacina,⁸⁴ o también otro tipo de principios activos como la vitamina K o vitaminas liposolubles.

1.6 Resumen de conceptos fotofísicos y fotoquímicos generales

La fotoquímica es la disciplina que estudia las reacciones químicas producidas por la luz. Los procesos fotoquímicos tienen lugar tras la absorción de radiación UV-Vis (200-800 nm), que puede llevar a una molécula a un estado electrónico de mayor energía desde el que puede experimentar transformaciones de su estructura originando nuevas moléculas. Por otra parte, el término fotofísica se utiliza para describir procesos de relajación no reactivos tras absorción de un fotón.

La **absorción (A)** se define como el proceso por el cuál una molécula es excitada desde su estado fundamental (S_0) a uno de los niveles vibracionales más altos de los estados excitados (S_n).

La cantidad de radiación que absorbe un sistema viene dada por la Ley de Lambert-Beer-Bouguer, según la cual, si sobre el sistema incide radiación monocromática de potencia radiante (energía por unidad de tiempo) P_0 , la potencia radiante transmitida, P_t , viene dada por la ecuación por la ecuación 1.1:

$$P_t = P_0 10^{-\epsilon lc} \quad \text{Ec. 1.1}$$

siendo ϵ el coeficiente de absorción molar o absortividad molar, l el camino atravesado por la radiación en cm y c la concentración molar de la especie absorbente. Si se toman logaritmos, tenemos la ecuación 1.2:

$$A = \log(P_0/P_t) = \epsilon lc \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde se relaciona proporcionalmente la absorción y el coeficiente ϵ .

En el diagrama de Jablonski⁸⁵ (**Figura 1.12**) se muestran los distintos procesos foto-físicos que una molécula puede sufrir tras la absorción de un fotón. Se conoce como procesos foto-físicos a los procesos de relajación que no implican cambios en la estructura de la molécula. Estos procesos pueden ser radiativos o no radiativos.⁸⁶

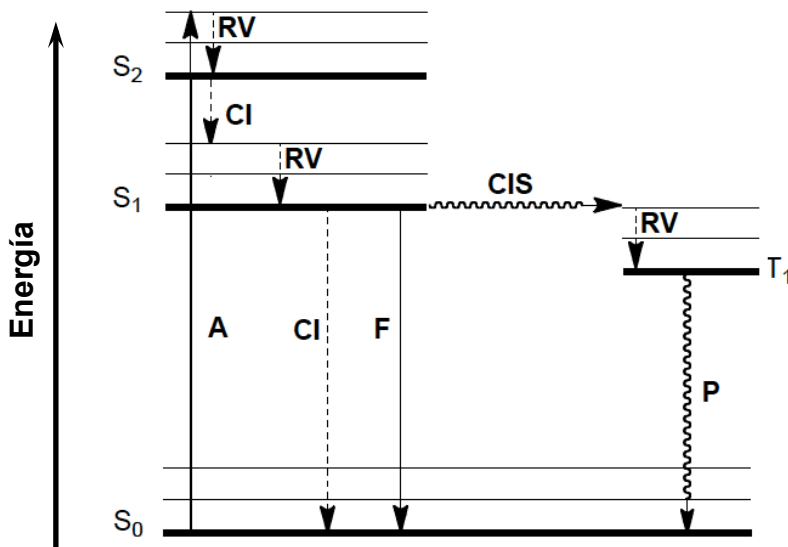


Figura 1.12. Representación del diagrama de Jablonski.

Entre los procesos radiativos más habituales se encuentran:

- **Fluorescencia (F)**: consiste en una transición entre estados de la misma multiplicidad de espín. Se produce habitualmente desde el estado excitado singlete (S₁) al estado fundamental (S₀) con emisión de un fotón, con un tiempo de vida en el rango de los picosegundos a los nanosegundos.

- **Fosforescencia (P)**: consiste en la emisión desde el estado T_1 al estado fundamental (S_0) con emisión de un fotón. Tiene lugar entre estados de diferente multiplicidad de espín, por lo que ocurre más lentamente y con menor intensidad que la relajación por fluorescencia.

El concepto de rendimiento cuántico se encuentra relacionado con los dos procesos anteriores. Así, se conoce como rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) o de fosforescencia (ϕ_P), al número de moléculas que participan en un proceso fotofísico dividido por el número de fotones absorbidos. El valor de rendimiento cuántico se encuentra entre cero y uno para procesos inducidos por un solo fotón.

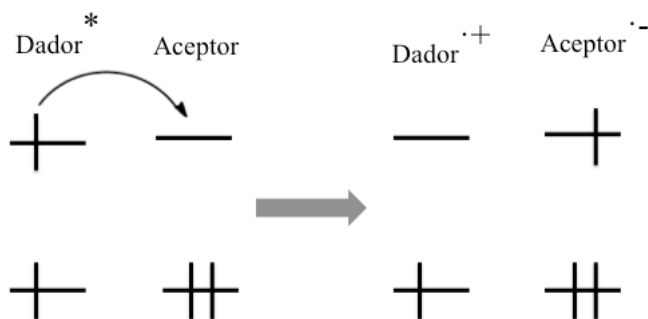
Entre los procesos no radiativos más habituales se encuentran:

- **Relajación vibracional (RV)**: relajación desde un nivel vibracional excitado hasta el correspondiente de menor energía. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional de las moléculas excitadas se transfiere a las moléculas del disolvente. El tiempo de vida promedio de este proceso es de 10^{-15} s aproximadamente.
- **Conversión interna (CI)**: Tiene lugar entre estados de la misma multiplicidad. En este proceso la molécula pasa a un estado de menor energía mediante transiciones permitidas.
- **Cruce intersistemas (CIS)**: Las moléculas que se encuentran en el estado S_1 pueden también sufrir un cruce intersistemas con conversión de espín al estado triplete (T_1). Estas transiciones entre estados electrónicos de diferente multiplicidad son prohibidas; sin embargo, están favorecidas en presencia de átomos pesados.

Dado que los distintos procesos fotofísicos compiten entre sí y, en su caso, con reacciones fotoquímicas, es importante estudiar las velocidades de cada uno de ellos y ver cómo pueden obtenerse las ecuaciones y las constantes de velocidad correspondientes.

Además, desde los estados excitados, no sólo se producen los procesos fotofísicos anteriormente citados, además pueden ocurrir otros procesos como, por ejemplo, transferencia de energía, transferencia electrónica, transferencia de protón, formación de excíplejo o excímero, interacciones con el disolvente, etc. A continuación se explicarán brevemente la transferencia electrónica y la transferencia de energía que posteriormente se han estudiado en la presente Tesis Doctoral.

La transferencia electrónica (Te) es un proceso en el cuál una molécula en su estado excitado cede o acepta un electrón de otra molécula en su estado fundamental (**Esquema 1.1**). Este proceso puede ser inter- o intramolecular.



Esquema 1.1. Representación de un proceso de Te.

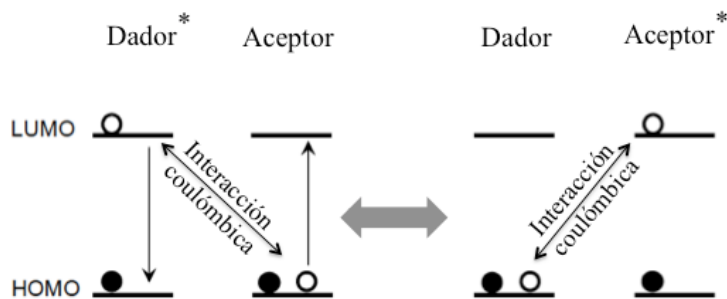
La ecuación de Rehm-Weller (ecuación 1.3) permite estimar la termodinámica de este proceso:

$$\Delta G_{Te} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_{0-0}}{23} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \text{ eV} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde E_{ox} y E_{red} son los potenciales de oxidación y reducción en el estado fundamental de dador y aceptor, E_{0-0} es la energía del estado excitado implicado y ϵ es el coeficiente de absorción molar. En general, en los disolventes polares se favorece el proceso de Te ya que se estabiliza el par iónico generado.

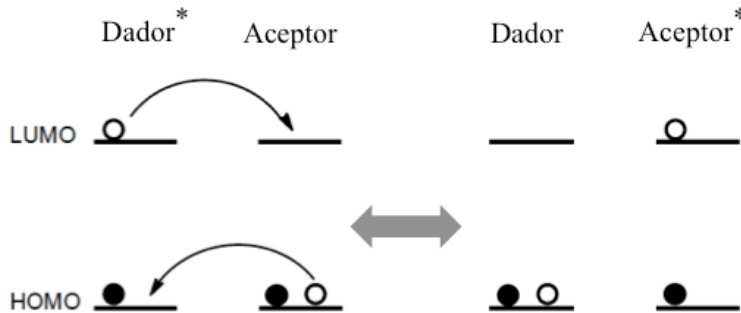
Por otro lado, un proceso de transferencia de energía (TE) consiste en la desactivación de una especie en un estado excitado por transferencia de su energía a otra especie que pasa a un estado de mayor energía. Para que pueda producirse este proceso, la energía del estado excitado del dador ha de ser superior a la del aceptor y su tiempo de vida debe ser suficientemente largo; además, el espectro de emisión de la especie que actúa de dador debe solapar al menos parcialmente con el de absorción del aceptor.

Este proceso puede tener lugar a través de dos mecanismos: mediante interacciones de tipo coulombico, que consisten en interacciones del tipo dipolo-dipolo (mecanismo tipo Förster (**Esquema 1.2**)), que pueden ser de larga distancia, hasta 100 Å, llamándose a este proceso de transferencia de energía no radiativo FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”) cuando ambos, el dador y aceptor son fluorescentes.



Esquema 1.2. Representación de un proceso de TE mediante un mecanismo de Förster.

El segundo mecanismo, conocido como mecanismo de tipo Dexter (**Esquema 1.3**), sólo puede tener lugar cuando existe proximidad entre dador y aceptor (5-10 Å), puesto que es necesario el solapamiento orbital entre LUMO y HOMO de dador y aceptor para que se produzca el intercambio electrónico que da lugar al proceso.



Esquema 1.3. Representación de un proceso de TE mediante un mecanismo de Dexter.

1.7 Análisis de la situación

Como se ha comentado a lo largo de la presente introducción, la circulación enterohepática es un ciclo complejo en el cuál participan una gran variedad de enzimas, proteínas y esteroides, y en donde los ácidos biliares juegan un papel importante.^{1,2}

Las funciones fisiológicas de los ABs en el organismo son variadas y cada vez se recurre al uso de técnicas más precisas para su estudio. Los aspectos estructurales y fisiológicos de los ABs, tales como su biosíntesis en los hepatocitos del hígado⁸⁷ y almacenamiento en la bilis, así como su transporte a través de la circulación enterohepática o su participación en la absorción de lípidos y grasas han sido sólo parcialmente estudiados.

Por ejemplo, para profundizar en el conocimiento de la agregación de los ABs, se han utilizado diferentes técnicas experimentales como RMN.^{2,39,49} Sin embargo, debido al hecho de que los agregados de ABs crecen en tamaño con el aumento de la concentración, el rango de cmc de los ABs es más amplio que el de otros tensioactivos y por lo tanto difícil de determinar. La diferente distribución de los ABs en los agregados de sales biliares, o la captación de moléculas exógenas con diferente hidrofobicidad, así como su participación en la formación de micelas mixtas durante la digestión, siguen necesitando nuevas metodologías que permitan un estudio más profundo.

Asimismo, los ABs tienen una participación clave en la solubilización de compuestos altamente insolubles, como por ejemplo el colesterol, esencial en la fabricación de la membrana plasmática. Este hecho ha sido investigado mediante técnicas como calorimetría,⁶⁸ dispersión de luz dinámica,^{66,67} microscopía electrónica de transmisión,⁶⁵ cromatografía líquida de alta resolución,⁸⁸ dispersión de rayos X de ángulo pequeño,⁸⁹ o ultracentrifugación.⁷⁰ Sin embargo, aspectos como el mecanismo de solubilización de vesículas por la acción de las sales biliares o nuevas metodologías que proporcionen una información fiable de cómo se estructuran las MM necesitan una mayor investigación.

Por otra parte, para investigar acerca de la capacidad de los ABs como transportadores de fármacos se han utilizado técnicas como microcalorimetría,⁹⁰ espectrofotometría,⁹¹ resonancia de espín electrónico,⁹² o resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación;⁹³ sin embargo, algunas de estas técnicas se basan en mediciones indirectas, haciendo uso de sondas adicionales capaces de inducir interacciones secundarias, mientras que en otros casos, no informan sobre la accesibilidad de los fármacos dentro de los agregados. Por otra parte, la sensibilidad de las técnicas empleadas es baja, lo que limita su aplicabilidad a compuestos altamente hidrofílicos.

Con estos antecedentes, parece interesante poner a punto nuevas metodologías que demuestren la validez de las técnicas fotofísicas para profundizar en el conocimiento de las propiedades de los ABs, especialmente, en el comportamiento de agregación de los ácidos biliares, así como la formación de micelas mixtas o su capacidad como transportadores de moléculas poco solubles.

Recientemente, en el grupo de investigación se ha demostrado que el uso de derivados fluorescentes de ácido cólico no modifica las propiedades inherentes del esqueleto esteroidal de los ABs.^{94,95} A su vez, las técnicas fotofísicas tales como fluorescencia o fotólisis de destello láser, han demostrado ser herramientas valiosas para investigar la unión de diferentes tipos de huéspedes tales como naftaleno o naftol a los agregados de ácido cólico.^{51,96-102}

Entre los ABs, el ácido cólico dispone de tres grupos hidroxilo en su cara α (en posiciones C-3, C-7 y C-12) y una cadena lateral que finaliza en un grupo ácido carboxílico; por lo tanto, su estructura permite sintetizar una amplia familia de derivados. Por otra parte, algunos cromóforos tales como dansilo (Dns), naproxeno (NPX), triptófano (Trp) o ketoprofeno (KP) es de esperar que introduzcan sólo pequeñas modificaciones en el esqueleto de las SBs o el Ch a la vez que los conviertan en sustratos adecuados para ser estudiados mediante técnicas fotofísicas.

Capítulo 2

Objetivos / Aims

Objetivos

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es demostrar la utilidad de las técnicas fotofísicas, tales como fluorescencia y fotólisis de destello láser, para avanzar en el conocimiento de algunas de las funciones de los ácidos biliares y de sus aplicaciones.

Para ello, en primer lugar, se requiere sintetizar nuevos derivados fotoactivos de ácido cólico y colesterol empleando fluoróforos que alteren mínimamente las propiedades inherentes al esqueleto esteroideal de los mismos. Estos derivados fotoactivos serán empleados para alcanzar los siguientes objetivos concretos:

1. Investigar la agregación de los ácidos biliares, así como la distribución de los diferentes agregados en función de la concentración de sal biliar.
2. Demostrar la incorporación de ácido cólico y colesterol en micelas mixtas.
3. Investigar la capacidad de los agregados de ácido cólico como transportadores de fármacos.
4. Estudiar procesos de desactivación de fluorescencia en sistemas supramoleculares como los agregados de sales biliares y las micelas mixtas.

Aims

The main goal of this PhD Thesis is to demonstrate the usefulness of the photophysical techniques, such as fluorescence and laser flash photolysis, to improve the knowledge of some of the functions of bile acids and their applications.

To achieve this goal, the first requirement is to synthesize new photoactive cholic acid and cholesterol derivatives using fluorophores that introduce minimal changes into the inherent properties of the steroidal skeleton. These photoactive derivatives will then be employed to achieve the following concrete objectives:

1. To investigate the aggregation of bile acids, as well as the distribution of the different aggregates as a function of the concentration of bile salt.
2. To demonstrate the incorporation of cholic acid and cholesterol in mixed micelles.
3. To investigate the potential of cholic acid aggregates as drug carriers.
4. To study fluorescence quenching processes in supramolecular systems such as bile salts aggregates and mixed micelles.

Capítulo 3

Síntesis de derivados fotoactivos de ácido cólico y colesterol

3.1 Introducción

En este capítulo se describirá con detalle la síntesis de derivados de ácido cólico y colesterol incorporando diferentes cromóforos que serán empleados en los capítulos posteriores.

Dansilo (Dns), naproxeno (NPX), triptófano (Trp) y ketoprofeno (KP) fueron los cromóforos elegidos, ya que se encuentran disponibles comercialmente y son conocidas sus propiedades fotofísicas. El ácido cólico (CA) (uno de los ácidos biliares mayoritarios en la bilis humana¹¹) y el colesterol (Ch) (precursor de las sales biliares (SBs) y componente importante de las micelas mixtas¹⁰³) fueron los sustratos elegidos, ya que ambos participan en los diferentes sistemas supramoleculares estudiados a lo largo de la Tesis Doctoral. Las estructuras de todos ellos se muestran en la **Figura 3.1**.

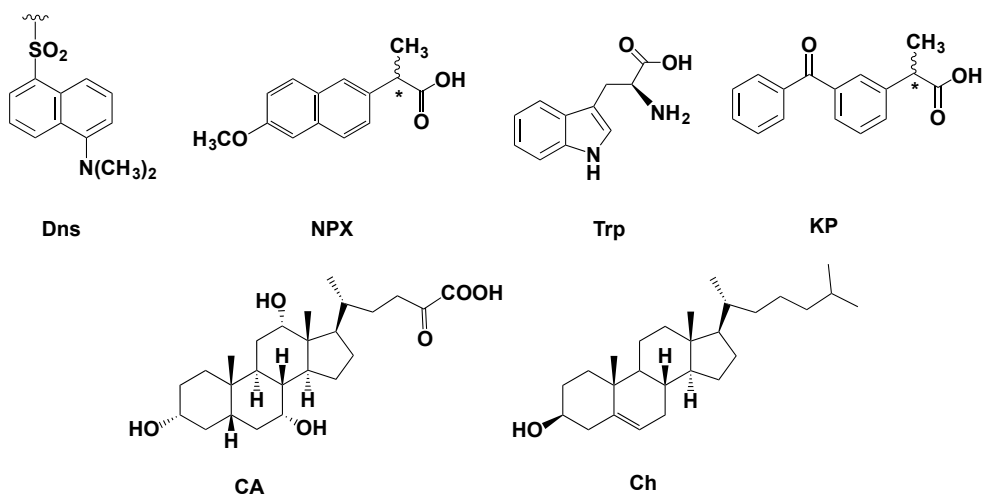


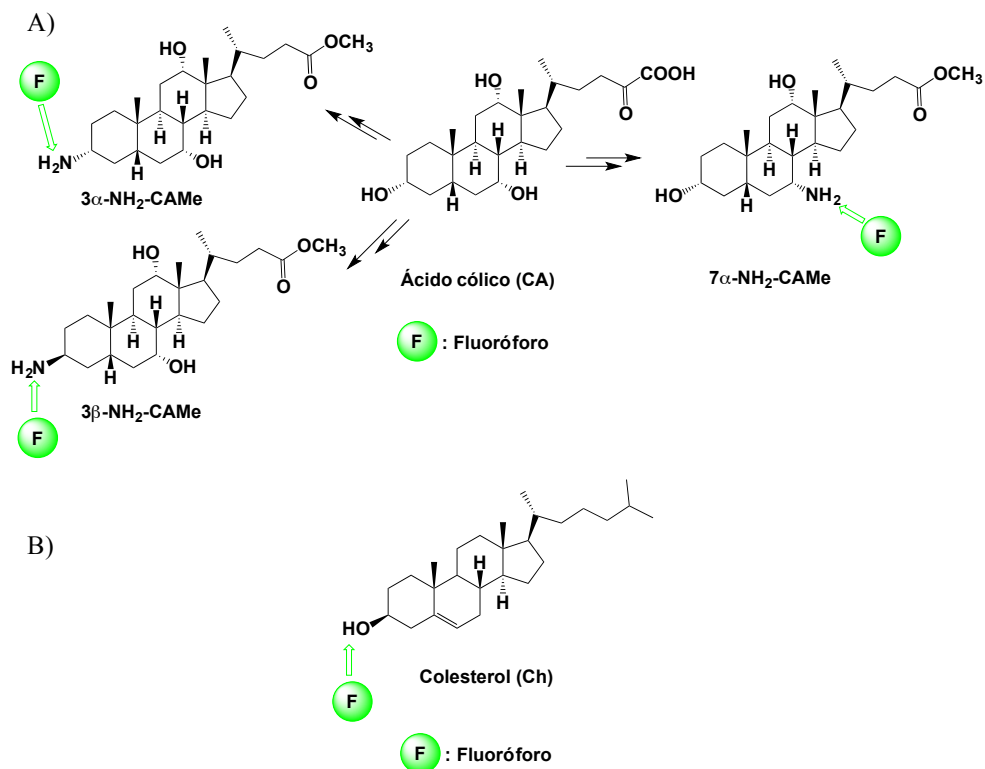
Figura 3.1. Cromóforos y sustratos utilizados.

El ácido cólico dispone de tres grupos hidroxilo en su cara α (en posiciones C-3, C-7 y C-12) y una cadena lateral que finaliza en un grupo ácido carboxílico; por lo tanto, su estructura permite sintetizar una amplia familia de derivados, más aún considerando una estereoquímica definida para cada grupo hidroxilo. Por otra parte, el colesterol dispone de un único grupo hidroxilo en posición C-3 β , así pues, esta posición será la empleada para la obtención de los nuevos derivados mediante esterificación con los diferentes cromóforos elegidos.

En el grupo de investigación se ha descrito la preparación de diferentes derivados del ácido cólico en los que se transformó el grupo hidroxilo en amino, para posteriormente poder llevar a cabo la unión de la molécula fotoactiva en la posición elegida de manera selectiva.⁹⁵ Se consideró oportuno seguir con la misma estrategia y así preparar derivados de ácido cólico aprovechando la conversión regioselectiva de uno de sus grupos hidroxilo con una configuración definida (α o β) en las posiciones C-3 o C-7, para posteriormente, llevar a cabo la conjugación con el fluoróforo elegido. Se descartó la conjugación por el hidroxilo en C-12 del ácido cólico por ser menos reactivo que los de las posiciones C-3 ó C-7.

En la **Esquema 3.1A** se muestran las estructuras de los aminoderivados empleados. Para su obtención se comenzó con la protección del grupo ácido carboxílico del ácido cólico en forma de éster metílico, seguido de oxidación regioselectiva y aminación reductiva para el caso de los aminoderivados **3 α -** y **7 α -NH₂CAMe**. En el caso del intermedio **3 β -** se siguió un proceso de mesilación en posición C-3, seguido de sustitución nucleofílica bimolecular y posterior reducción.

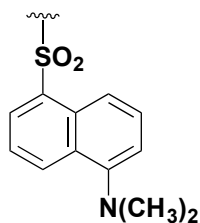
Por otra parte, para la preparación de los derivados de colesterol, la unión se realizó directamente aprovechando el grupo hidroxilo en posición C-3 β (**Esquema 3.1B**).



Esquema 3.1. A) Esquema de preparación de los derivados fotoactivos de CA en las posiciones **3 α -**, **3 β -** y **7 α -** en el que se muestran los correspondientes aminoderivados intermedios. B) Esquema de preparación de los derivados fotoactivos de Ch.

La síntesis detallada de cada uno de los derivados agrupados en base a los cromóforos incorporados se describe a continuación.

3.2 Derivados de ácido cólico y colesterol incorporando el cromóforo dansilo



El fluoróforo dansilo es un derivado de naftaleno que comercialmente se encuentra disponible en forma de cloruro. Es ampliamente utilizado en el análisis de la modificación de aminoácidos en la secuenciación de proteínas,¹⁰⁴ ya que reacciona con aminas primarias y secundarias dando lugar a sulfonamidas estables.

3.2.1 Derivados de ácido cólico: 3 α -, 3 β - y 7 α -Dns-CA

En la **Figura 3.2** se muestran los derivados de ácido cólico incorporando el cromóforo dansilo utilizados en esta tesis doctoral. Éstos ya habían sido descritos en el grupo de investigación. Así, la conjugación de 3 α -, 3 β - y 7 α -NH₂-CAME con cloruro de dansilo condujo a 3 α -, 3 β - y 7 α -Dns-CAME y la desprotección final por hidrólisis básica proporcionó los compuestos 3 α -, 3 β - y 7 α -Dns-CA.

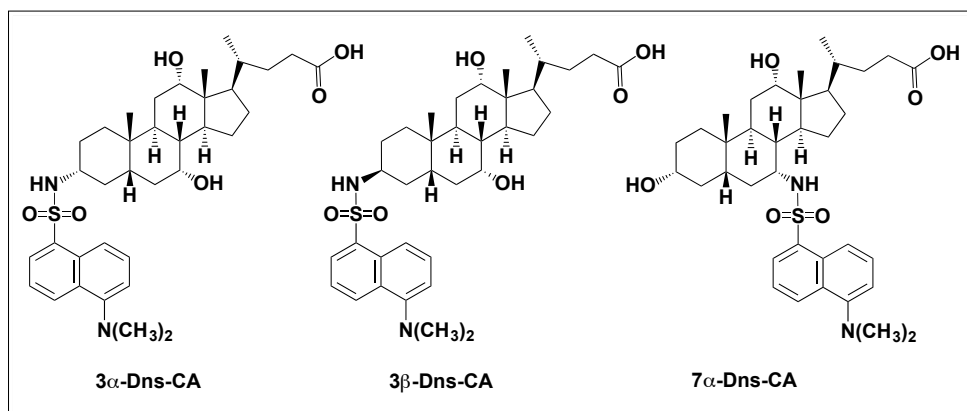
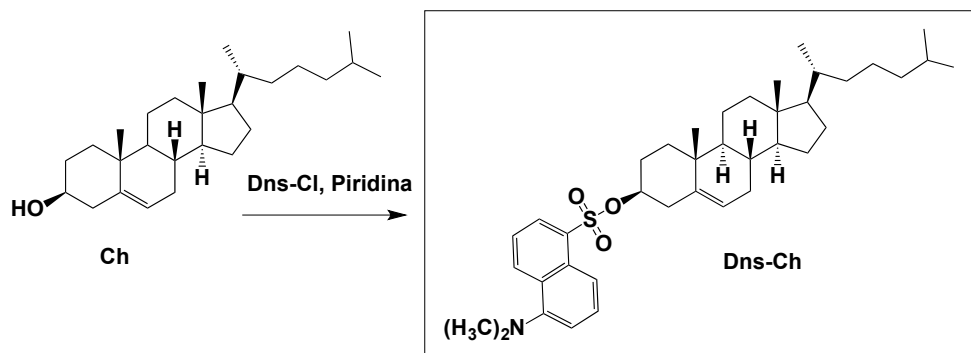


Figura 3.2. Derivados de ácido cólico con Dns.

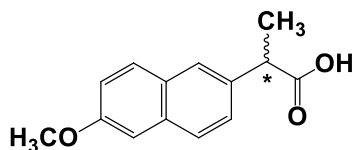
3.2.2 Derivados de colesterol: Dns-Ch

La unión del fluoróforo mediante un enlace sulfonato dio lugar en una sola etapa al dansil derivado de colesterol (**Dns-Ch**). La conjugación del fluoróforo dansilo se llevó a cabo por tratamiento de colesterol con cloruro de dansilo en piridina, lo que proporcionó el compuesto deseado **Dns-Ch** con un rendimiento del 53% (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2. Síntesis del derivado de colesterol con Dns: **Dns-Ch**.

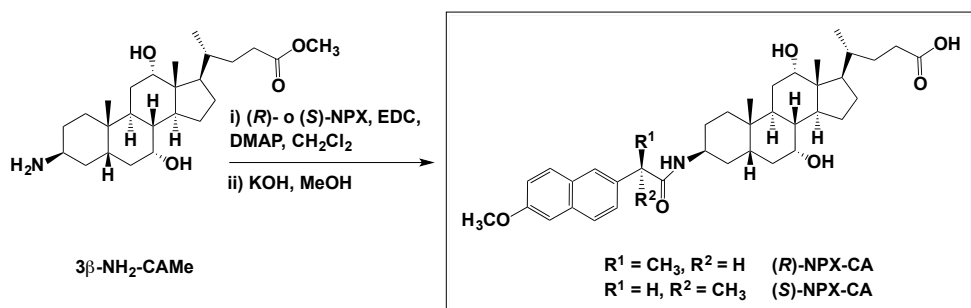
3.3 Derivados de ácido cólico y colesterol incorporando el cromóforo naproxeno



El naproxeno (NPX) es un derivado de naftaleno, que se emplea como analgésico de uso general en el tratamiento de dolores leves o moderados. El naproxeno posee un carbono asimétrico, y se encuentra disponible en sus dos formas enantioméricas. Así pues, para una misma configuración en C-3 β del esqueleto de CA o Ch, podemos obtener dos isómeros, lo que permitiría estudiar la estereodiferenciación tras la incorporación en agregados de sales biliares o micelas mixtas.

3.3.1 Derivados de ácido cólico: (*R*)-NPX-CA y (*S*)-NPX-CA

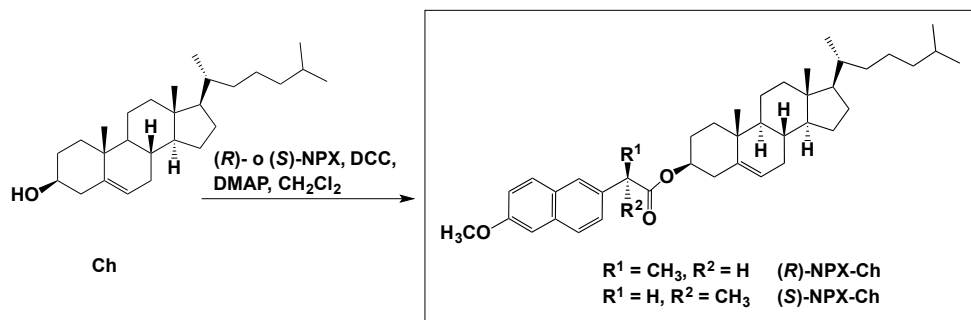
Para la preparación de estos derivados del ácido cólico, se partió del aminointermedio **3 β -NH₂-CAME** que se conjugó con (*R*)- o (*S*)-NPX proporcionando las correspondientes amidas **3 β -(*R*)-** o **3 β -(*S*)-NPX-CAME**. La desprotección final por hidrólisis básica proporcionó los derivados (*R*)- y (*S*)-NPX-CA con rendimientos moderados (**Esquema 3.3**).



Esquema 3.3. Síntesis de los derivados de ácido cólico con NPX en posición 3 β -: (*R*)-NPX-CA y (*S*)-NPX-CA.

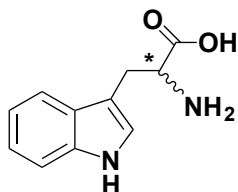
3.3.2 Derivados de colesterol: (*R*)-NPX-Ch y (*S*)-NPX-Ch

La unión del fluóroforo naproxeno mediante un enlace éster entre el hidroxilo en C-3 β y (*R*)- o (*S*)-NPX dio lugar en una sola etapa a los derivados de colesterol (*R*)- y (*S*)-NPX-Ch con altos rendimientos (**Esquema 3.4**).



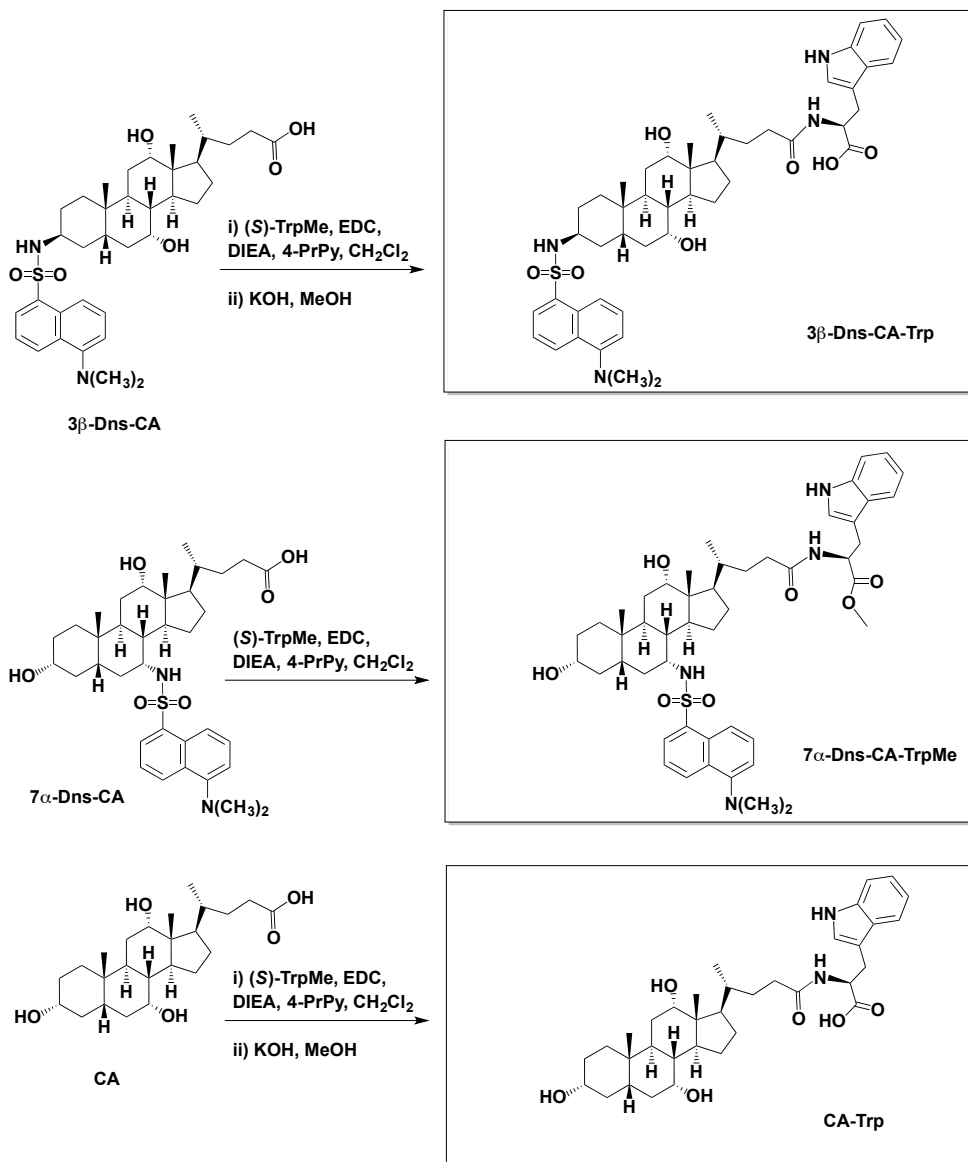
Esquema 3.4. Síntesis de los derivados de colesterol con NPX: (*R*)-NPX-Ch y (*S*)-NPX-Ch.

3.4 Derivados de ácido cólico incorporando el cromóforo triptófano



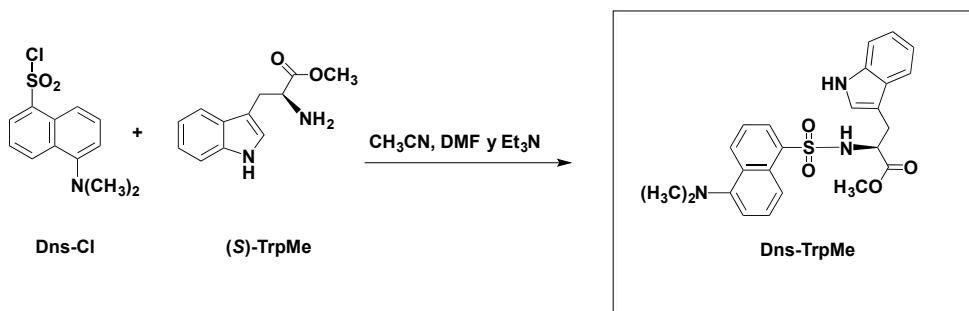
El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial en la nutrición humana. Está presente en proteínas transportadoras del organismo como la albúmina sérica humana (HSA), que es sintetizada en el hígado y normalmente constituye alrededor del 60% del total de proteína del plasma humano, actuando como vehículo y distribuidor de ácidos biliares, hormonas o fármacos.

En este caso, se prepararon los derivados de ácido cólico en los que se incorporó el cromóforo en la cadena lateral del esqueleto y se utilizó únicamente el enantiómero (*S*)-Trp. Así pues, se partió de los dansil derivados **3β-** y **7α-Dns-CA** y del ácido cólico comercial y se conjugó el cromóforo (*S*)-TrpMe por la cadena lateral formando las correspondientes amidas, obteniéndose los compuestos **3β-Dns-CA-TrpMe**, **7α-Dns-CA-TrpMe** y **CA-TrpMe**. Además, en el caso de los compuestos **3β-Dns-CA-TrpMe** y **CA-TrpMe** se prosiguió con una desprotección final por hidrólisis básica con KOH en MeOH obteniéndose los ácidos **3β-Dns-CA-Trp** y **CA-Trp** (Esquema 3.5).



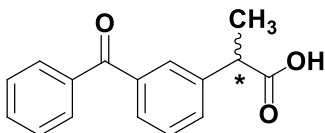
Esquema 3.5. Síntesis de los derivados de ácido cólico con Trp: 3β-Dns-CA-Trp, 7α-Dns-CA-TrpMe y CA-Trp.

Para realizar experimentos de control, se preparó el derivado **Dns-TrpMe** (Esquema 3.6).

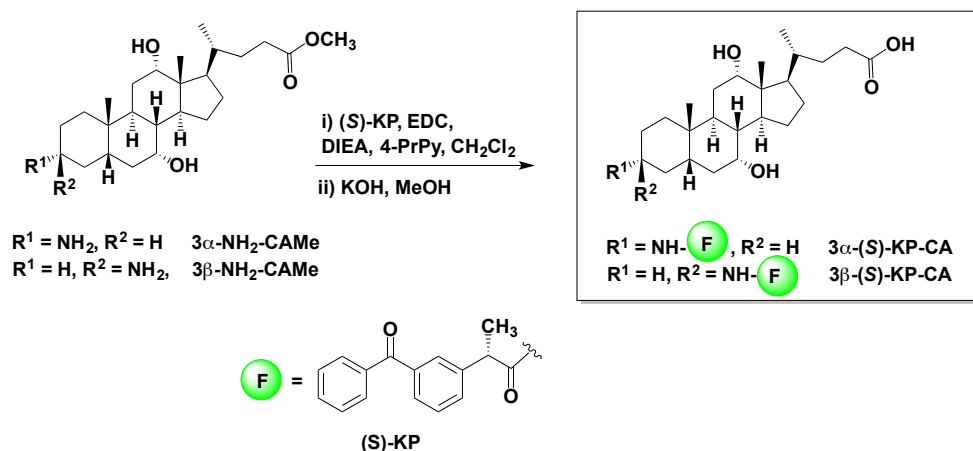


Esquema 3.6. Síntesis del derivado fotoactivo **Dns-TrpMe**.

3.5 Derivados de ácido cólico incorporando el cromóforo ketoprofeno



El ketoprofeno (KP) es un derivado de benzofenona, que se emplea como fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) en el tratamiento de enfermedades reumáticas, traumatologías y procesos inflamatorios en general. Al igual que el naproxeno, el ketoprofeno también posee un carbono asimétrico; sin embargo, se utilizó únicamente el enantiómero (*S*)-KP y se prepararon los derivados de ácido cólico en posiciones C-3 α y C-3 β del esqueleto. Así pues, para sintetizar estos nuevos derivados, se partió de los aminointermedios **3 α** - o **3 β** -NH₂-CAME, y se conjugó el cromóforo (*S*)-KP dando lugar a la correspondiente amida para el caso de **3 α** -(*S*)-KP-CAME. En el caso del **3 β** -NH₂-CAME se obtuvo un derivado resultado de la formación de la amida en 3 β y de la esterificación en 7 α . Sin embargo, tras desprotección final por hidrólisis básica se obtuvieron los compuestos deseados **3 α** -(*S*)-KP-CA y **3 β** -(*S*)-KP-CA (Esquema 3.7).



Esquema 3.7. Síntesis de los derivados de ácido cólico con (*S*)-KP: **3 α** -(*S*)-KP-CA y **3 β** -(*S*)-KP-CA.

3.6 Método Experimental

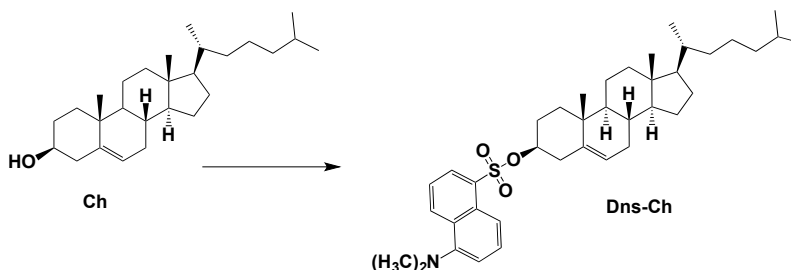
3.6.1 Instrumentación

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron realizados en un instrumento Bruker (Rheinstetten, Alemania) de 300 MHz. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se indican en Hz. Se utilizaron CDCl_3 y CD_3OD como disolventes y la señal correspondiente al disolvente deuterado en cada caso se tomó como referencia: CDCl_3 ($\delta = 7.26$ para ^1H RMN, $\delta = 77.2$ para ^{13}C RMN) y CD_3OD ($\delta = 3.31$ para ^1H RMN, $\delta = 49.0$ para ^{13}C RMN). La masa exacta de alta resolución (EMAR) está incluida para algunos de los compuestos finales nuevos y se realizó en un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) con un inyector automático acondicionado a 4 °C. El espectrómetro ACQUITY Waters™ XevoQToF (Waters Corp.) se conecta al sistema UPLC a través de una interfaz de ionización por electrospray (ESI). Todos los datos se recogieron en modo Centroid y se adquirieron usando el software Masslynx™ (Waters Corp.).

3.6.2 Síntesis

Cloruro de dansilo (Dns-Cl), (*R*)- y (*S*)-naproxeno (NPX), (*S*)-triptófano metil ester ((*S*)-TrpMe), (*S*)-ketoprofeno (KP), colesterol (Ch), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina (DIEA) y 4-pirrolidilpiridina (4-Pr-Py), fueron suministrados por Sigma–Aldrich. Los aminoderivados de ácido cólico fueron preparados de acuerdo con el procedimiento previamente descrito en la literatura.⁹⁵ Los disolventes (anhídros incluidos) se adquirieron en Sigma Aldrich o Scharlau y se utilizaron tal y como fueron recibidos. La gel de sílice Silica gel 60 (35-70 μm) (SiO_2) y LiChroprep® RP-18 (40-63 μm) (RP18) utilizadas como fase estacionaria en la cromatografía de columna fue suministrada por Merck. Los disolventes utilizados como eluyentes para estas cromatografías procedían de Scharlau. Las placas TLC fueron reveladas (cuando fue necesario) con una disolución de ácido fosfomolibdico en EtOH (7%) y calentando.

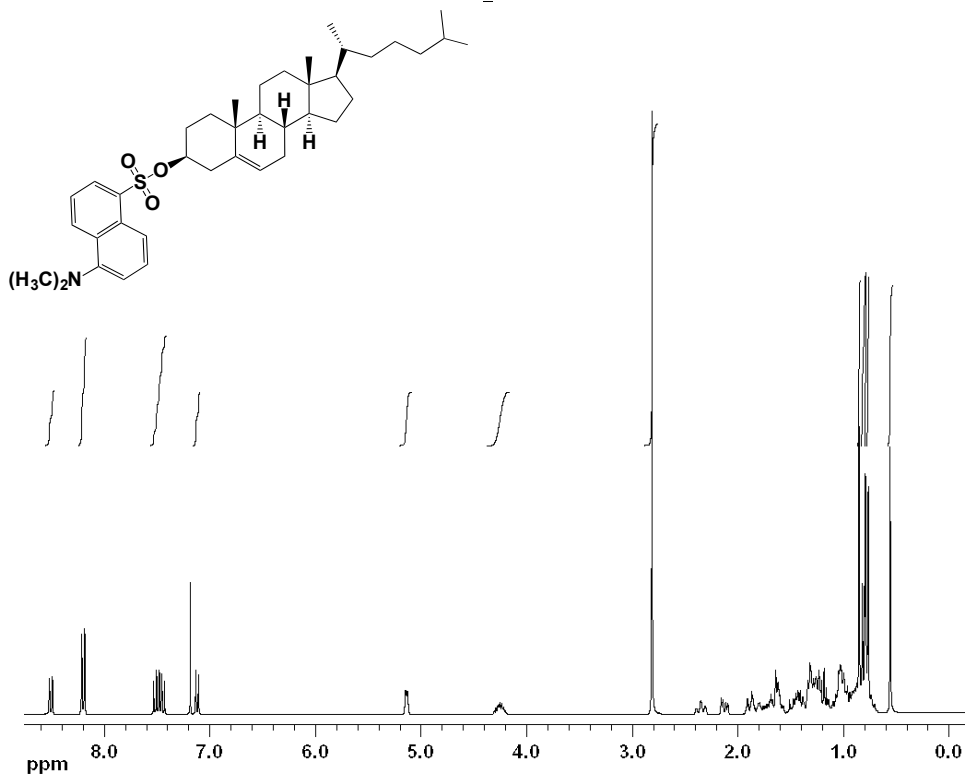
3.6.2.1 Síntesis de Dns-Ch



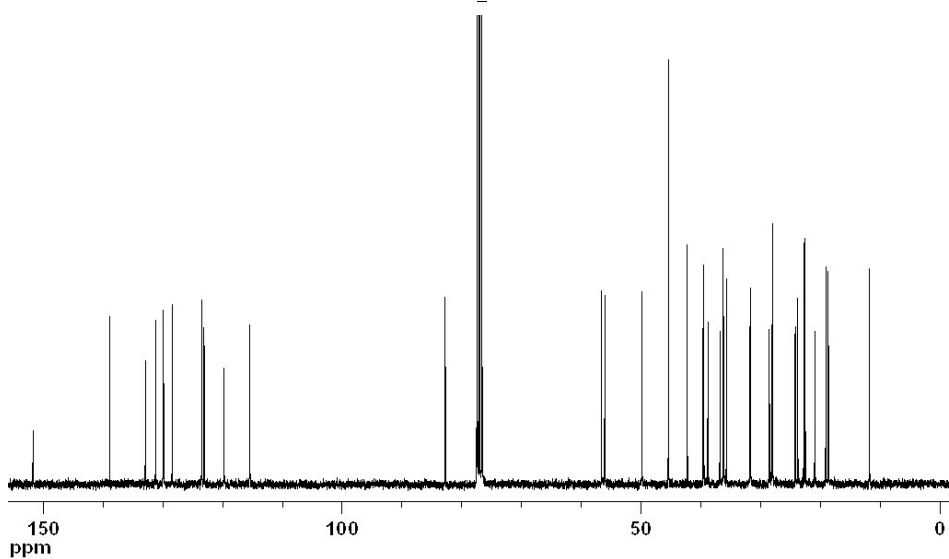
A una disolución enfriada (0 °C) de Ch (100 mg, 0.25 mmol) en piridina anhidra (3 mL), se añadió gota a gota una disolución de cloruro de dansilo (Dns-Cl, 14 mg, 0.5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 20 h. Posteriormente, se vertió sobre HCl 6 M saturado en NaCl y se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y concentraron a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt / n-hexano, 10 : 90) para obtener **Dns-Ch** como un sólido verdoso (84 mg, 53%).

Dns-Ch. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.63 (s, 3H, CH₃), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 2.20 (m, 1H, CH), 2.43 (m, 1H, CH), 2.90 (s, 6H, CH₃), 4.33 (m, 1H, CH), 5.21 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.50-7.67 (m, 2H, Ar-H), 8.28 (dd, *J* = 7.5 Hz y 1.2 Hz, 2H, Ar-H), 8.60 (dt, *J* = 8.7 Hz y 1.1 Hz, 1H, Ar-H); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 11.8 (CH₃), 18.7 (CH₃), 19.1 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.5 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.8 (CH₂), 24.2 (CH₂), 28.0 (CH), 28.2 (CH₂), 28.5 (CH₂), 31.7 (CH), 31.8 (CH₂), 35.7 (CH), 36.1 (CH₂), 36.3 (C), 36.8 (CH₂), 38.8 (CH₂), 39.5 (CH₂), 39.6 (CH₂), 42.2 (C), 45.4 (CH₃), 49.9 (CH₃), 56.1 (CH), 56.6 (CH), 82.7 (CH), 115.4 (CH), 119.7 (CH), 123.0 (CH), 123.5 (CH), 128.4 (CH), 129.8 (C), 129.8 (CH), 129.9 (C), 131.2 (CH), 132.9 (C), 138.8 (C), 151.6 (C). Masa exacta (*m/z*) obtenida: 620.4152, calculada para C₃₉H₅₈NO₃S (MH⁺): 620.4132.

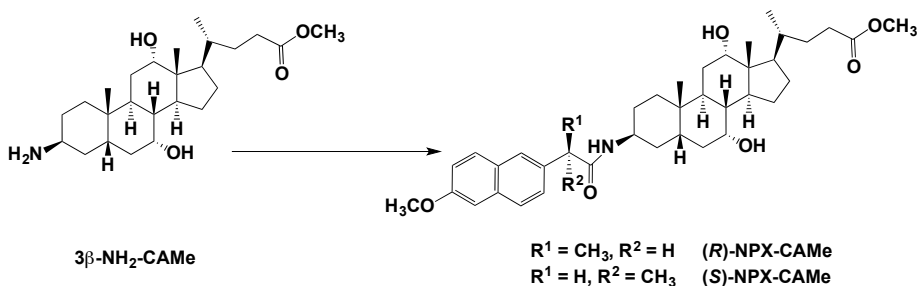
Espectro de ^1H RMN de Dns-Ch (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de Dns-Ch (CDCl_3 , 75 MHz)



3.6.2.2 Síntesis de (*R*)- y (*S*)-NPX-CAMe



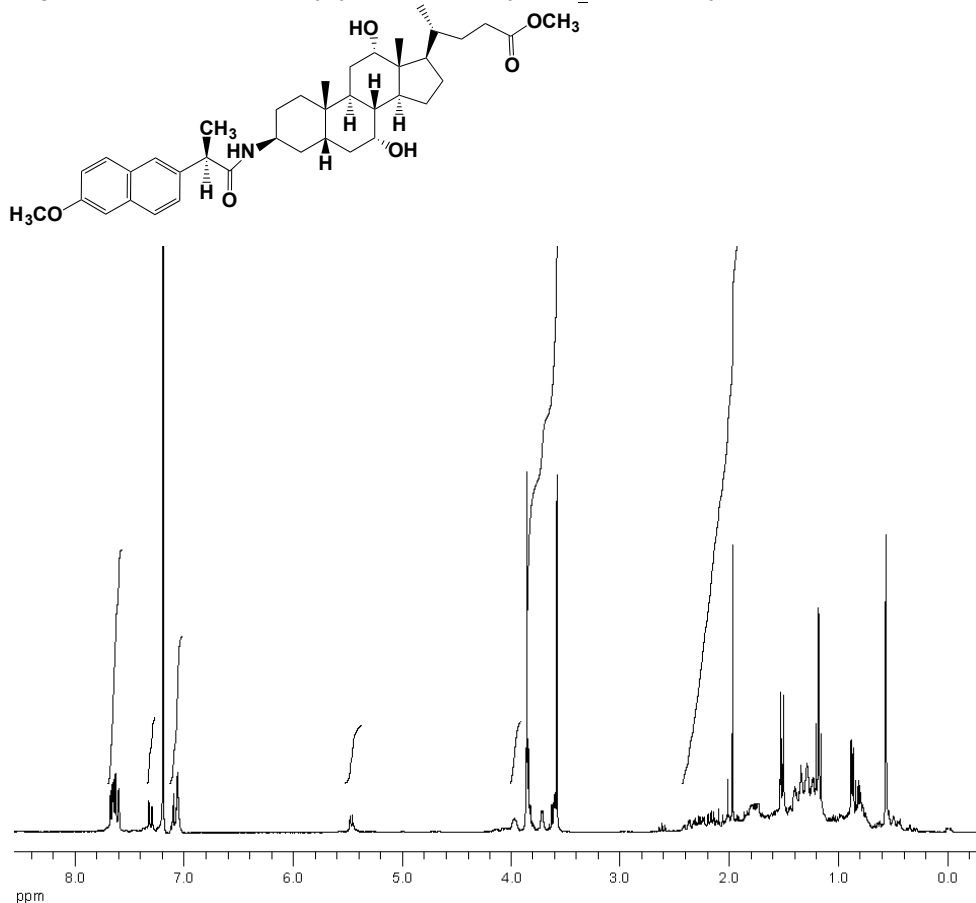
A una disolución de (*S*)- o (*R*)-NPX (123 mg, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 mL), se añadió EDC (156 μL , 0.57 mmol) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. A continuación, se añadió gota a gota una disolución del metil ester del ácido 3 β -aminocólico⁹⁵ (150 mg, 0.36 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL), conteniendo DIEA (155 μL , 0.89 mmol) y 4-Pr-Py (27 mg, 0.18 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente bajo atmosfera inerte. Posteriormente, se vertió sobre agua y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, secaron bajo MgSO_4 y se concentraron. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / *n*-hexano, 70 : 30), se obtuvo (*R*)-NPX-CAMe (55 mg, 25%) o (*S*)-NPX-CAMe (62 mg, 28%) como sólidos cristalinos de color blanco.

(*R*)-NPX-CAMe. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.57 (s, 6H, 2 x CH_3), 0.89 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 3.58 (s, 3H, COOCH_3), 3.61 (s ancho, 1H, CH), 3.71 (s ancho, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.97 (s ancho, 1H, CH), 5.5 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.05-7.15 (m, 2H, Ar-CH), 7.3 (dd, $J = 8.3$ y 1.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.59-7.67 (m, 3H, Ar-CH).

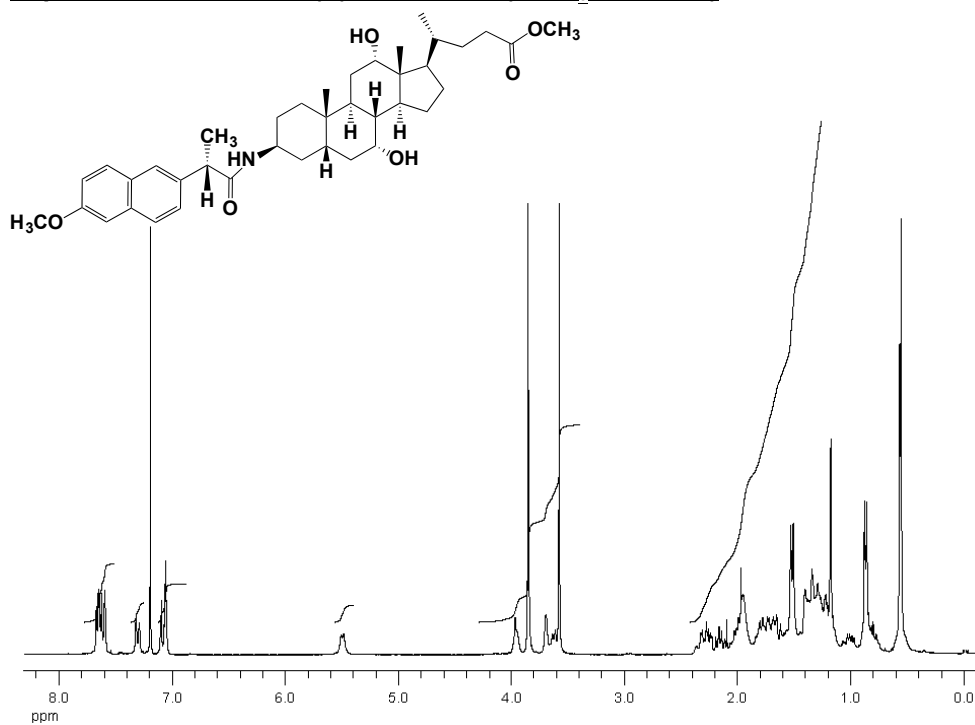
El espectro de ^{13}C de (*R*)-NPX-CAMe no se realizó. El espectro de ^1H reveló que se trataba del compuesto intermedio (*R*)-NPX-CAMe y se prosiguió con la ruta sintética.

(S)-NPX-CAMe. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.56 (s, 3H, CH_3), 0.57 (s, 3H, CH_3), 0.88 (d, $J = 6$ Hz, 3H, CH_3), 1.52 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 3.58 (s, 3H, COOCH_3), 3.61 (m, 1H, CH), 3.69 (s ancho, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.97 (s ancho, 1H, CH), 5.50 (1H, NH), 7.05-7.10 (m, 2H, Ar-CH), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar-CH), 7.59-7.70 (m, 3H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.5 (CH_3), 17.3 (CH_3), 18.3 (CH_3), 23.0 (CH_3), 23.2 (CH_2), 24.5 (CH_2), 25.9 (CH), 27.4 (CH_2), 28.5 (CH_2), 29.7 (CH_2), 30.8 (CH_2), 31.1 (CH_2), 32.2 (CH_2), 34.2 (CH_2), 34.9 (C), 35.2 (CH), 37.2 (CH), 39.4 (CH), 41.9 (CH), 45.4 (CH), 46.5 (C), 47.1 (CH), 47.2 (CH), 51.5 (CH_3), 55.3 (CH_3), 68.2 (CH), 72.9 (CH), 105.7 (CH), 119.1 (CH), 126.0 (CH), 126.3 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (C), 129.2 (CH), 133.7 (C), 136.8 (C), 157.7 (C), 173.7 (CONH), 174.7 (COO).

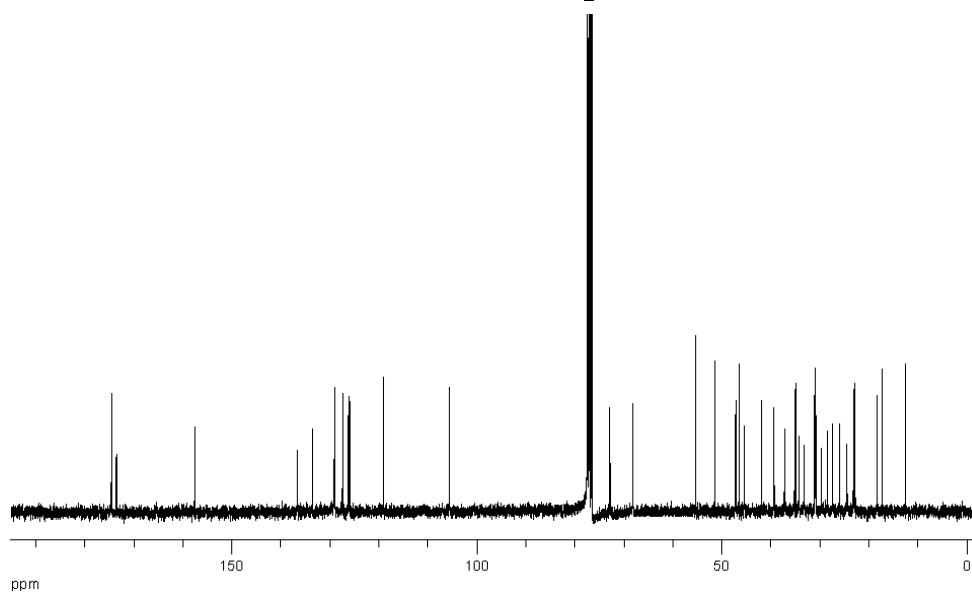
Espectro de ^1H RMN de (R)-NPX-CAMe (CDCl_3 , 300 MHz)



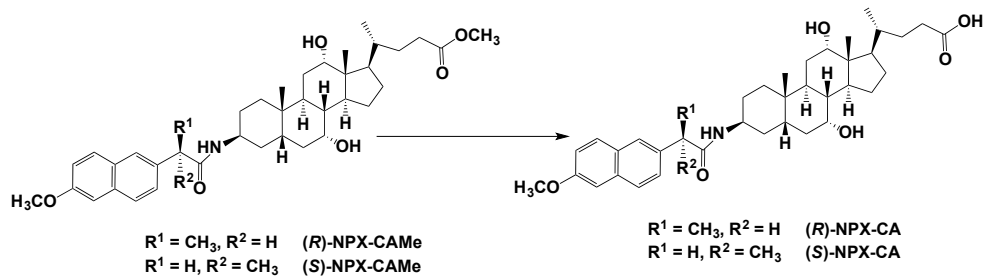
Espectro de ^1H RMN de (S)-NPX-CAMe (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de (S)-NPX-CAMe (CDCl_3 , 75 MHz)



3.6.2.3 Síntesis de (*R*)- y (*S*)-NPX-CA

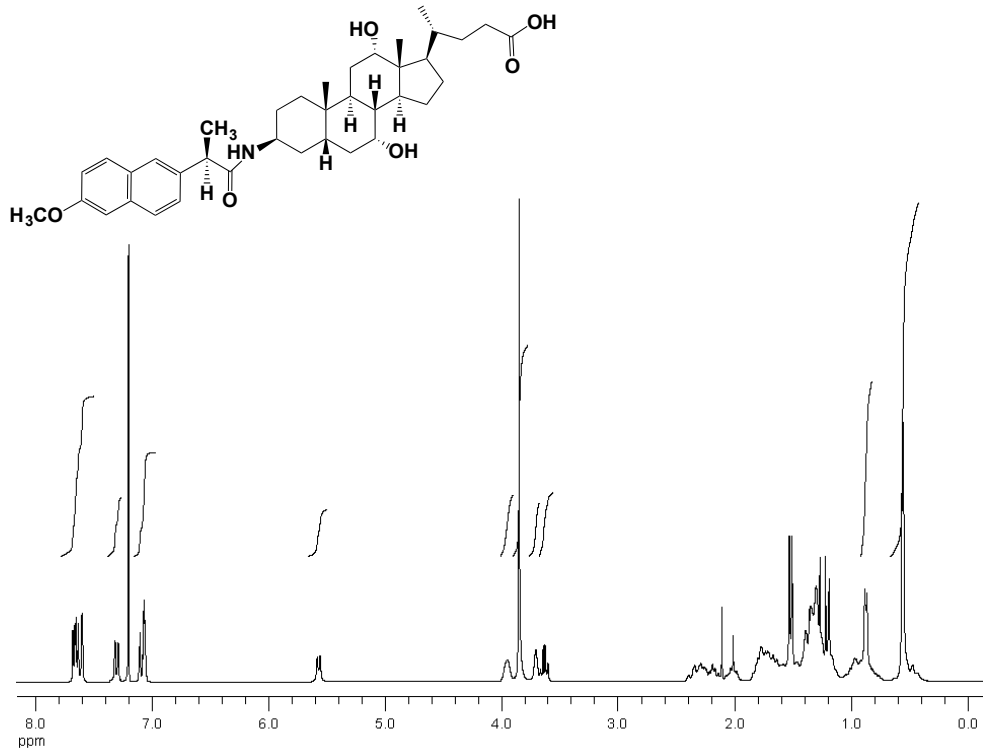


Una disolución de (*R*)-NPX-CAMe o (*S*)-NPX-CAMe (55 mg, 0.09 mmol) en 2 mL de MeOH se trató con KOH en MeOH (1 M, 1.2 mL) y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se evaporó, y la mezcla se redisolvió en agua, se acidificó con HCl 1 M, se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se concentraron y el crudo se purificó por cromatografía de gel de sílice en placa preparativa (AcOEt / n-hexane / AcOH, 90 : 10 : 1) para obtener (*R*)-NPX-CA (25 mg, 46%) o (*S*)-NPX-CA (32 mg, 53%) como sólidos de color blanco.

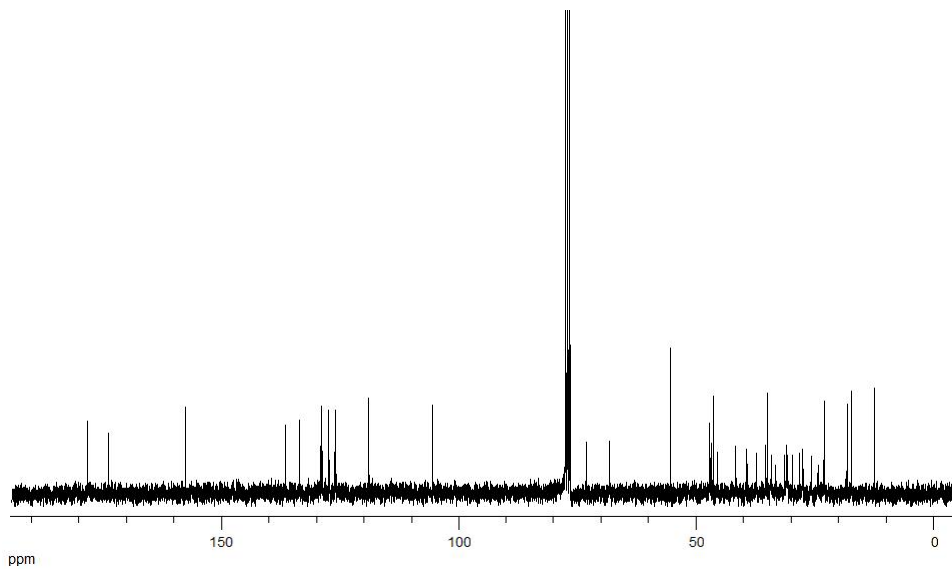
(*R*)-NPX-CA. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.57 (s, 6H, CH_3), 0.87 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.52 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.62 (m, 1H, CH), 3.70 (s ancho, 1H, CH), 3.85 (s, 4H, $\text{OCH}_3 + \text{CH}$), 3.97 (s ancho, 1H, CH), 5.55 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.05-7.10 (m, 2H, Ar-CH), 7.3 (dd, $J = 8.4$ y 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.59-7.68 (m, 3H, Ar-H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.4 (CH_3), 17.2 (CH_3), 18.2 (CH_3), 22.9 (CH_3), 23.2 (CH_2), 24.3 (CH_2), 25.7 (CH), 27.5 (CH_2), 28.3 (CH_2), 29.7 (CH_2), 30.7 (CH_2), 30.9 (CH_2), 33.2 (CH_2), 34.2 (CH_2), 35.0 (C), 35.4 (CH), 37.3 (CH), 39.3 (CH), 41.7 (CH), 45.5 (CH), 46.4 (C), 46.9 (CH), 47.2 (CH), 55.3 (CH_3), 68.3 (CH), 73.0 (CH), 105.7 (CH), 119.6 (CH), 126.1 (CH), 126.3 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (C), 129.2 (CH), 133.7 (C), 136.6 (C), 157.7 (C), 173.9 (CO), 178.3 (CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 620.3966, calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{NO}_6$ (MH^+): 620.3951.

(S)-NPX-CA. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.57 (s, 6H, CH_3), 0.87 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.52 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.62 (m, 1H, CH), 3.70 (s ancho, 1H, CH), 3.85 (s, 4H, $\text{OCH}_3 + \text{CH}$), 3.90 (s ancho, 1H, CH), 5.50 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 7.05-7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.30 (dd, $J = 8.5$ y 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.59-7.67 (m, 3H, Ar-H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 11.4 (CH_3), 16.2 (CH_3), 17.3 (CH_3), 21.9 (CH_3), 22.3 (CH_2), 23.4 (CH_2), 24.8 (CH), 26.5 (CH_2), 27.4 (CH_2), 28.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 32.2 (CH_2), 33.3 (CH_2), 33.9 (CH), 34.2 (C), 36.2 (CH), 38.3 (CH), 40.8 (CH), 44.4 (CH), 45.4 (C), 45.9 (CH), 46.3 (CH), 54.3 (CH_3), 67.2 (CH), 71.9 (CH), 104.6 (CH), 118.1 (CH), 125.0 (CH), 125.3 (CH), 126.5 (CH), 128.0 (C), 128.2 (CH), 132.7 (C), 135.7 (C), 156.7 (C), 172.7 (CO), 177.1 (CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 620.3930, calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{NO}_6$ (MH^+): 620.3951.

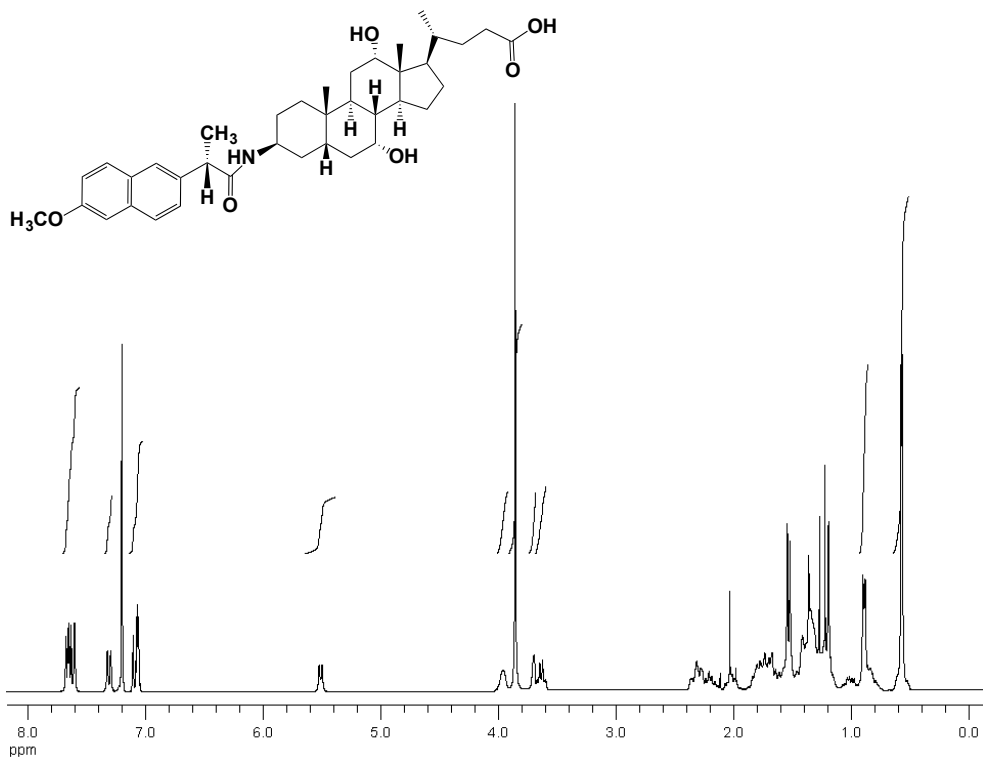
Espectro de ^1H RMN de (*R*)-NPX-CA (CDCl_3 , 300 MHz)



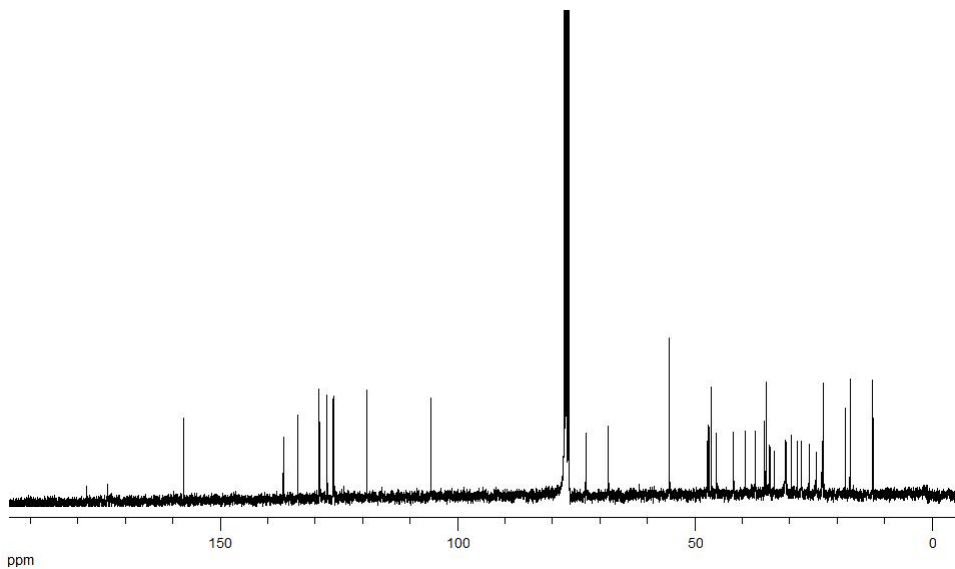
Espectro de ^{13}C RMN de (*R*)-NPX-CA (CDCl_3 , 75 MHz)



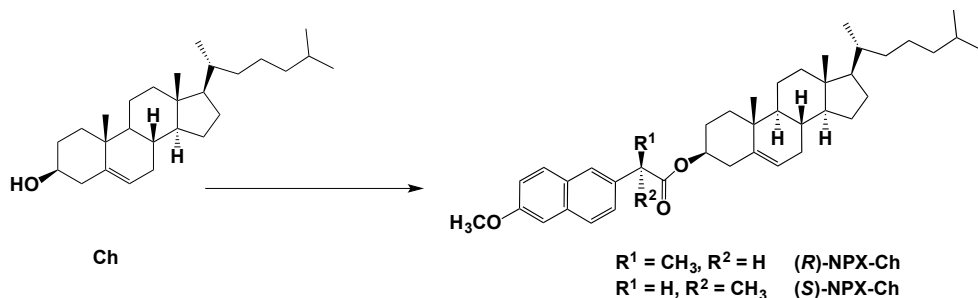
Espectro de ^1H RMN de (S)-NPX-CA (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de (S)-NPX-CA (CDCl_3 , 75 MHz)



3.6.2.4 Síntesis de (*R*)- y (*S*)-NPX-Ch

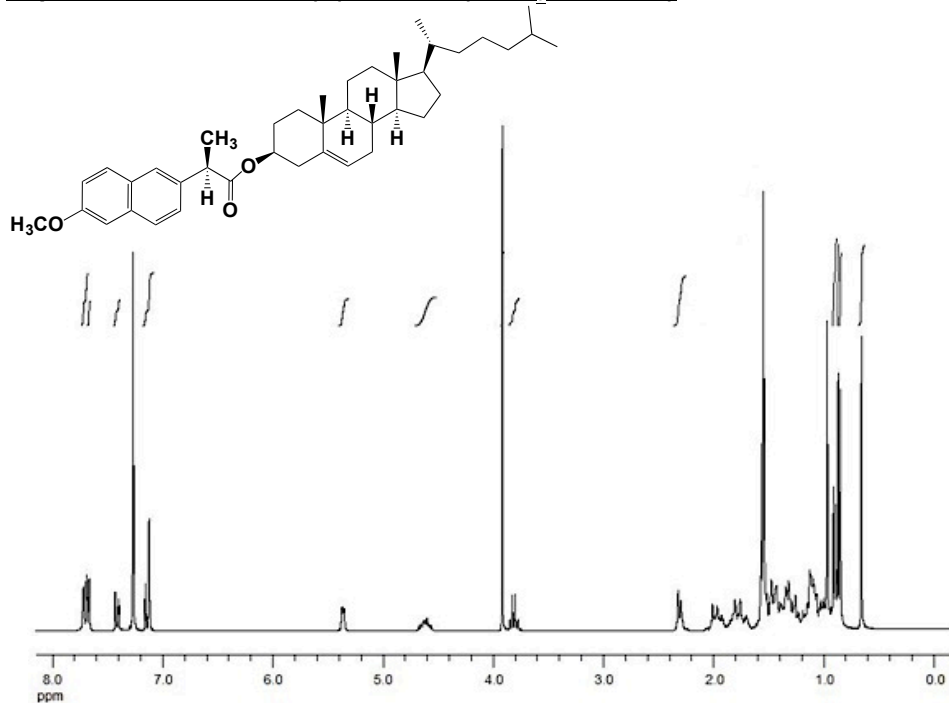


A una disolución enfriada de (*S*)- o (*R*)-NPX (100 mg, 0.43 mmol) en CH_2Cl_2 (1.5 mL), se le añadió poco a poco DCC (136 mg, 0.66 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min. A continuación, se añadió una disolución de **Ch** (131 mg, 0.34 mmol) y DMAP (4 mg, 0.03 mmol) en CH_2Cl_2 (1.2 mL) y se agitó durante 8 h más a la misma temperatura. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró sobre Celita, el filtrado se vertió sobre salmuera y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, secaron bajo Na_2SO_4 y se concentraron. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / CH_2Cl_2 / hexano, 5 : 5 : 90) para obtener (***R***)-NPX-Ch (184 mg, 90 %) o (***S***)-NPX-Ch (203 mg, 99%).

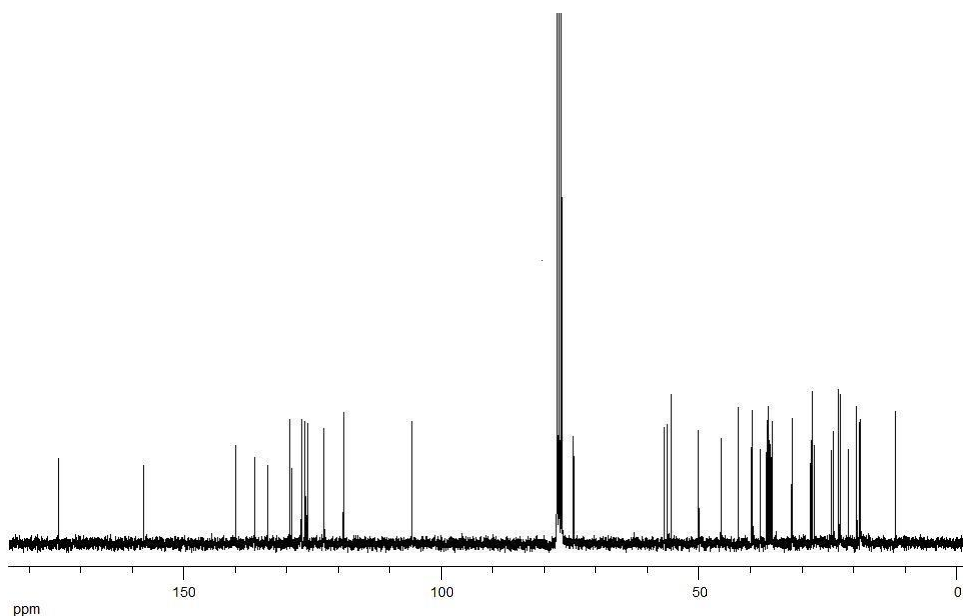
(*R*)-NPX-Ch. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.66 (s, 3H, CH_3), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 0.97 (s, 3H, CH_3), 1.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.31 (m, 2H, CH), 3.81 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 4.62 (m, 1H, CH), 5.36 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, CH), 7.13 (m, 2H, Ar-H), 7.41 (dd, $J = 8.4$ Hz y 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.68 (dd, $J = 8.4$ Hz y 2.7 Hz, 2H, Ar-H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 11.8 (CH_3), 18.6 (CH_3), 18.7 (CH_3), 19.3 (CH_3), 21.0 (CH_2), 22.6 (CH_3), 22.8 (CH_3), 23.8 (CH_2), 24.3 (CH_2), 27.5 (CH_2), 28.0 (CH), 28.2 (CH_2), 31.8 (CH), 31.9 (CH_2), 35.8 (CH), 36.2 (CH_2), 36.6 (C), 36.9 (CH_2), 38.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 39.7 (CH_2), 42.3 (C), 45.7 (CH), 50.0 (CH), 55.3 (CH_3), 56.1 (CH), 56.7 (CH), 74.2 (CH), 105.6 (CH), 118.9 (CH), 122.6 (C), 125.8 (CH), 126.3 (CH), 127.0 (CH), 128.9 (C), 129.3 (CH), 133.6 (C), 136.0 (C), 139.7 (C), 157.6 (C), 174.1 (CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 599.4457, calculada para $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{O}_3$ (MH^+): 599.4459.

(S)-NPX-Ch. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.66 (s, 3H, CH_3), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.90 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 0.96 (s, 3H, CH_3), 1.54 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.18 (m, 2H, CH), 3.80 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 4.61 (m, 1H, CH), 5.28 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, CH), 7.12 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (dd, $J = 8.4$ Hz y 1.8 Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 8.4$ Hz y 2.6 Hz, 2H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 11.9 (CH_3), 18.6 (CH_3), 18.7 (CH_3), 19.3 (CH_3), 21.0 (CH_2), 22.6 (CH_3), 22.8 (CH_3), 23.9 (CH_2), 24.3 (CH_2), 27.7 (CH_2), 28.0 (CH), 28.2 (CH_2), 31.8 (CH), 31.9 (CH_2), 35.8 (CH), 36.2 (CH_2), 36.6 (C), 37.0 (CH_2), 37.8 (CH_2), 39.5 (CH_2), 39.7 (CH_2), 42.3 (C), 45.7 (CH), 50.0 (CH), 55.3 (CH_3), 56.1 (CH), 56.7 (CH), 74.2 (CH), 105.6 (CH), 118.9 (CH), 122.6 (C), 125.9 (CH), 126.3 (CH), 127.0 (CH), 129.0 (C), 129.3 (CH), 133.6 (C), 136.0 (C), 139.6 (C), 157.6 (C), 174.1(CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 599.4456, calculada para $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{O}_3$ (MH^+): 599.4459.

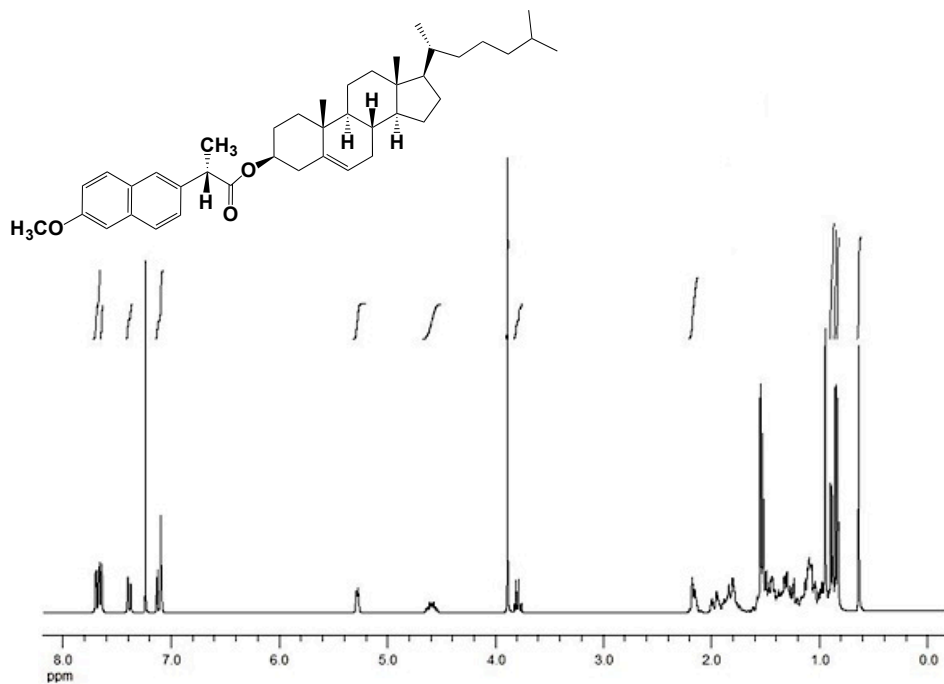
Espectro de ^1H RMN de (*R*)-NPX-Ch (CDCl_3 , 300 MHz)



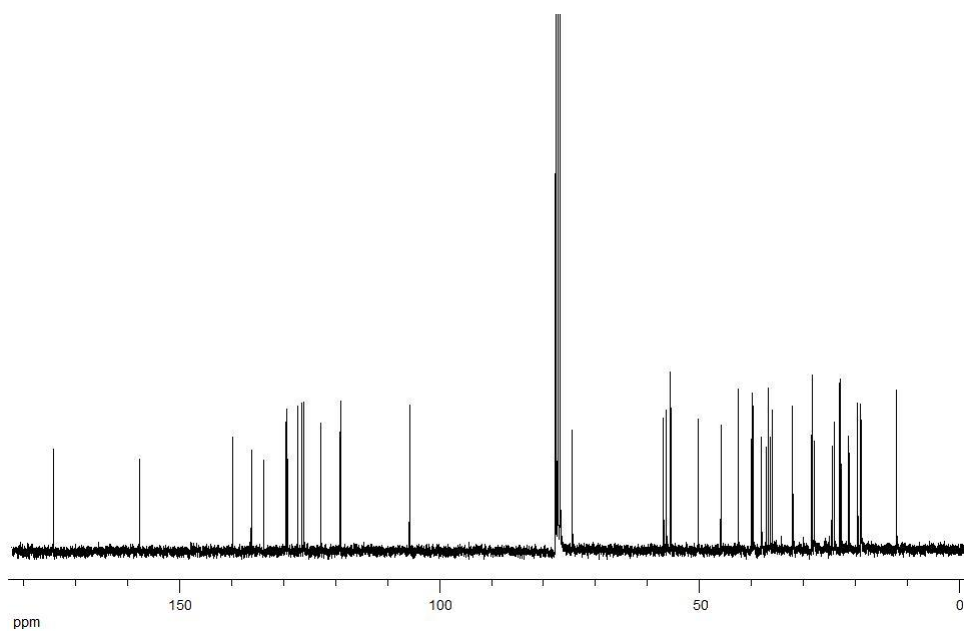
Espectro de ^{13}C RMN de (*R*)-NPX-Ch (CDCl_3 , 75 MHz)



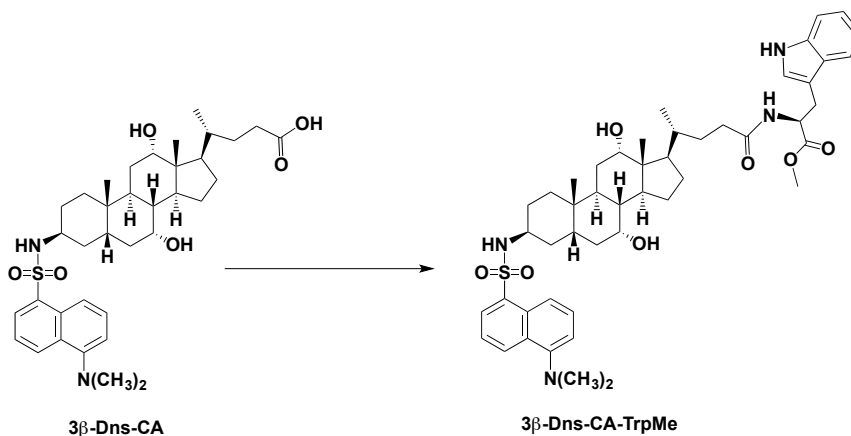
Espectro de ^1H RMN de (S)-NPX-Ch (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de (S)-NPX-Ch (CDCl_3 , 75 MHz)



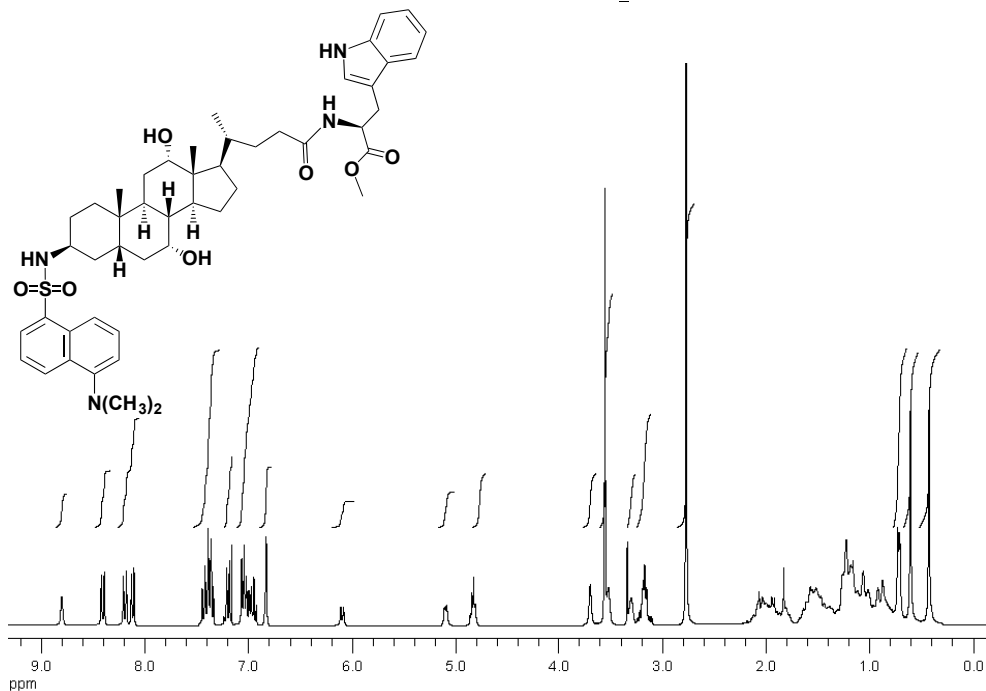
3.6.2.5 Síntesis de 3β-Dns-CA-TrpMe



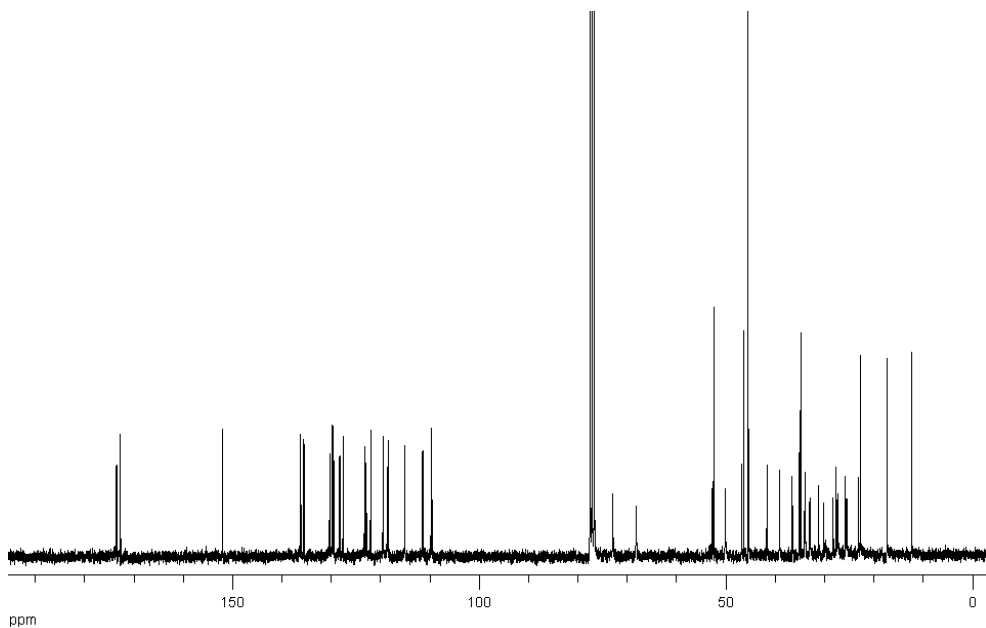
A una disolución de **3β-Dns-CA** (188 mg, 0.29 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL), se añadió EDC (56 μL , 0.32 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo atmósfera de N_2 durante 10 minutos mientras se enfriaba en un baño de hielo. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-TrpMe-HCl (110 mg, 0.43 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL), conteniendo DIEA (76 μL , 0.43 mmol) y 4-Pr-Py (21 mg, 0.14 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 8 h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se vertió sobre agua y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO_3 y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / n-hexano, 80 : 20), se obtuvo **3β-Dns-CA-TrpMe** (120 mg, 48%) como un sólido cristalino de color verdoso.

3 β -Dns-CA-TrpMe. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.45 (s, 3H, CH_3), 0.63 (s, 3H, CH_3), 0.74 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.79 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.19 (m, 2H, CH_2), 3.32 (s ancho, 1H, CH), 3.54 (s ancho, 1H, CH), 3.57 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 1H, CH), 4.85 (m, 1H, CH), 5.11 (s ancho, 1H, NH), 6.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH), 6.85 (s, 1H, Ar-CH), 6.94-7.08 (m, 3H, Ar-CH), 7.10-7.25 (m, 1H, Ar-CH), 7.35-7.46 (m, 3H, Ar-CH), 8.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.82 (s ancho, 1H, NH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.5 (CH_3), 17.4 (CH_3), 22.8 (CH_3), 23.20 (CH_2), 25.6 (CH_2), 25.9 (CH), 27.4 (CH_2), 27.7 (CH_2), 28.5 (CH_2), 30.2 (CH_2), 31.3 (CH_2), 33.0 (CH_2), 33.9 (2 x CH_2), 34.9 (C), 35.2 (CH), 36.5 (CH), 39.2 (CH), 41.7 (CH), 45.5 (2 x CH_3), 46.4 (C), 46.9 (CH), 50.2 (CH), 52.4 (CH_3), 52.8 (CH), 68.3 (CH), 72.9 (CH), 109.7 (C), 111.5 (CH), 115.2 (CH), 118.4 (CH), 118.7 (CH), 119.5 (CH), 122.0 (CH), 123.0 (CH), 123.2 (CH), 127.6 (C), 128.3 (CH), 129.5 (CH), 129.7 (C), 129.8 (C), 130.4 (CH), 135.6 (C), 136.3 (C), 152.0 (C), 172.8 (CONH), 173.5 (COO).

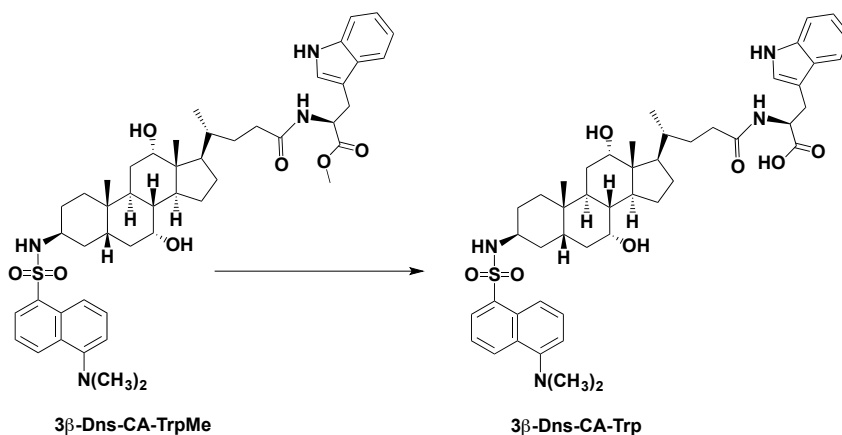
Espectro de ^1H RMN de 3β -Dns-CA-TrpMe (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de 3β -Dns-CA-TrpMe (CDCl_3 , 75 MHz)



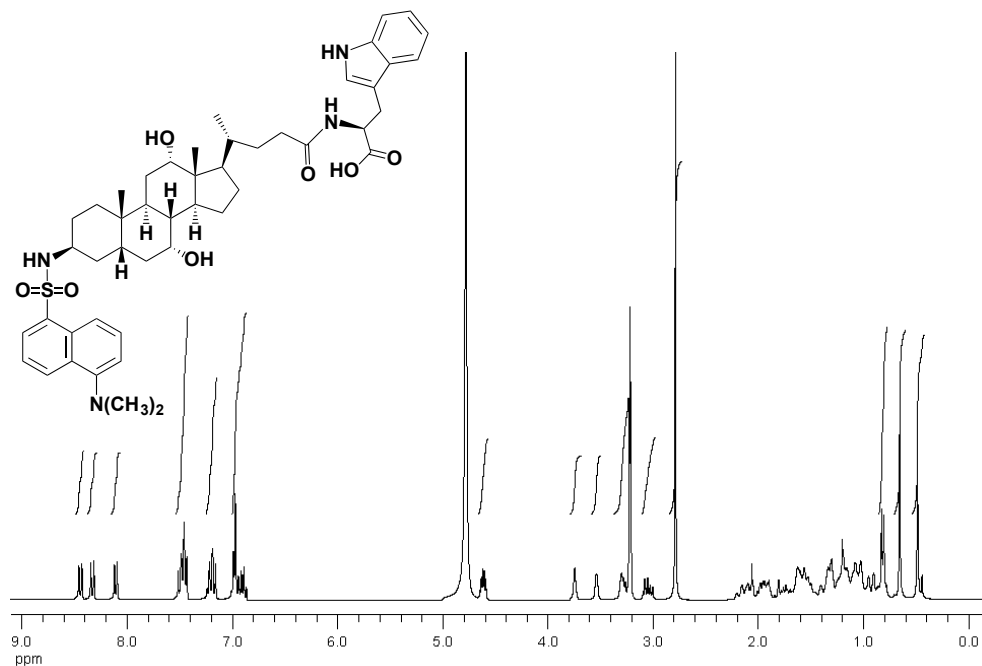
3.6.2.6 Síntesis de 3β-Dns-CA-Trp



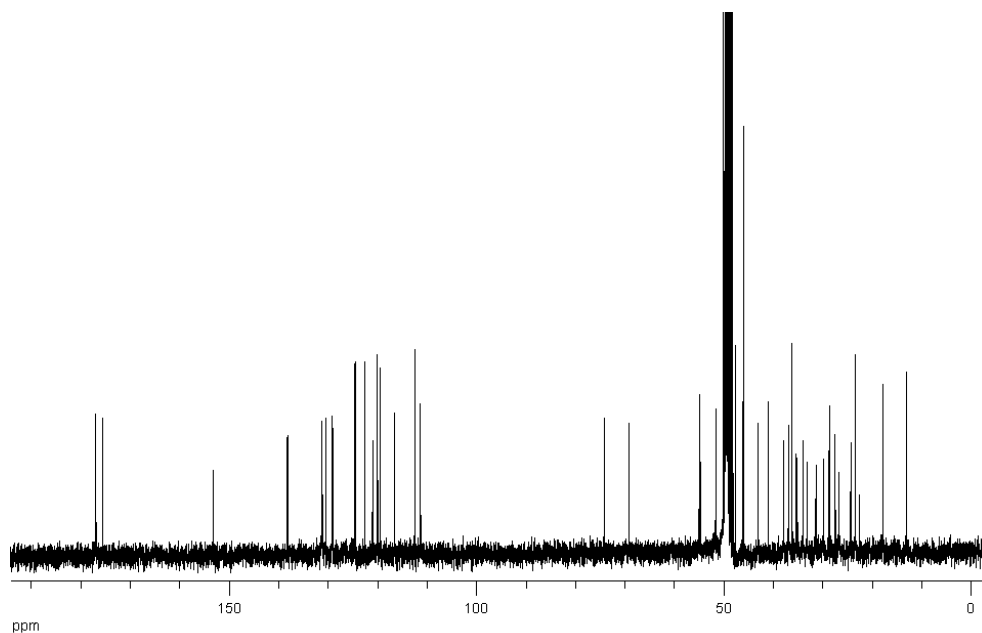
A una disolución de **3β-Dns-CA-TrpMe** (100 mg, 0.12 mmol) en 2 mL de MeOH se adicionó una disolución de KOH en MeOH (1 M, 1.5 mL) y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se evaporó y la mezcla se redisolvió en agua, se acidificó con HCl 1 M, se extrajo con AcOEt y se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt / n-hexano / AcOH, 80 : 20 : 1) para obtener **3β-Dns-CA-Trp** (75 mg, 76%) como un sólido verdoso.

3 β -Dns-CA-Trp. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 0.58 (s, 3H, CH_3), 0.75 (s, 3H, CH_3), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 2.88 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.09-3.18 (m, 1H, CH), 3.35-3.45 (m, 2H, 2 x CH), 3.63 (s ancho, 1H, CH), 3.84 (s ancho, 1H, CH), 4.71 (dd, $J = 8.4$ y 4.8 Hz, 1H, CH), 6.96-7.10 (m, 3H, 3 x Ar-CH), 7.23-7.34 (m, 2H, 2 x Ar-CH), 7.50-7.62 (m, 3H, 3 x Ar-CH), 8.20 (dd, $J = 7.2$ y 1.2 Hz, 1H, Ar-CH), 8.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 12.9 (CH_3), 17.7 (CH_3), 23.3 (CH_3), 24.1 (CH_2), 26.5 (CH_2), 27.3 (CH), 28.5 (2 x CH_2), 29.6 (CH_2), 31.2 (CH_2), 33.0 (CH_2), 33.9 (CH_2), 35.0 (CH_2), 35.2 (CH_2), 36.0 (C), 36.7 (CH), 37.7 (CH), 40.8 (CH), 42.9 (CH), 45.9 (2 x CH_3), 47.5 (C), 48.9 (CH), 51.4 (CH), 54.6 (CH), 69.0 (CH), 74.0 (CH), 111.1 (C), 112.3 (CH), 116.4 (CH), 119.2 (CH), 119.8 (CH), 120.8 (CH), 122.4 (CH), 124.3 (CH), 124.4 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 130.3 (CH), 130.9 (CH), 131.0 (C), 131.1 (C), 137.9 (C), 138.0 (C), 153.0 (C), 175.4 (CONH), 176.7 (COOH). Masa exacta (m/z) obtenida: 827.4385, calculada para $\text{C}_{47}\text{H}_{63}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ (MH^+): 827.4417.

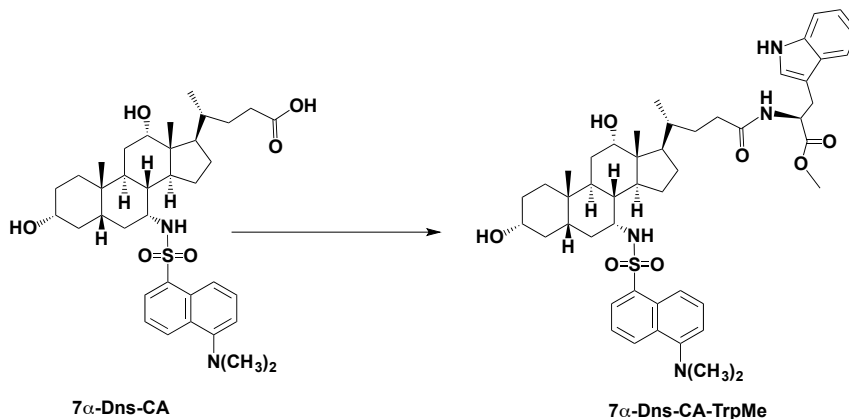
Espectro de ^1H RMN de 3β -Dns-CA-Trp (CD_3OD , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de 3β -Dns-CA-Trp (CD_3OD , 75 MHz)



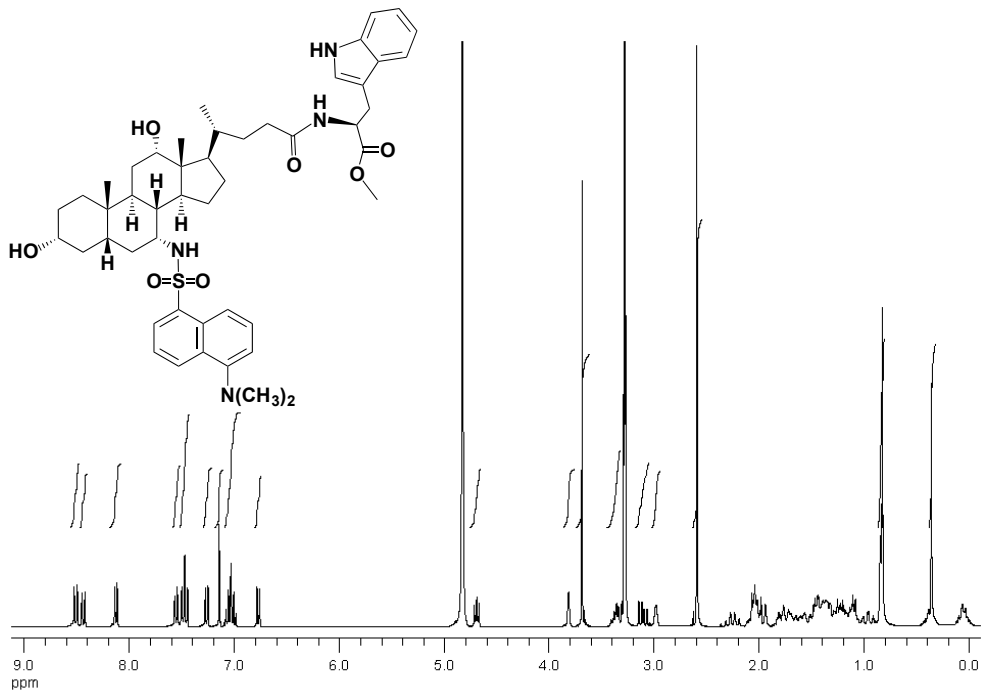
3.6.2.7 Síntesis de 7 α -Dns-CA-TrpMe



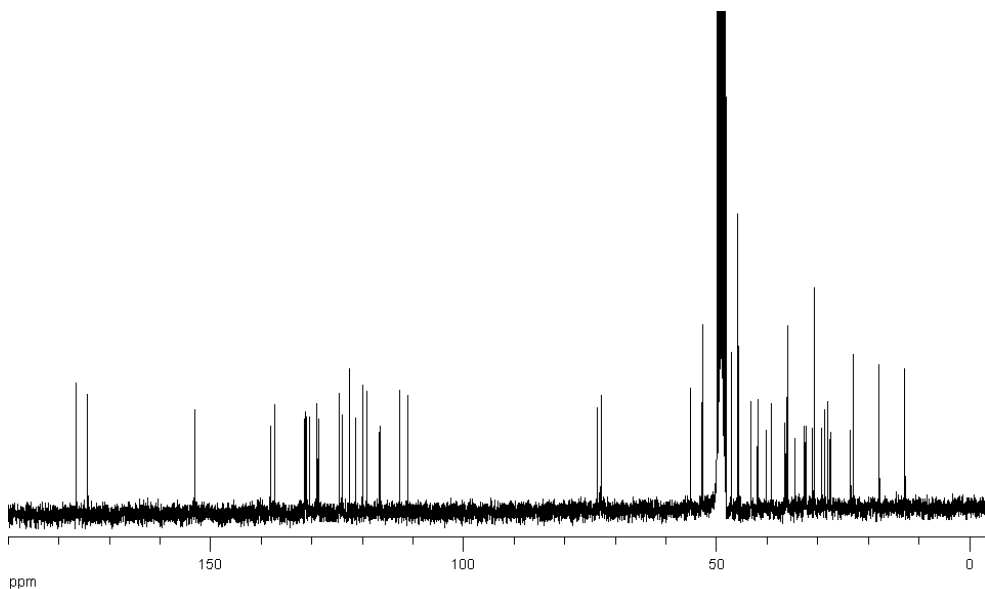
A una disolución de **7 α -Dns-CA** (38 mg, 0.06 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL), se añadió EDC (56 μL , 0.07 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo atmosfera de N_2 durante 10 minutos mientras se enfriaba en un baño de hielo. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-TrpMe·HCl (23 mg, 0.09 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (2 mL), conteniendo DIEA (16 μL , 0.09 mmol) y 4-Pr-Py (4 mg, 0.03 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 7 h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se vertió sobre agua y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO_3 y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / n-hexano, 80 : 20), se obtuvo **7 α -Dns-CA-TrpMe** (18 mg, 36%) como un sólido cristalino de color verdoso.

7 α -Dns-CA-TrpMe. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 0.39 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 3H, CH_3), 0.86 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 2.62 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.01 (s ancho, 1H, CH), 3.08–3.18 (m, 1H, CH), 3.36–3.45 (m, 1H, CH), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s ancho, 1H, CH), 4.72 (dd, $J = 9.0$ y 5.1 Hz, 1H, CH), 6.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar-CH), 6.92–7.02 (m, 2H, 2 x Ar-CH), 7.08 (s, 1H, Ar-CH), 7.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, Ar-CH), 7.41 (dt, $J = 9.0$ y 1.5 Hz, 1H, 2 x Ar-CH), 7.49 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.06 (dd, $J = 7.5$ y 1.2 Hz, 1H, Ar-CH), 8.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 12.7 (CH_3), 17.8 (CH_3), 22.9 (CH_3), 23.5 (CH_2), 27.5 (CH_2), 27.9 (CH), 28.5 (CH_2), 29.2 (CH_2), 31.1 (CH_2), 32.3 (CH_2), 32.6 (CH_2), 34.5 (CH_2), 35.9 (CH), 36.0 (C), 36.4 (CH_2), 39.1 (CH), 40.2 (CH_2), 41.8 (CH), 43.2 (CH), 45.7 (2 x CH_3), 47.0 (CH), 47.1 (C), 52.7 (CH_3), 52.8 (CH), 55.1 (CH), 72.8 (CH), 73.6 (CH), 111.0 (C), 112.6 (CH), 116.5 (CH), 119.1 (CH), 119.5 (CH), 121.3 (CH), 122.6 (CH), 124.0 (CH), 124.5 (CH), 128.7 (C), 129.0 (CH), 130.5 (CH), 131.0 (CH), 131.2 (C), 131.4 (C), 137.3 (C), 138.2 (C), 153.1 (C), 174.3 (CONH), 176.5 (COOH). Masa exacta (m/z) obtenida: 841.4541, calculada para $\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ (MH^+): 841.4574.

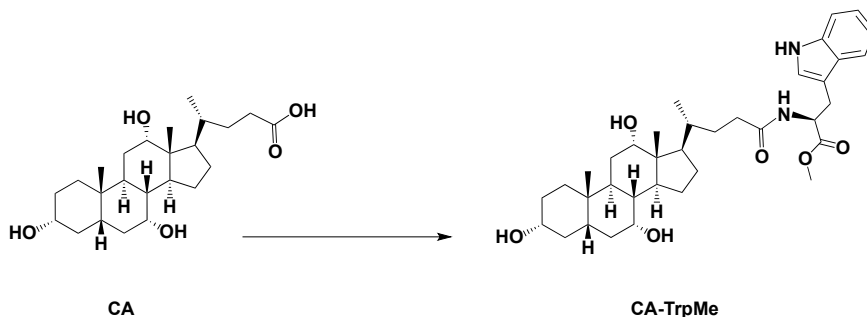
Espectro de ^1H RMN de 7α -Dns-CA-TrpMe (CD_3OD , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de 7α -Dns-CA-TrpMe (CD_3OD , 75 MHz)



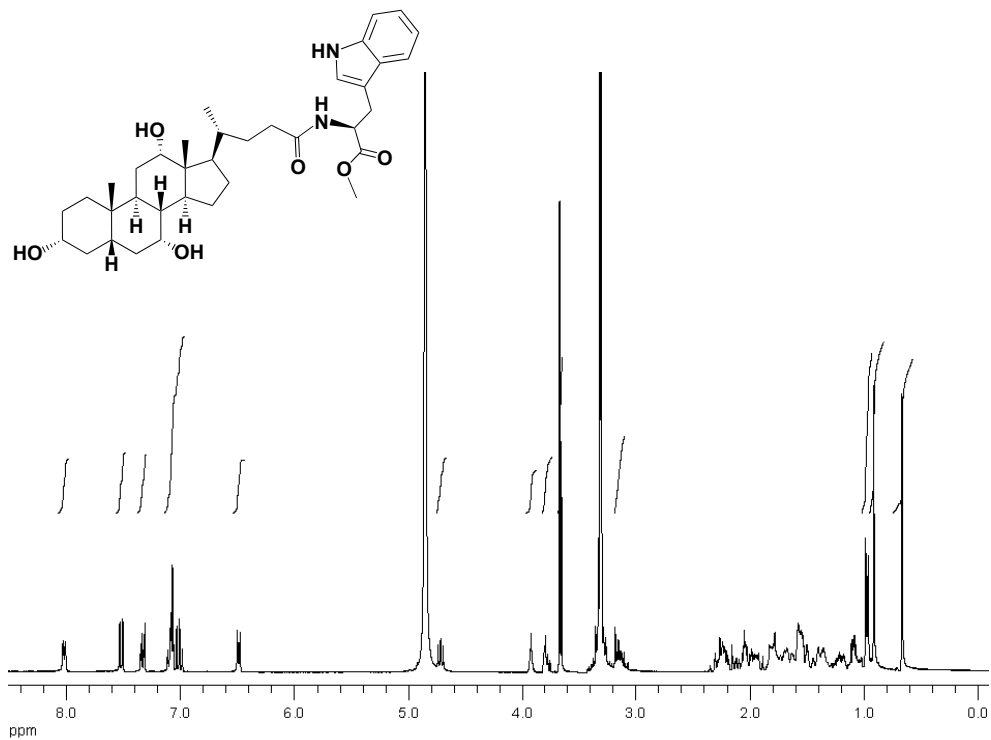
3.6.2.8 Síntesis de CA-TrpMe



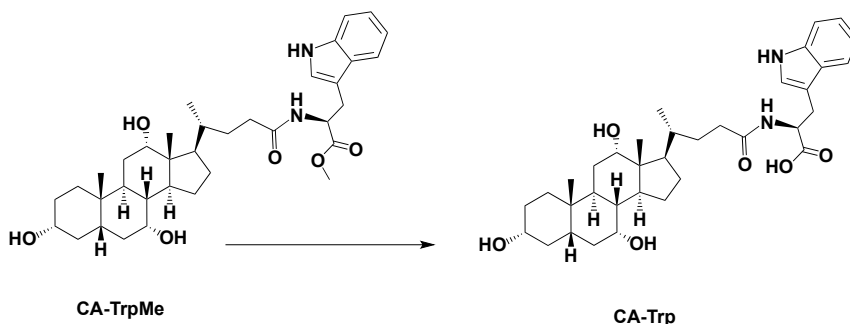
A una disolución de ácido cólico (1 g, 2.45 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 mL), se añadió EDC (477 μL , 2.69 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo atmosfera de N_2 durante 10 minutos mientras se enfriaba en un baño de hielo. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-TrpMe·HCl (935 mg, 3.67 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (30 mL), conteniendo DIEA (600 μL , 3.67 mmol) y 4-Pr-Py (180 mg, 1.22 mmol) y la mezcla de reacción se agitó aproximadamente 8 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se vertió sobre agua y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO_3 y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / n-hexano, 75 : 25), se obtuvo **CA-TrpMe** (850 mg, 57%) como un sólido de color blanco.

CA-TrpMe. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 0.68 (s, 3H, CH_3), 0.93 (s, 3H, CH_3), 0.99 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 3.08-3.20 (m, 1H, CH), 3.68 (s, 3H, CH_3), 3.73-3.80 (m, 1H, CH), 3.94 (s ancho, 1H, CH), 4.74 (dd, $J = 8.4$ y 5.7 Hz, 1H, CH), 6.50 (d ancho, $J = 5.1$ Hz, 1H, NH), 6.99-7.12 (m, 3H, 3 x Ar-CH), 7.32-7.36 (m, 1H, Ar-CH), 7.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Ar-CH), 8.03 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH).

Espectro de ^1H RMN de CA-TrpMe (CD_3OD , 300 MHz)



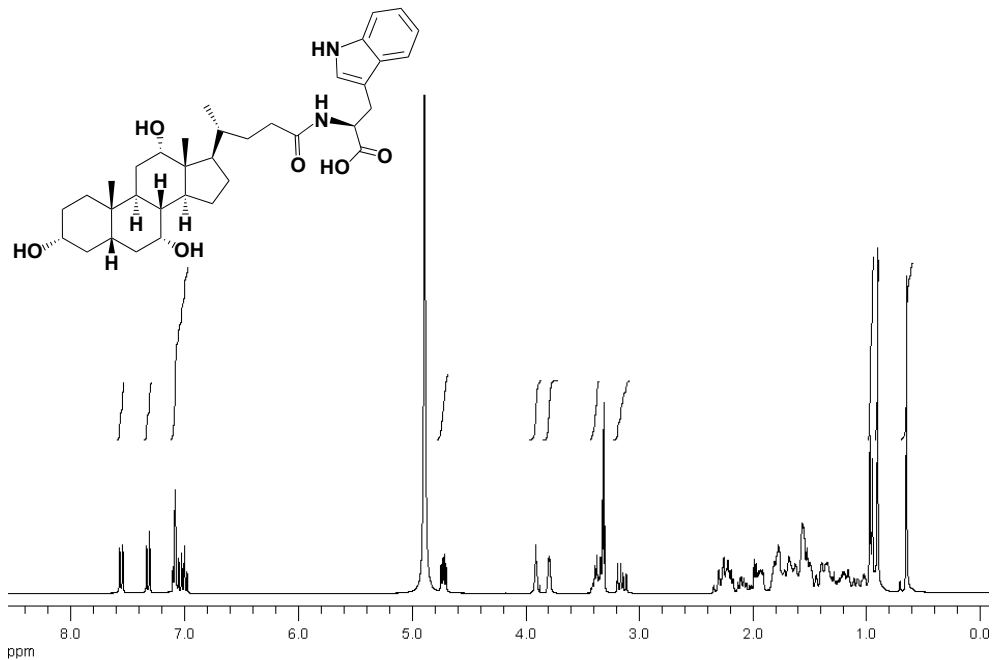
3.6.2.9 Síntesis de CA-Trp



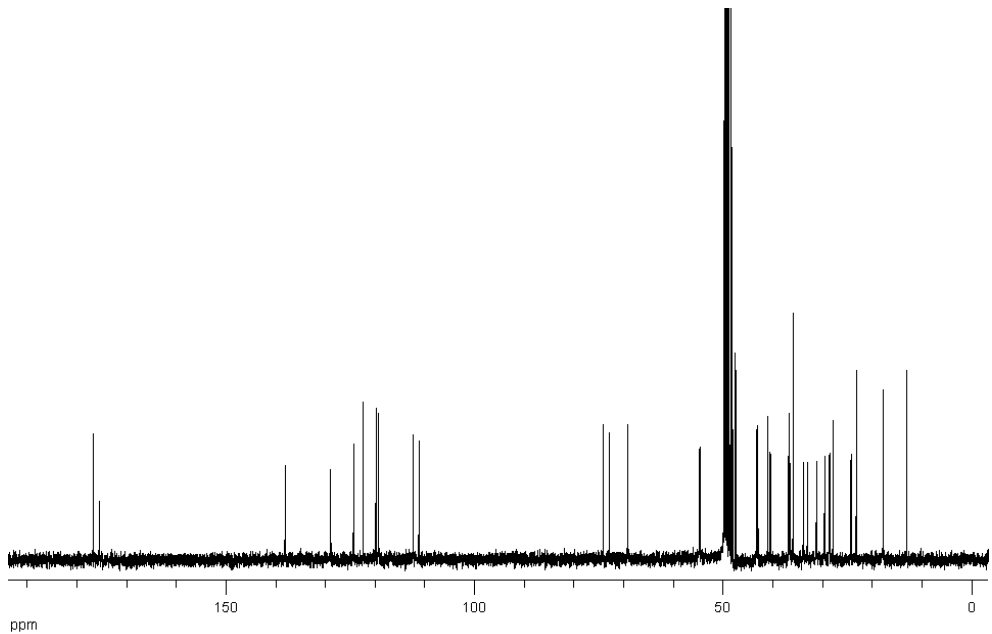
A una disolución de **CA-TrpMe** (150 mg, 0.25 mmol) en 3 mL de MeOH se adicionó una disolución de KOH en MeOH (1 M, 2 mL) y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se evaporó y la mezcla se redisolvió en agua, se acidificó con HCl 1 M, se extrajo con AcOEt y se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt / n-hexano / AcOH, 80 : 20 : 1) para obtener **CA-Trp** (110 mg, 75%) como un sólido blanco.

CA-Trp. ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 0.65 (s, 3H, CH_3), 0.90 (s, 3H, CH_3), 0.96 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 3.15 (dd, $J = 14.7$ y 8.4 Hz, 1H, CH), 3.38 (m, 1H, CH), 3.79 (s ancho, 1H, CH), 3.91 (s ancho, 1H, CH), 4.60 (dd, $J = 8.4$ y 5.1 Hz, 1H, CH), 6.97-7.10 (m, 3H, 3 x Ar-CH), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar-CH), 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, Ar-CH). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 13.0 (CH_3), 17.7 (CH_3), 23.2 (CH_3), 24.2 (CH_2), 27.9 (CH), 28.5 (CH_2), 28.6 (CH_2), 29.6 (CH_2), 31.2 (CH_2), 33.0 (CH_2), 33.8 (CH_2), 35.8 (C), 35.9 (CH_2), 36.5 (CH_2), 36.8 (CH), 40.5 (CH_2), 41.0 (CH), 42.9 (CH), 43.2 (CH), 47.5 (C), 48.0 (CH), 54.6 (CH), 69.1 (CH), 72.9 (CH), 74.0 (CH), 111.1 (C), 112.3 (CH), 119.3 (CH), 119.8 (CH), 122.4 (CH), 124.3 (CH), 128.9 (C), 138.0 (C), 175.5 (CO), 176.7 (COOH). Masa exacta (m/z) obtenida: 595.3733, calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_6$ (MH^+): 595.3747.

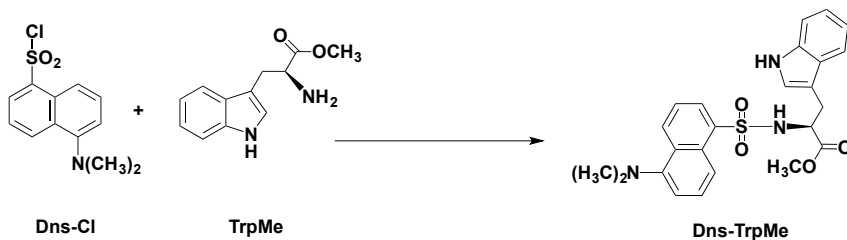
Espectro de ^1H RMN de CA-Trp (CD_3OD , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de CA-Trp (CD_3OD , 75 MHz)



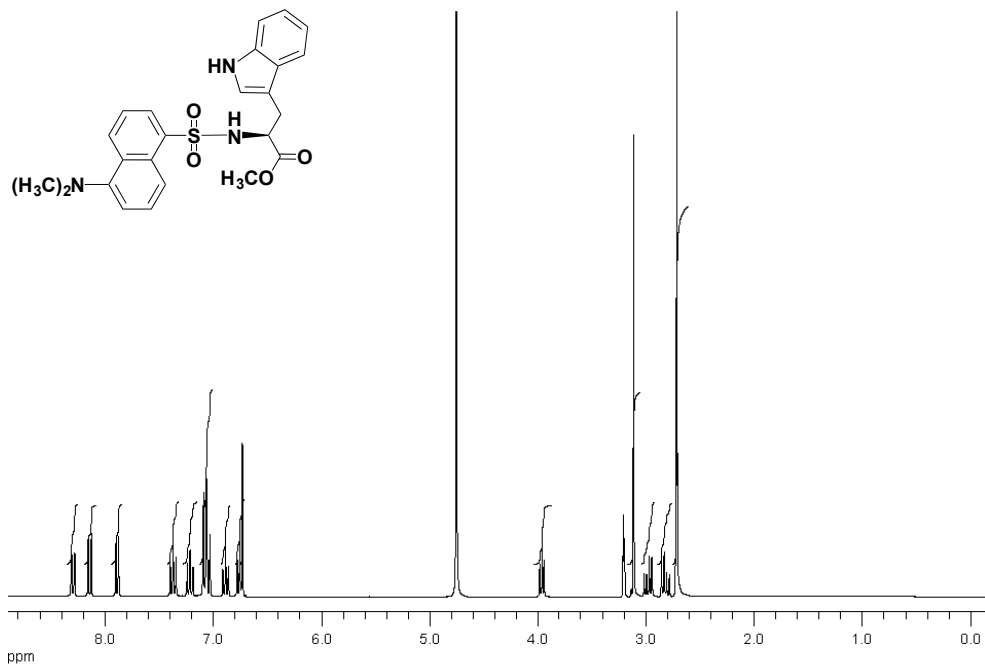
3.6.2.10 Síntesis de Dns-TrpMe



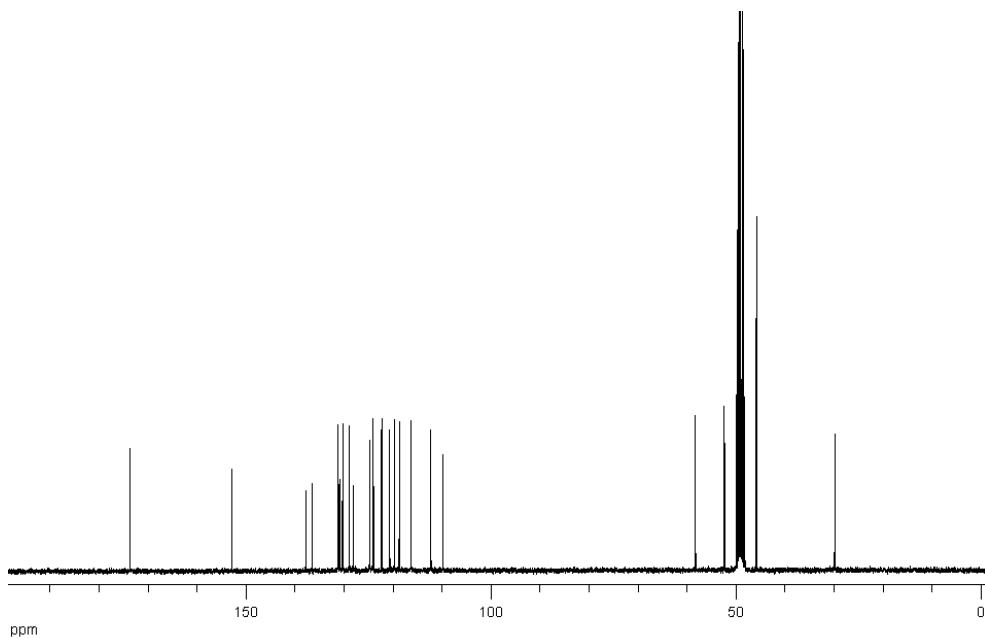
A una disolución de (*S*)-TrpMe·HCl (75 mg, 0.37 mmol) en DMF anhidra (3 mL), se le añadió Et₃N (155 µL, 1.1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo atmósfera de N₂ mientras se enfriaba a 0 °C. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de Dns-Cl (100 mg, 0.37 mmol) en CH₃CN anhidro (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche en ausencia de luz. Posteriormente, el disolvente se evaporó y el crudo de reacción se redisolvió en CH₂Cl₂, se lavó con HCl 1M y salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, CH₂Cl₂ / MeOH, 99.5 : 0.5), se obtuvo **Dns-TrpMe** (84 mg, 50%) como un sólido verdoso.

Dns-TrpMe. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 2.71 (s, 6H, 2 x CH₃), 2.82 (dd, *J* = 14.4 y 7.5 Hz, 1H, CH), 2.98 (dd, *J* = 14.4 y 6.9 Hz, 1H, CH), 3.10 (s, 3H, CH₃), 3.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH), 6.73 (s ancho, 1H, Ar-CH), 6.75 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-CH), 6.88 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.06 (m, 3H, 3 x Ar-CH), 7.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-CH), 7.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH), 7.88 (d ancho, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar-CH), 8.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-CH), 8.29 (d ancho, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-CH). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 29.8 (CH₂), 45.7 (2 x CH₃), 52.3 (CH₃), 58.2 (CH), 109.7 (C), 112.2 (CH), 116.4 (CH), 118.7 (CH), 119.7 (CH), 120.6 (CH), 122.3 (CH), 124.0 (CH), 124.7 (CH), 128.1 (C), 128.9 (CH), 130.2 (CH), 130.7 (C), 131.0 (C), 131.2 (CH), 136.5 (C), 137.8 (C), 152.9 (C), 173.6 (COO). Masa exacta (*m/z*) obtenida: 452.1628, calculada para C₂₄H₂₆N₃O₄S (MH⁺): 452.1644.

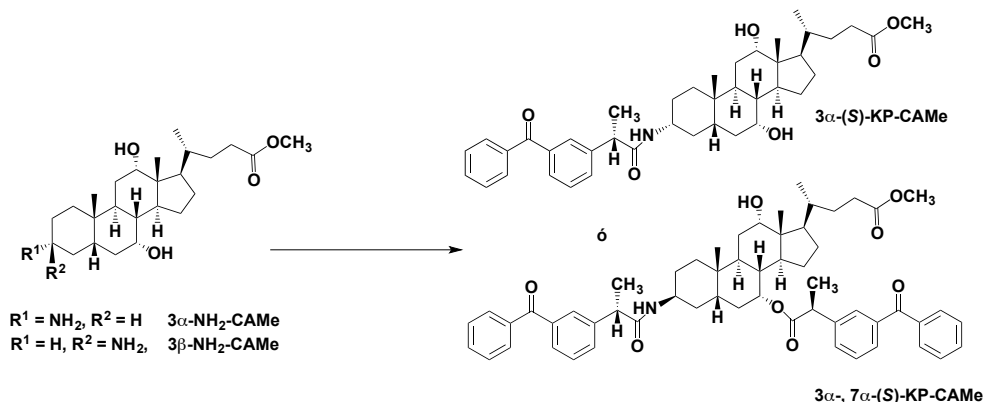
Espectro de ^1H RMN de Dns-TrpMe (CD_3OD , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de Dns-TrpMe (CD_3OD , 75 MHz)



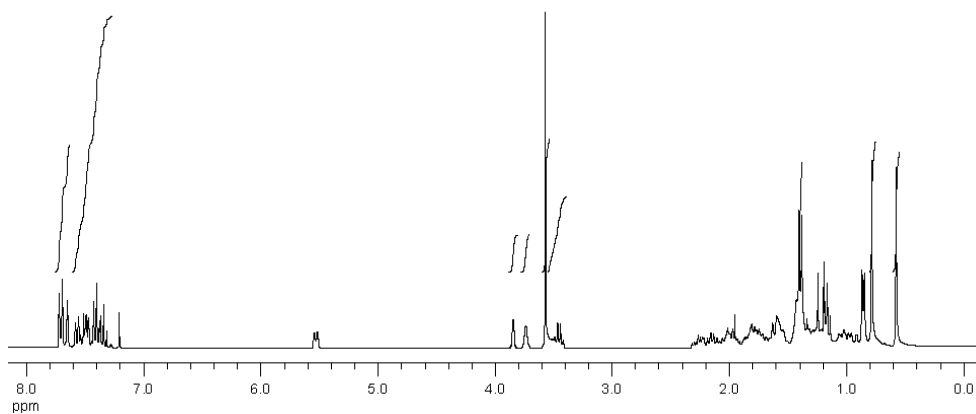
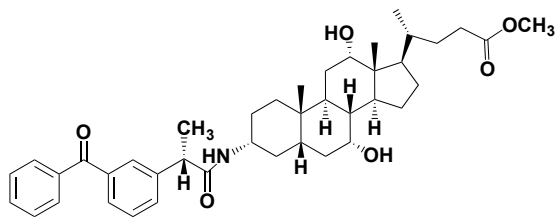
3.6.2.11 Síntesis de 3 α - y 3 β -(S)-KP-CAMe



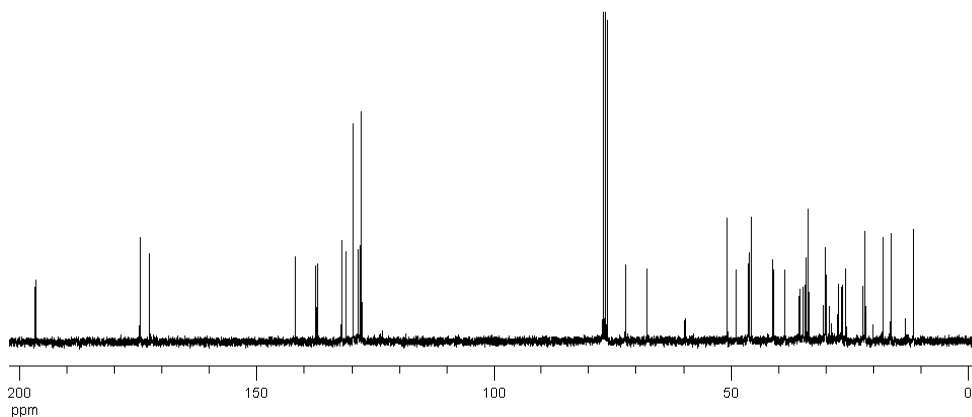
A una disolución de (S)-KP (270 mg, 1.07 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 mL), se añadió EDC (312 μ L, 1.14 mmol) y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente. Luego, se añadió gota a gota una disolución de **3 α -NH₂-CAMe** o **3 β -NH₂-CAMe**⁹⁵ (300 mg, 0.71 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 mL), conteniendo DIEA (310 μ L, 1.77 mmol) y 4-Pr-Py (52 mg, 0.33 mmol) bajo atmósfera de N₂ y la mezcla de reacción se agitó durante aproximadamente 25 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se vertió sobre agua y se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt / n-hexano, 50 : 50), se obtuvo **3 α -(S)-KP-CAMe** (255 mg, 55%) como un sólido cristalino de color blanco. En el caso de la obtención de **3 β -(S)-KP-CAMe**, donde se obtuvo el diconjugado **3 β -, 7 α -(S)-KP-CAMe** (230 mg, 36%), no se muestran los espectros de ¹H y ¹³C de RMN, se sometió a hidrólisis básica, para obtener el ácido deseado.

3 α -(S)-KP-CAMe. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.65 (s, 3H, CH_3), 0.85 (s, 3H, CH_3), (0.92 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.45 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 3.45-3.60 (señal compleja, 2H, CH (KP) + CH), 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 1H, CH), 3.90 (s, 1H, CH), 5.59 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH), 7.32-7.78 (señal compleja, 9H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.5 (CH_3), 17.3 (CH_3), 18.9 (CH_3), 22.6 (CH_3), 23.1 (CH_2), 26.7 (CH), 27.4 (CH_2), 27.6 (CH_2), 28.3 (CH_2), 30.9 (CH_2), 31.0 (CH_2), 34.5 (CH_2), 34.6 (C), 35.2 (CH), 35.7 (CH_2), 36.4 (CH_2), 39.4 (CH), 41.8 (CH), 42.0 (CH), 46.5 (C), 46.9 (CH), 47.2 (CH), 49.7 (CH), 51.5 (CH_3), 68.3 (CH), 72.9 (CH), 128.3 (CH x 2), 128.7 (CH), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 130.1 (CH x 2), 131.5 (CH), 132.5 (CH), 137.5 (C), 137.8 (C), 142.2 (C), 172.7 (CONH), 174.8 (COO), 196.6 (CO).

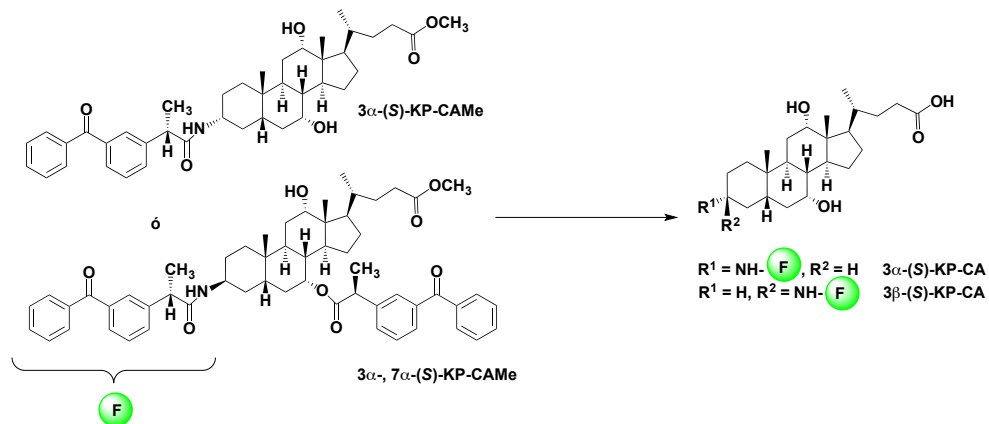
Espectro de ^1H RMN de 3 α -(S)-KP-CAMe (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de 3 α -(S)-KP-CAMe (CDCl_3 , 75 MHz)



3.6.2.12 Síntesis de 3 α - y 3 β -(S)-KP-CA

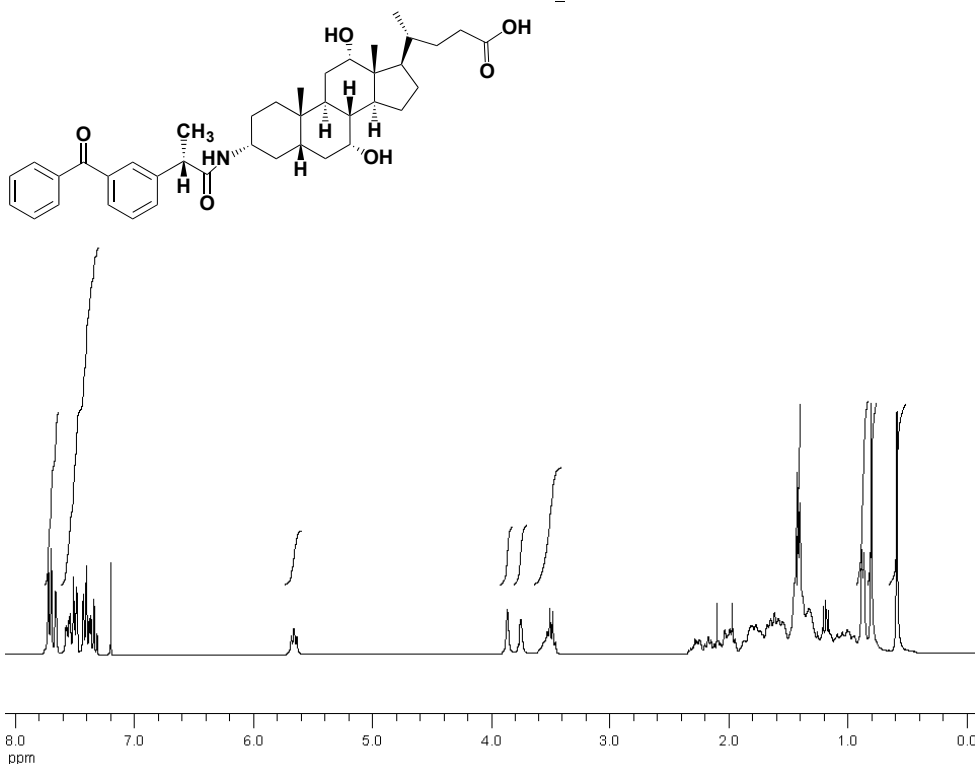


A una disolución de 3 α -(S)-KP-CAMe (110 mg, 0.17 mmol) o 3 β -,7 α -(S)-KP-CAMe (152 mg, 0.17 mmol) en 4 mL de MeOH se adicionó una disolución de KOH en MeOH (1 M, 3.6 mL) y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se evaporó en un rotavapor, y la mezcla se redisolvió en agua, se acidificó con HCl 1 M, se extrajo con AcOEt y se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, CH₃CN / n-hexano / AcOH, 75 : 25 : 1) para obtener 3 α -(S)-KP-CA (35.4 mg, 33%) o 3 β -(S)-KP-CA (41 mg, 38%).

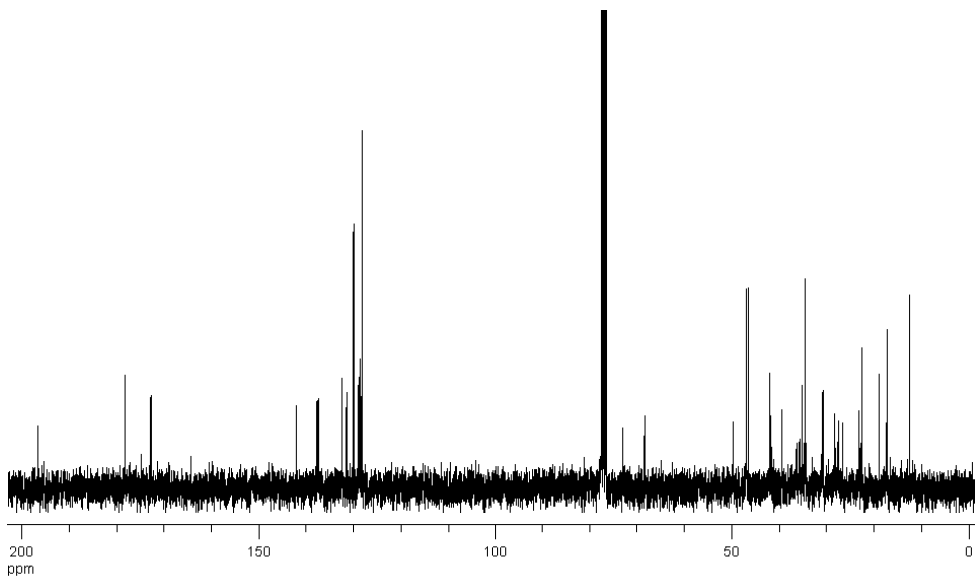
3 α -(S)-KP-CA. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.65 (s, 3H, CH_3), 0.87 (s, 3H, CH_3), 0.94 (d, $J = 5.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.48 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 3.50-3.66 (m, 2H, CH (KP) + CH), 3.82 (s ancho, 1H, CH), 3.93 (s ancho, 1H, CH), 5.72 (s ancho, 1H, NH), 7.35-7.82 (señal compleja, 9H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.5 (CH_3), 17.3 (CH_3), 18.9 (CH_3), 22.6 (CH_3), 23.2 (CH_2), 26.6 (CH), 27.5 (CH_2), 28.3 (CH_2), 30.8 (CH_2), 30.9 (CH_2), 34.5 (CH_2), 34.6 (C), 35.2 (CH), 35.7 (CH_2), 36.2 (CH_2), 36.4 (CH_2), 39.4 (CH), 41.7 (CH), 41.9 (CH), 46.5 (C), 46.9 (2 x CH), 49.8 (CH), 68.5 (CH), 73.1 (CH), 128.3 (CH x 2), 128.7 (CH), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 130.1 (CH x 2), 131.6 (CH), 132.6 (CH), 137.4 (C), 137.8 (C), 142.2 (C), 172.9 (CONH), 178.4 (COOH), 196.7 (CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 644.3945, calculada para $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{NO}_6$ (MH^+): 644.3951.

3 β -(S)-KP-CA. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0.57 (s, 3H, CH_3), 0.71 (s, 3H, CH_3), 0.88 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.47 (d, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 3.57 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH), 3.72 (s, 1H, CH), 3.87 (s, 1H, CH), 3.96 (s, 1H, CH), 5.64 (s ancho, 1H, NH), 7.35-7.72 (señal compleja, 9H, Ar-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 12.5 (CH_3), 17.3 (CH_3), 18.5 (CH_3), 23.1 (CH_3), 23.2 (CH_2), 24.3 (CH_2), 24.5 (CH_2), 25.9 (CH), 27.6 (CH_2), 28.3 (CH_2), 30.8 (CH_2), 31.1 (CH_2), 33.3 (CH_2), 34.2 (CH_2), 35.1 (C), 35.4 (CH), 37.5 (CH), 39.3 (CH), 41.7 (CH), 45.6 (CH), 46.5 (C), 46.9 (CH), 47.1 (CH), 68.3 (CH), 73.1 (CH), 128.4 (2 x CH), 128.9 (CH), 129.1 (CH), 130.0 (2 x CH), 131.5 (CH), 131.6 (CH), 132.6 (CH), 137.4 (C), 138.0 (C), 142.1 (C), 173.0 (CONH), 178.4 (COOH), 196.6 (CO). Masa exacta (m/z) obtenida: 644.3947, calculada para $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{NO}_6$ (MH^+): 644.3951.

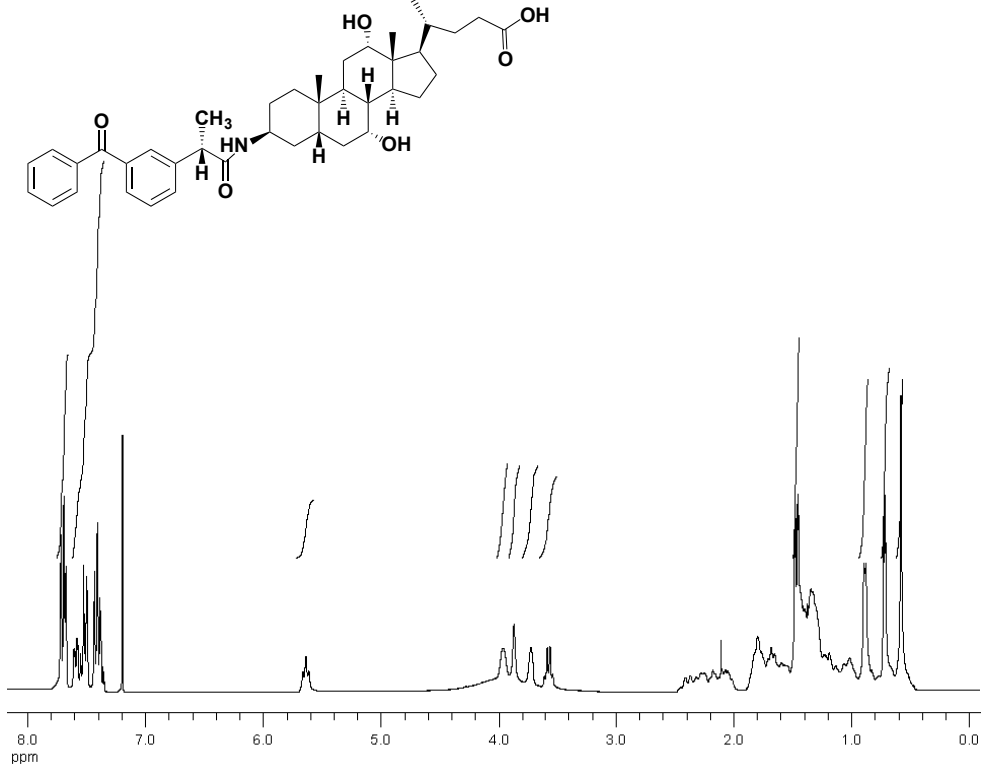
Espectro de ^1H RMN de $3\alpha\text{-(S)}$ -KP-CA (CDCl_3 , 300 MHz)



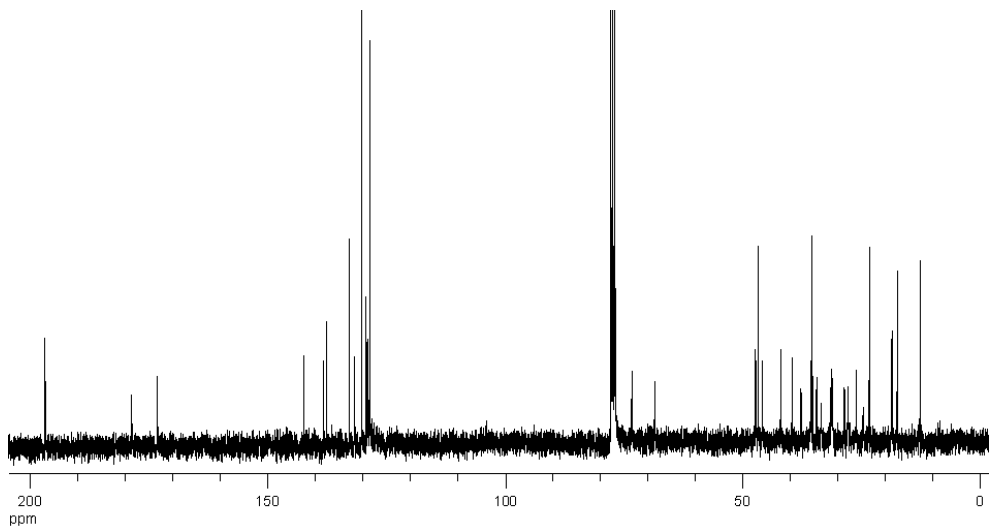
Espectro de ^{13}C RMN de $3\alpha\text{-(S)}$ -KP-CA (CDCl_3 , 75 MHz)



Espectro de ^1H RMN de $3\beta\text{-(S)-KP-CA}$ (CDCl_3 , 300 MHz)



Espectro de ^{13}C RMN de $3\beta\text{-(S)-KP-CA}$ (CDCl_3 , 75 MHz)



3.7 Conclusiones

Se han preparado nuevos derivados del ácido cólico y del colesterol empleando diferentes fluoróforos, como son dansilo, naproxeno, triptófano y ketoprofeno. Para los derivados de ácido cólico, se partió del CA siguiendo rutas sintéticas optimizadas previamente en el grupo de investigación, que permitieron obtener regio- y estereoselectivamente los aminoderivados en las posiciones **3 α -**, **3 β -** o **7 α -**. A partir de éstos se sintetizaron los derivados de dansilo en las tres posiciones el derivado **3 β -** de naproxeno y los derivados **3 α -** y **3 β -** de ketoprofeno. Se utilizaron los derivados **3 β -** y **7 α -Dns-CA** para la preparación de los derivados de triptófano. Además, se prepararon dos derivados de triptófano adicionales, uno de ellos a partir de ácido cólico, y otro uniendo directamente triptófano con cloruro de dansilo. En el caso del colesterol, los derivados se prepararon mediante esterificación directa y así se obtuvieron los derivados de dansilo y naproxeno. Todos los productos nuevos **Dns-Ch**, **(R)-NPX-CAMe**, **(R)-NPX-CA**, **(S)-NPX-CAMe**, **(S)-NPX-CA**, **(R)-NPX-Ch**, **(S)-NPX-Ch**, **3 β -Dns-CA-TrpMe**, **3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe**, **CA-TrpMe**, **CA-Trp**, **Dns-TrpMe**, **3 α -(S)-KP-CAMe**, **3 α -(S)-KP-CA** y **3 β -(S)-KP-CA** se caracterizaron por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C y en el caso de los productos finales además mediante análisis de masa exacta.

Capítulo 4

**Dansil derivados de ácido cólico empleados como
herramientas para construir el diagrama de
especiación de la agregación de sales biliares**

4.1 Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos biliares (ABs) son una familia de esteroides naturales biosintetizados en el hígado a partir del colesterol,¹ que juegan un papel clave en diversas funciones fisiológicas y son los principales productos finales del metabolismo del colesterol. Cabe destacar además, que ayudan a la solubilización de los lípidos mediante la formación de micelas mixtas y estimulan la secreción biliar de fosfolípidos.^{2,39} La estructura química de los ABs incluye una fusión inusual *cis* entre los anillos A y B, un número variable de grupos hidroxilo en la cara α y una cadena corta con un grupo carboxílico terminal. Todas estas características los hacen entidades anfífilas, con la cara α de carácter hidrofílico y la cara β hidrófoba, lo que resulta en una tendencia a auto-agregarse en disolución.^{49,105}

Los ABs naturales se dividen en primarios (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico) que se biosintetizan directamente a partir del colesterol y se encuentran en su mayor parte conjugados con los aminoácidos glicina y taurina; y secundarios (ácidos desoxicólico y litocólico), obtenidos a partir de los correspondientes ABs primarios tras la desconjugación del aminoácido y deshidroxilación en posición C-7. El ácido ursodesoxicólico es el epímero C-7 β del ácido quenodesoxicólico, y se encuentra como un producto natural en seres humanos a bajas concentraciones, pero además se utiliza como un fármaco anticoléstatco.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Las estructuras de todos los ácidos biliares se muestran en la **Figura 1.2 del capítulo 1**.

Aunque las principales funciones fisiológicas de los ABs se deben a su capacidad para formar agregados en disolución, la formación de los mismos sigue siendo un tema de discusión. Actualmente, el modelo de agregación primaria/secundaria propuesto por Small³⁹ y sus colaboradores, basado en las diferencias observadas en el ensanchamiento de las señales en la parte hidrófoba e hidrófila por resonancia magnética nuclear, está comúnmente aceptado.^{2,39,49} Según este modelo, a bajas concentraciones de sales biliares, la interacción de las caras hidrófobas de un pequeño número de monómeros (2-8) conduce a la formación de agregados primarios.

Cuando la concentración de sal biliar aumenta, se produce la aglomeración para dar lugar a los agregados secundarios (**Figura 4.1**). Sin embargo, cómo influye el número de grupos hidroxilo, o la conjugación con glicina o taurina aún no está totalmente resuelto. Además, la información específica acerca de la distribución de los diferentes tipos de agregados en un amplio intervalo de concentraciones, sigue sin resolverse.

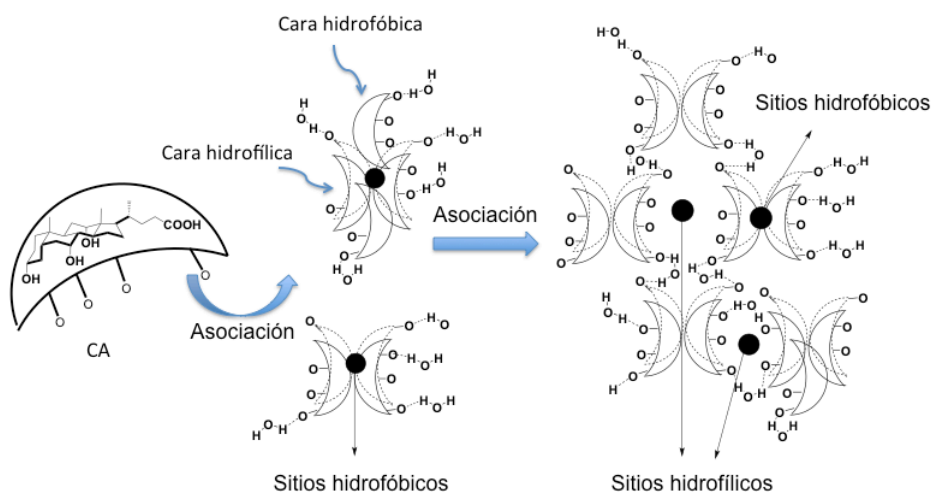


Figura 4.1. Representación esquemática de los agregados de ácido cólico (CA).

Se han utilizado diferentes técnicas experimentales para profundizar en el conocimiento de la agregación de los ABs. Éstas incluyen, por ejemplo, RMN,^{2,39,49} así como técnicas fotofísicas en estado estacionario y tiempo resuelto.^{51,109-115} En concreto, la relación de las intensidades de fluorescencia de las bandas vibrónicas del pireno se ha utilizado para determinar las concentraciones micelares críticas (cmc).¹¹⁶⁻¹¹⁹ Sin embargo, debido al hecho de que los agregados de ABs crecen en tamaño con el aumento de la concentración, el rango de cmc de los ABs es más amplio que el de otros tensioactivos y por lo tanto difícil de determinar. Incluso más complejo es el problema de estimar las cantidades relativas de los distintos agregados que pueden coexistir en las diferentes etapas.

En el grupo de investigación, se ha publicado la síntesis de derivados fluorescentes de ácido cólico (CA) para investigar la cinética de captación de los ácidos biliares por hepatocitos, así como su complejación con albúmina sérica humana. A estos efectos, se han unido covalentemente en las posiciones 3 α -, 3 β -, 7 α -, y 7 β - del ácido cólico los cromóforos 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD) y dansilo (Dns).^{95,120,121} Además, se ha demostrado que producen cambios mínimos en la molécula, por lo que no afectan significativamente al comportamiento fisiológico de los compuestos originales.¹²²

Con estos antecedentes, en el presente capítulo, se utilizarán las sondas fluorescentes derivadas de ácido cólico para investigar la agregación de los ácidos biliares, específicamente, **3 α -**, **3 β -**, y **7 α -Dns-CA** (**Figura 4.2**). Por medio de técnicas fotofísicas en estado estacionario y tiempo resuelto, se establecerá el porcentaje de los diferentes agregados en función de la concentración de sal biliar.

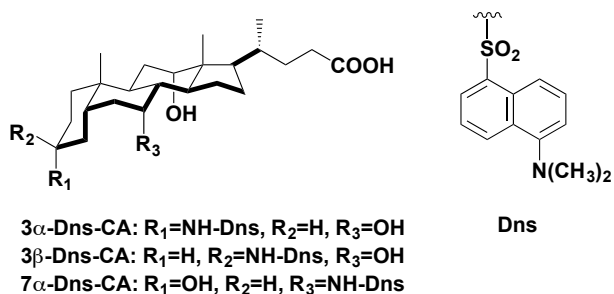


Figura 4.2. Estructuras de los derivados de dansilo utilizados para la caracterización de los agregados de ABs.

4.2 Resultados y discusión

En primer lugar, se procedió a estudiar las propiedades fotofísicas de los derivados de dansilo en disolución acuosa, para posteriormente, compararlas con las observadas en presencia de diferentes concentraciones de sal biliar de cada uno de los ABs. Los resultados obtenidos se muestran en los siguientes apartados.

4.2.1 Propiedades fotofísicas de los derivados de dansilo en disolución

Los espectros UV-vis de **3 α -**, **3 β -** y **7 α -Dns-CA** en disolución acuosa (NaCl 0,2 M) exhibieron un máximo alrededor de 330 nm y un hombro a \sim 250 nm (véase **3 α -Dns-CA** como ejemplo en la **Figura 4.3**). Los espectros de fluorescencia de los tres derivados mostraron un máximo a \sim 545 nm. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron en disolución salina acuosa al aire y resultaron ser aprox. 0,05 para los derivados **3 α -** y **3 β -** y 0,07 para **7 α -Dns-CA**. El tiempo de vida de singlete (τ_S) varió de 4,8 - 4,9 ns para **3 α -** y **3 β -Dns-CA** a 7,4 ns para **7 α -Dns-CA**. La dansilglicina (**Dns-Gly**), que se empleará en los experimentos que se describen a continuación, presentó un espectro UV-vis idéntico a los dansil derivados en disolución salina acuosa. El espectro de fluorescencia mostró un máximo a \sim 558 nm, se obtuvo un ϕ_F de 0,03 y el τ_S fue de 1,5 ns, inferior al obtenido para los dansil derivados.

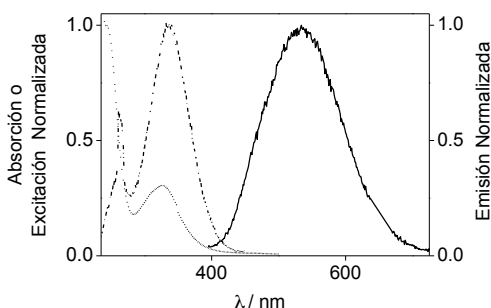


Figura 4.3. Espectro de absorción (····), excitación (----) y emisión (—) normalizados de **3 α -Dns-CA** en NaCl acuoso 0,2 M.

4.2.2 Propiedades fotofísicas de los derivados de dansilo en presencia de sales biliares

En primer lugar, era necesario elegir un ácido biliar representativo para comenzar a explorar la interacción entre los diferentes ABs y los derivados de dansilo sintetizados. Se eligió el ácido cólico, ya que los derivados de dansilo fueron sintetizados a partir de éste y es uno de los ABs mayoritarios.¹²³

A continuación, se examinó el comportamiento de los derivados de dansilo en presencia de colato sódico (NaCA). Así, se registraron los espectros de absorción y emisión de las disoluciones salinas de los diferentes Dns-CAs (20 μ M) hasta concentraciones 50 mM de NaCA.

La adición de NaCA (no fluorescente) no produjo cambios significativos en los espectros de absorción de ninguno de los tres derivados de dansilo, además, se encontró un punto isosbético a 330 nm (**Figura 4.4**).

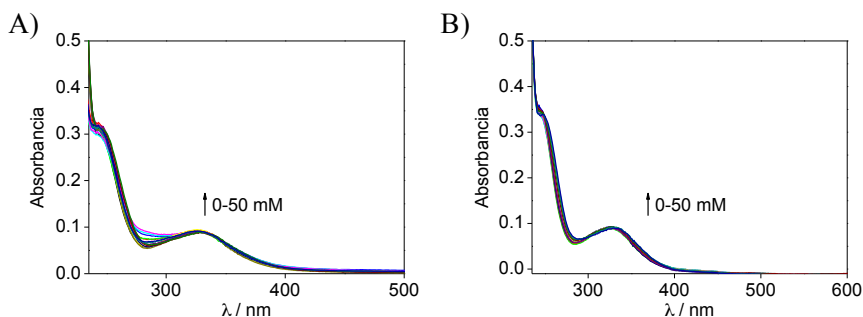


Figura 4.4. Espectros de absorción de A) 3α -Dns-CA y B) 3β -Dns-CA en presencia de concentraciones crecientes de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M.

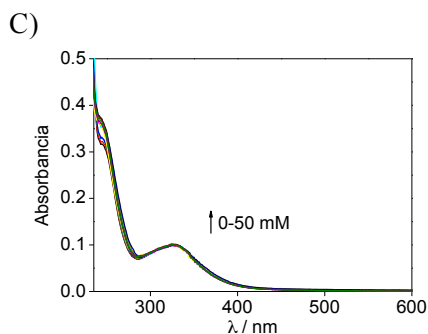


Figura 4.4. (Continuación) Espectro de absorción de C) **7 α -Dns-CA** en presencia de concentraciones crecientes de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M.

A continuación, con el fin de comprobar la aplicabilidad de la metodología, se registraron los espectros UV-vis de **3 α -Dns-CA** (20 μ M) en presencia de concentraciones crecientes de las restantes sales biliares (SBs).

De nuevo, la adición de NaCA, NaGCA, NaTCA, NaCDCA y NaUDCA (hasta 50 mM) no tuvo ninguna influencia en los espectros de absorción de la sonda fluorescente en la región de 325-360 nm (**Figura 4.5**). Por lo tanto, la longitud de onda de excitación para los posteriores experimentos de emisión fue seleccionada en esta región.

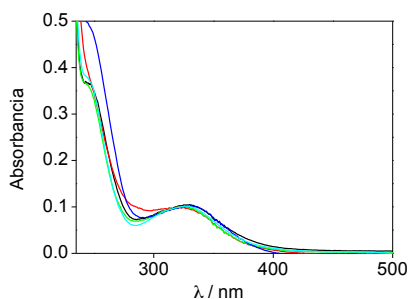


Figura 4.5. Espectro de absorción de **3 α -Dns-CA** (20 μ M) en presencia de 50 mM NaCA (rojo), NaGCA (negro), NaTCA (verde), NaCDCA (azul) y NaUDCA (turquesa), en NaCl acuoso 0,2 M.

En el caso de NaGCDCA y NaDCA, se observaron ligeros cambios en los espectros de absorción (**Figura 4.6**), lo que provocó que las medidas en estado estacionario fueran menos fiables, pero no influyó en los resultados de tiempo resuelto, lo que nos permitió continuar con la investigación de la formación de agregados de estas SBs. Desgraciadamente, la muy escasa solubilidad de NaLCA en medio acuoso impidió el estudio de la agregación de esta sal biliar.

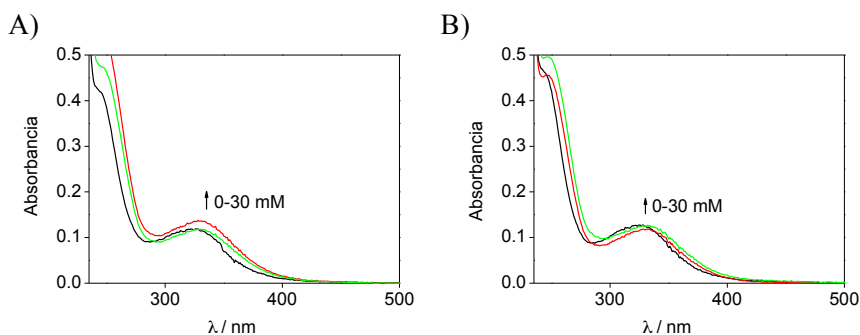


Figura 4.6. Espectros de absorción de **3 α -Dns-CA** (20 μ M) en presencia de concentraciones crecientes de A) NaGCDCA y B) NaDCA.

A continuación, se registraron los espectros de emisión de los tres derivados de dansilo, en presencia de NaCA, observándose un marcado aumento de la intensidad de emisión, acompañado de un desplazamiento hipsocrómico de los máximos debido a la progresiva incorporación del fluoróforo en el microambiente más protegido proporcionado por los agregados (**Figura 4.7**).

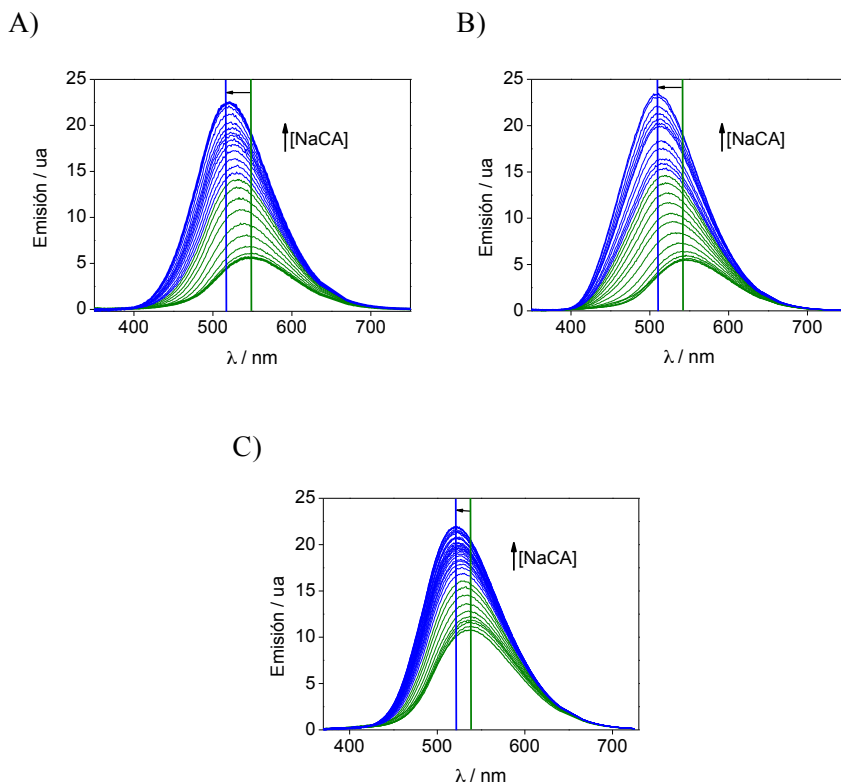


Figura 4.7. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 327$ nm) de A) **3 α -Dns-CA**; B) **3 β -Dns-CA** y C) **7 α -Dns-CA** (20 μ M), en NaCl 0,2 M con adiciones crecientes de NaCA en el rango 0–40 mM.

Por otra parte, cuando la emisión relativa se representó frente a la concentración de NaCA (**Figura 4.8**), se hizo evidente que el comportamiento de la emisión era fuertemente dependiente de la posición y estereoquímica del cromóforo. Así, los cromóforos unidos covalentemente a la posición C-3 (**3 α -** y **3 β -**) resultaron más sensibles a la incorporación en agregados de NaCA. En el caso del isómero **7 α -**, el efecto fue cuantitativamente menos importante, probablemente debido al menor efecto protector proporcionado por la cara α -hidrofílica. Además, los cambios de curvatura se observaron a concentraciones aproximadamente coincidentes con las habitualmente asociadas con las transiciones entre disolución (S), agregados primarios (I) y agregados secundarios (II) descritos en la literatura.^{39,112,124}

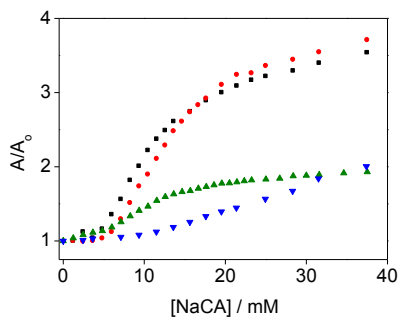


Figura 4.8. Cambios en el área relativa (A/A_0) para **3α-Dns-CA** (■), **3β-Dns-CA** (●), **7α-Dns-ChA** (▲) y **Dns-Gly** (▼) frente a la adición creciente de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M.

Como se observa en la **Figura 4.8**, la importancia de la unión covalente entre el cromóforo y el esqueleto esteroideo en los Dns-CAs fue evidente cuando se comparó con el comportamiento de **Dns-Gly** en experimentos similares. En este caso, la emisión aumentó sólo 1,5 veces y además los cambios de curvatura no fueron apreciables.

A la vista de que los resultados obtenidos con los tres dansil derivados tras la adición de NaCA eran análogos se decidió continuar el estudio del resto de SBs únicamente con **3α-Dns-CA**. Así, se registró la emisión de **3α-Dns-CA** en presencia de concentraciones crecientes de NaGCA, NaTCA, NaCDCA y NaUDCA (**Figura 4.9**).

En general, la adición de SB no fluorescente provocó un aumento notable en las intensidades de emisión (**Figura 4.10A**), acompañado de un movimiento hipsocrómico del máximo análogo al observado en el caso de NaCA (**Figura 4.10B**), como resultado de la progresiva incorporación del fluoróforo al microambiente hidrofóbico proporcionado por los agregados de SBs.

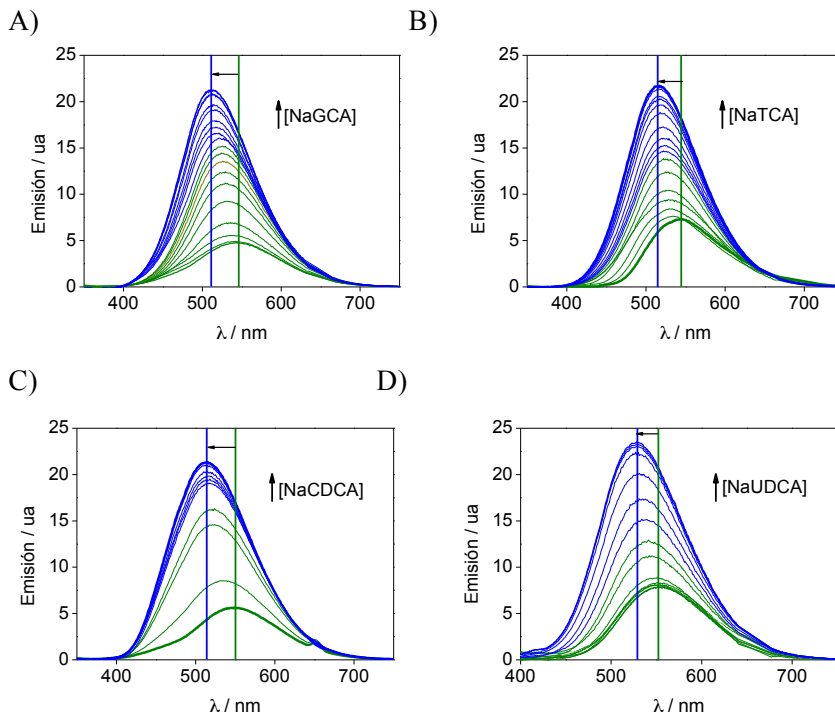


Figura 4.9. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 327$ nm) de **3 α -Dns-CA** ($20 \mu\text{M}$) en NaCl $0,2$ M con concentraciones crecientes de: A) NaGCA (0 – 100 mM); B) NaTCA (0 – 100 mM); C) NaCDCA (0 – 40 mM) y D) NaUDCA (0 – 50 mM).

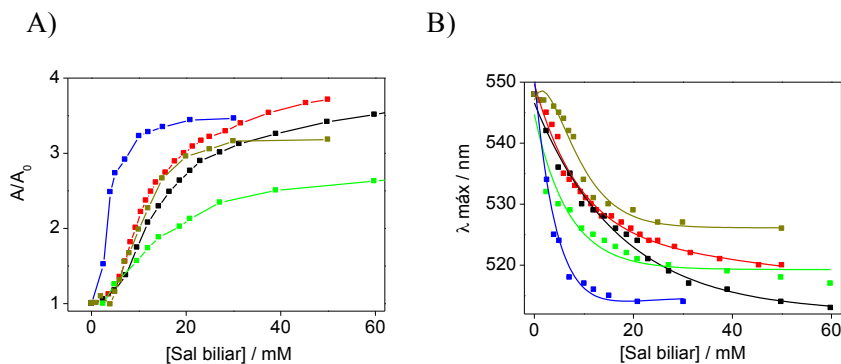


Figura 4.10. A) Cambios en el área relativa de emisión (A/A_0) para **3 α -Dns-CA** ($20 \mu\text{M}$) con adiciones crecientes de SBS; B) cambios en la λ_{max} de emisión vs concentración de BS; NaCA (rojo), NaGCA (negro), NaTCA (verde), NaCDCA (azul), y NaUDCA (marrón) en NaCl acuoso $0,2$ M.

Seguidamente, para investigar la naturaleza de la conducta observada, se registraron los tiempos de vida de fluorescencia de los derivados de Dns-CA en presencia de concentraciones crecientes de NaCA (**Figura 4.11**).

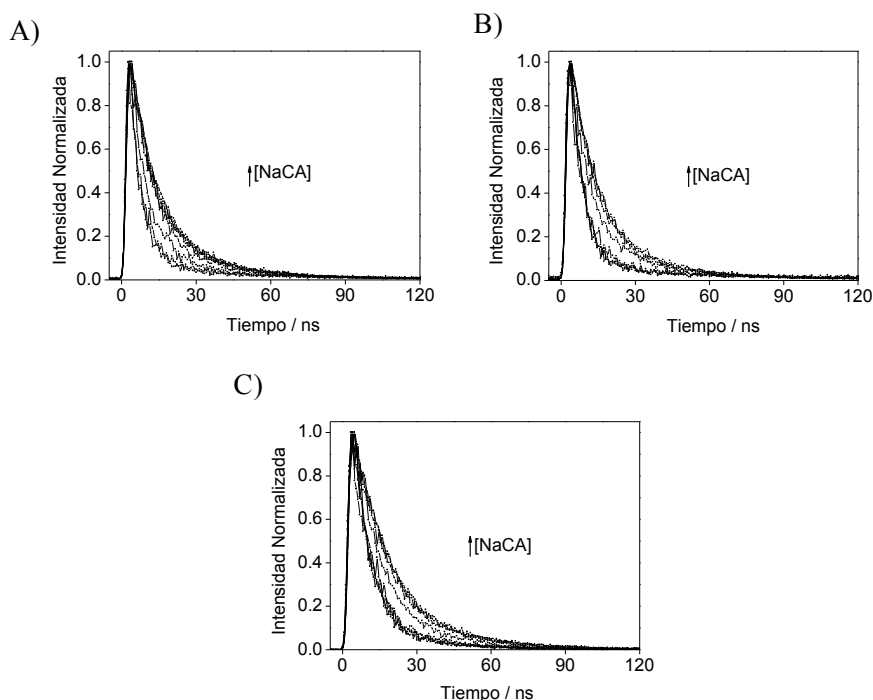


Figura 4.11. Trazas de la desaparición del tiempo de vida ($\lambda_{exc} = 337 \text{ nm}$) de: A) **3 α -Dns-CA**; B) **3 β -Dns-CA** y C) **7 α -Dns-CA** (20 μM), con adiciones crecientes de NaCA en el rango 0–40 mM.

Por debajo de 5 mM, el tiempo de vida se ajustó a una ley exponencial de primer orden; los valores τ_S correspondientes se muestran en la **Tabla 4.1**. Sin embargo, con el aumento de la concentración de NaCA, el ajuste resultó ser multiexponencial. Por lo tanto, entre 5 y 12 mM de NaCA, además del tiempo de vida en disolución (τ_S), un segundo valor (τ_I) indicó la ubicación del cromóforo en un microambiente diferente. A concentraciones por encima de 12 mM, se hizo necesaria una tercera componente (τ_{II}) para el correcto ajuste de las trazas; considerándose este hecho como una indicación de la presencia del cromóforo dansilo en otro microambiente. En la **Tabla 4.1** se muestran los valores obtenidos de τ_S , τ_I y τ_{II} para **3 α -**, **3 β -**, y **7 α -Dns-CA**.

Tabla 4.1. Tiempos de vida de fluorescencia de los dansil derivados en disolución (S) y en agregados primario (I) y secundario (II) de NaCA.^a

Dansil derivado	τ_S / ns	τ_I / ns	τ_{II} / ns
3 α -Dns-CA	4,8	10,6	12,8
3 β -Dns-CA	4,9	11,2	14,5
7 α -Dns-CA	7,4	11,2	13,6

^a Los errores fueron menores que el 5 % de los valores indicados.

Por otra parte, para las restantes SBs, se registraron los tiempos de vida de **3 α -Dns-CA** en presencia de adiciones crecientes de NaGCA, NaTCA, NaCDCA, NaGCDCA, NaDCA y NaUDCA (**Figura 4.12**). En todos los casos, se observó un aumento significativo del tiempo de vida medio con el aumento de concentración de SB.

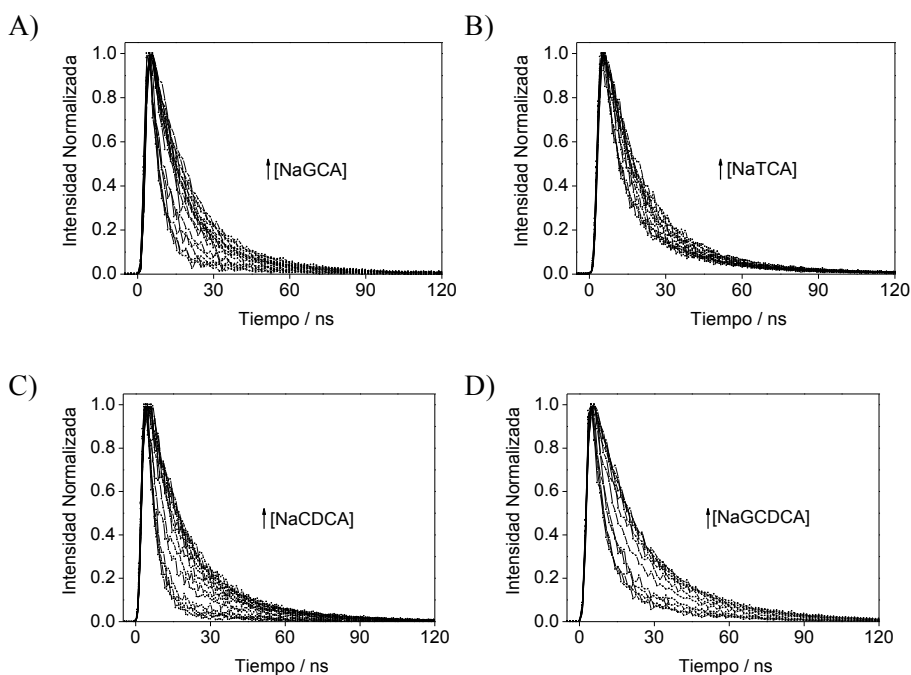


Figura 4.12. Evolución del tiempo de vida ($\lambda_{exc} = 337$ nm) de **3 α -Dns-CA** (20 μ M) en NaCl 0,2 M con adiciones crecientes de sales biliares: A) NaGCA (0-100 mM); B) NaTCA (0-100 mM); C) NaCDCA (0-40 mM) y D) NaGCDCA (0-50 mM).

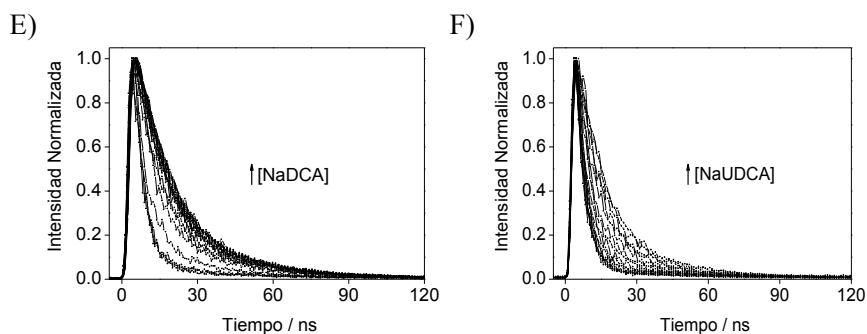


Figura 4.12. (Continuación) Evolución del tiempo de vida ($\lambda_{exc} = 337$ nm) de **3 α -Dns-CA** (20 μ M) en NaCl 0,2 M con adiciones crecientes de sales biliares: E) NaDCA (0-50 mM) y F) NaUDCA (0-50 mM).

Aplicando una metodología equivalente a la descrita para el caso de NaCA, para concentraciones moderadas de SB además del conocido tiempo de vida en disolución (4.8 ns),⁹⁵ tuvo que ser introducido un segundo valor de tiempo de vida (τ_I) para conseguir un buen ajuste. A mayores concentraciones de SB se hizo necesaria una tercera componente (τ_{II}) para un ajuste satisfactorio, de acuerdo con la formación de los agregados secundarios. En la **Tabla 4.2** se muestran los valores de los tiempos de vida de **3 α -Dns-CA** (τ_I y τ_{II}) tras su incorporación en las diferentes SBs estudiadas.

Tabla 4.2. Tiempos de vida de fluorescencia de 3 α -Dns-CA en agregados primario (I) y secundario (II) de las distintas SBs^a.

SB	τ_I / ns	τ_{II} / ns
NaCA	10,6	12,8
NaGCA	12,1	16,5
NaTCA	11,6	13,2
NaCDCA	8,5	15,5
NaGCDCA	9,5	17,2
NaDCA	9,5	12,3
NaUDCA	9,0	14,9

^a Los errores fueron menores que el 5 % de los valores indicados.

Con el fin de hacer uso de los tiempos de vida de singlete como una sonda para evaluar el comportamiento de agregación, se representaron los tiempos de vida media, obtenidos a partir de las componentes de tiempos de vida (τ_S , τ_I , y τ_{II}) y los correspondientes factores preexponenciales (A_S , A_I y A_{II}), frente a la concentración de NaCA (**Figura 4.13**).

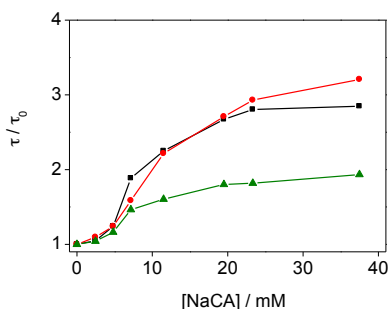


Figura 4.13. Cambios en los tiempos de vida media relativos (τ/τ_0) para **3 α -** (■), **3 β -** (●) y **7 α -Dns-CA** (▲) frente a la adición creciente de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M.

El aumento relativo de los tiempos de vida promedio de singlete fue de hasta tres veces en el caso de **3 α -** o **3 β -Dns-CA** y casi del doble para el isómero **7 α -**. Como se aprecia en la **Figura 4.14**, la extrapolación de esta metodología para las restantes SBS empleando **3 α -Dns-CA** proporcionó unos resultados análogos y comparables a los obtenidos por NaCA.

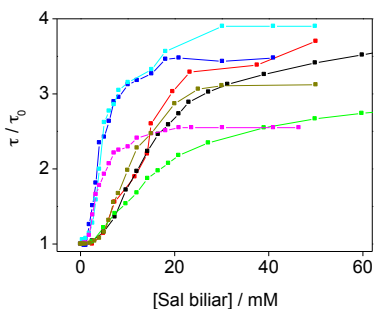


Figura 4.14. Cambios en los tiempos de vida promedio relativos (τ/τ_0) para **3 α -Dns-CA** vs concentración de BS para NaCA (rojo), NaGCA (negro), NaTCA (verde), NaCDCA (azul), NaGCDCa (azul celeste), NaDCA (rosa), y NaUDCA (marrón) en NaCl acuoso 0,2 M.

La tendencia observada en los experimentos de tiempo resuelto fue análoga a la observada en los experimentos de fluorescencia en estado estacionario. Según estos datos, la incorporación de la sonda en los agregados primarios provoca un aumento de su tiempo de vida de fluorescencia hasta dos veces el valor encontrado en disolución. La formación de los agregados secundarios también está asociada con un aumento del tiempo de vida medio, que es especialmente notable en el caso de NaCDCA y su conjugado NaGCDCA. Así, cuando se representan los cambios en las intensidades relativas de fluorescencia (I/I_0) o los tiempos de vida medio (τ/τ_0) de **3 α -Dns-CA** frente a la concentración de SB (ver **Figura 4.15** para NaCA), las dos metodologías revelan exactamente la misma tendencia en todos las SBs, constituyendo este hecho una prueba de la naturaleza dinámica de los cambios observados.

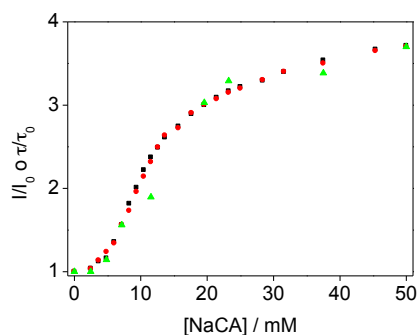


Figure 4.15. Cambios en las intensidades (I/I_0) (■) o tiempos de vida (τ/τ_0) (▲) relativos vs concentración de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M, y ajuste teórico obtenido de las ec. 4.1 y 4.2 (●) para el caso de **3 α -Dns-CA**.

Una vez más, en presencia de concentraciones crecientes de SBs (**Figuras 4.8** y **4.13** para NaCA; y **4.10** y **4.14** para las restantes SBs), pueden diferenciarse claramente tres regiones, que se correlacionan con la presencia de SBs en disolución o formando agregados primarios o secundarios. Aunque en general se acepta que la agregación de sales biliares es un proceso continuo, los resultados obtenidos están en excelente acuerdo con el modelo propuesto por Small.³⁹

Tras establecer la correlación cualitativa entre las propiedades de la emisión y el comportamiento de agregación, se combinaron los resultados obtenidos de los experimentos fotofísicos en estado estacionario y tiempo resuelto para **3 α -**, **3 β -** y **7 α -Dns-CA** con el fin de construir el diagrama de especiación. Así, se determinó el porcentaje de cada uno de los componentes (% i) a diferentes concentraciones de NaCA en los diferentes microambientes usando las ecuaciones 4.1 y 4.2.

$$\frac{I}{I_0} = \frac{(\%S)\phi_S + (\%I)\phi_I + (\%II)\phi_{II}}{100\phi_S} \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$\% i = \frac{100 \frac{A_i}{\phi_i}}{\frac{A_S}{\phi_S} + \frac{A_I}{\phi_I} + \frac{A_{II}}{\phi_{II}}} \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde I/I_0 es el aumento relativo de emisión a una concentración de SB dada, % S, % I, % II son los porcentajes de SB en los diferentes microambientes (S: disolución, I: agregados primarios y II: agregados secundarios), ϕ_S , ϕ_I y ϕ_{II} son los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia y A_S , A_I , A_{II} son los factores pre-exponenciales obtenidos de las trazas de tiempos de vida de fluorescencia. El rendimiento cuántico de fluorescencia en disolución fue de 0,05 (ver sección 4.2.1) mientras que los valores de ϕ_{II} se estimaron a partir de los valores de la meseta al representar la variación de I/I_0 frente a la concentración de NaCA (**Figura 4.8**), asumiendo que los agregados secundarios son la única especie existente a concentraciones por encima de 50 mM. Así pues, se estimaron inicialmente como valores de ϕ_{II} : 0,19 (**3 α -Dns-CA**), 0,20 (**3 β -Dns-CA**) y 0,12 (**7 α -Dns-CA**), respectivamente.

Los agregados primarios se espera que predominen en el intervalo intermedio de concentración de colato sódico. El hecho de que el cociente I/I_0 (o τ/τ_0) frente a $[\text{NaCA}]$ en las curvas obtenidas para los derivados 3α - y 3β - se crucen en 15 mM se consideró como una indicación de que a esa concentración podrían tener una contribución mayoritaria los agregados primarios. Por lo tanto, se seleccionaron valores iniciales de ϕ_i de 0,13 (para 3α - y 3β -Dns-CA) o 0,09 (7α -Dns-CA), asumiendo *a priori* la simplificación de que los agregados primarios son las únicas especies existentes a esta concentración.

Estos valores se introdujeron en las ecuaciones 4.1 y 4.2 y, a continuación, fueron refinados dentro de un rango estrecho ($\pm 0,02$) hasta obtener una correlación satisfactoria entre el ajuste simulado y el experimental obtenido del estado estacionario y tiempo resuelto para los derivados 3α -, 3β - y 7α -, respectivamente (ver **Figura 4.15** para 3α -Dns-CA en agregados de NaCA como ejemplo).

En el caso de NaGCDCA y NaDCA, para los cuales los experimentos en estado estacionario eran menos fiables, los valores de ϕ_I y ϕ_{II} fueron tomados de la variación del aumento de tiempo de vida medio en función de la concentración de SB. Los valores finales obtenidos para los rendimientos cuánticos se muestran en la **Tabla 4.3** para todas las SBs estudiadas.

Tabla 4.3. Rendimientos cuánticos de fluorescencia de 3α -Dns-CA en agregados primario (I) y secundario (II) determinados aplicando las ecuaciones 4.1 y 4.2.

SB	ϕ_I^a	ϕ_{II}^a
NaCA	0,14	0,19
NaGCA	0,13	0,19
NaTCA	0,12	0,14
NaCDCA	0,13	0,18
NaGCDCA	0,13	0,20
NaDCA	0,11	0,18
NaUDCA	0,10	0,16

^a Los errores fueron menores que el 5 % de los valores indicados.

Para la construcción de los diagramas de especiación de NaCA a partir de los resultados obtenidos con cada una de las tres dansil derivados se tomaron para cada concentración de NaCA los %i obtenidos mediante las ecuaciones 4.1 y 4.2 y se representaron en función de la concentración de NaCA.

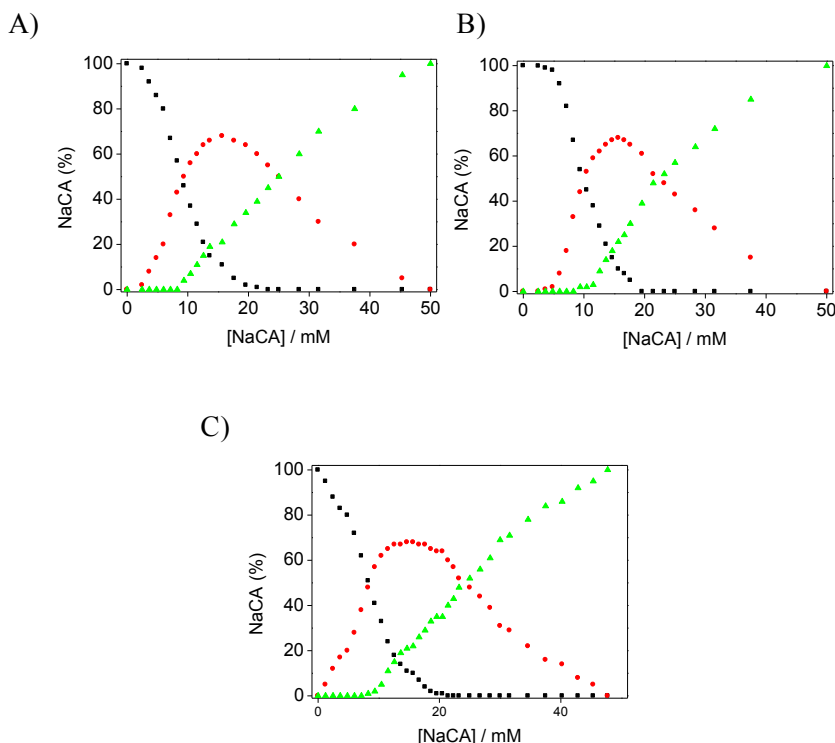


Figure 4.16. Porcentaje de NaCA en disolución (■); agregados primarios (●) y secundarios (▲) obtenidos empleando: A) 3 α -Dns-CA; B) 3 β -Dns-CA o C) 7 α -Dns-CA como sondas.

Como se observa en **la Figura 4.16**, los resultados obtenidos resultaron ser independientes de la sonda empleada. Con estos antecedentes, se aplicó esta metodología a la construcción de los diagramas de especiación de las restantes SBs empleando únicamente 3 α -Dns-CA como sonda (**Figura 4.17**).

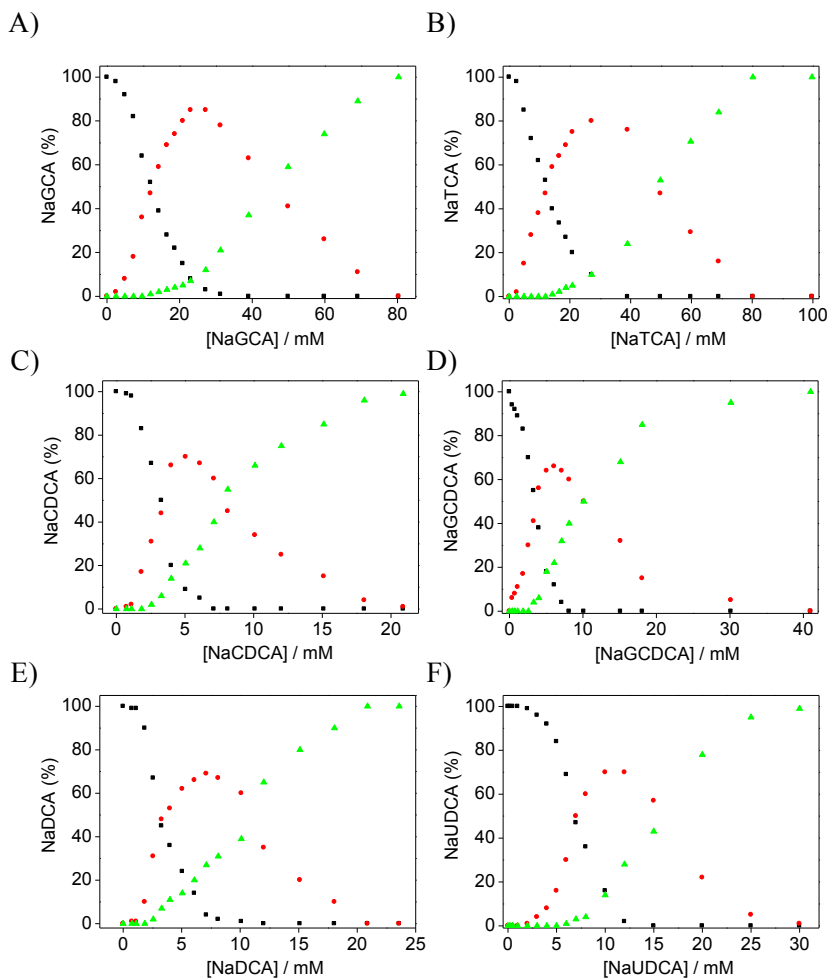


Figura 4.17. Porcentaje de SB en disolución (■); agregados primarios (●) y secundarios (▲) para A) NaGCA; B) NaTCA; C) NaCDCA; D) NaGCDCa; E) NaDCA; y F) NaUDCA empleando 3α -Dns-CA como sonda.

Es interesante observar que para el caso de NaCA, algunos monómeros de NaCA permanecen en disolución incluso hasta concentraciones de 20 mM, mientras que los agregados secundarios comienzan a aparecer ya a 10 mM. En cuanto a los agregados primarios, están presentes en todo el intervalo de concentración, con máxima contribución a ~ 15 mM.

Cuando se compara NaCA con sus correspondientes derivados glicina y taurina (**Figura 4.17A-B**), se comprueba que las SBs conjugadas son más hidrófilas, así los monómeros de SB se encuentran en disolución hasta 40 mM. De acuerdo con este aumento de la solubilidad, la concentración máxima de agregados primarios se alcanza a 25-30 mM mientras que para NaCA se alcanza a 15 mM (véase la **Figura 4.18**).

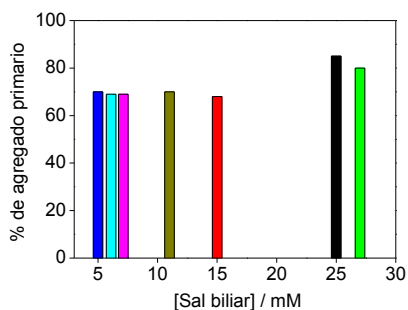


Figure 4.18. Relación entre la concentración de SB y el porcentaje máximo de agregados primarios para NaCA (rojo), NaGCA (negro), NaTCA (verde), NaCDCA (azul), NaGCDCA (azul celeste), NaDCA (rosa), y NaUDCA (marrón).

La falta de un grupo hidroxilo en la posición C-12 tiene también una marcada influencia en la distribución de las tres especies, como se muestra para NaCDCA y NaGCDCA (**Figura 4.17 C-D**). Su presencia en disolución es escasa por encima de 8 mM, y los agregados primarios predominan alrededor de 5-7 mM (**Figura 4.18**). De nuevo, el aumento de la solubilidad debido a la conjugación con el aminoácido desplaza las tres curvas a concentraciones más altas, aunque en este caso el efecto es menos notable que para el par NaCA / NaGCA. Como era de esperar, los diagramas de especiación resultaron ser muy similares para NaCDCA (**Figura 4.17C**) y NaDCA (**Figura 4.17E**), ya que ambos contienen dos grupos hidroxilo en la cara α . El cambio del grupo hidroxilo en C-7 hacia la cara β del esqueleto da como resultado NaUDCA, con una mayor solubilidad (**Figura 4.17F**), y por lo tanto, los porcentajes máximos para agregados primarios aparecen a mayor concentración de SB (**Figura 4.18**).

En general, las tendencias observadas están en razonable acuerdo con los valores determinados por otros métodos, como los basados en las intensidades relativas de las bandas vibrónicas en el espectro de fluorescencia del pireno.¹¹⁶ Sin embargo, los diagramas de especiación son mucho más informativos que lo que proporciona conocer sólo las cmc, y el hecho de que una única sonda, en este caso, **3 α -Dns-CA**, pueda ser utilizado para la investigación de la agregación en toda una serie de análogos de SBs, constituye una validación general de la metodología.

4.3 Conclusiones

En el presente capítulo, se ha demostrado que la derivatización del ácido cólico mediante la unión covalente del fluoróforo dansilo (Dns) en diferentes posiciones del esqueleto (3 α -, 3 β - o 7 α -), proporciona sondas fluorescentes cuyas propiedades dependen fuertemente del medio. El aumento en la intensidad, el rendimiento cuántico de emisión y el tiempo de vida de fluorescencia, tras incorporación de las tres sondas en los agregados han permitido investigar la agregación de las SBs más abundantes, proporcionando información clave para construir los diagramas de especiación.

La metodología desarrollada se basa en el análisis combinado de los experimentos en estado estacionario y tiempo resuelto, que revelan una fuerte dependencia del medio en el comportamiento de la emisión. La información obtenida ha sido utilizada para construir los diagramas de especiación y se ha correlacionado con el grado de hidroxilación y/o la conjugación de diferentes sales biliares.

4.4 Método Experimental

Las sales de ácidos biliares glicocolato sódico (NaGCA), taurocolato sódico (NaTCA), quenodesoxicolato sódico (NaCDCA), glicoquenodesoxicolato sódico (NaGCDCA) y desoxicolato sódico (NaDCA), así como ácido litocólico (LCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA); así como dansilglicina (Dns-Gly), cumarina 30, cloruro sódico (NaCl), dimetil sulfóxido (DMSO) e hidrogenocarbonato sódico (NaHCO₃) fueron suministrados por Sigma Aldrich y utilizados sin purificación adicional. La sal biliar de colato sódico (NaCA) fue suministrada por Across. Los ácidos LCA y UDCA fueron basificados con cantidades estequiométricas de NaHCO₃ para obtener las correspondientes sales NaLCA y NaUDCA. El etanol absoluto fue de grado HPLC. Los dansil derivados (**3α**-, **3β**- y **7α-Dns-CA**) fueron sintetizados siguiendo la metodología descrita previamente en el grupo de investigación (ver capítulo 3).⁹⁵

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron utilizando los siguientes patrones: Cumarina 30/ CH₃CN/ aire ($\phi_P = 0.67$),¹²⁵ utilizando la siguiente ecuación 4.3:

$$\phi_F = \phi_P \frac{n_i^2}{n_P^2} \frac{Area_i}{Area_P} \frac{1-10^{-Abs_i}}{1-10^{-Abs_P}} \quad \text{Ec 4.3}$$

donde los subíndices “*i*” y “*P*” se refieren a la muestra de interés y al patrón, respectivamente, *n* representa el índice de refracción de los correspondientes disolventes, Area representa las integrales de los correspondientes espectros de emisión y Abs representa la absorbancia a la λ_{exc} .

En las medidas de fluorescencia, todas las disoluciones acuosas utilizadas fueron de NaCl 0,2 M en agua Millipore. Los espectros se corrigieron con experimentos control de línea base para eliminar la emisión Raman del disolvente. La concentración de los derivados de dansilo **3 α -Dns-CA**, **3 β -Dns-CA** y **7 α -Dns-CA** fue de 20 μ M (obtenida a partir de disoluciones stock 5 mM en DMSO), que aseguró que la absorbancia de todas las disoluciones fuera inferior de 0,1 en el punto isobéptico utilizado en cada caso a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 327-360$ nm para estado estacionario y $\lambda_{exc} = 337$ nm para los experimentos en tiempo resuelto). Se prepararon para cada sal biliar disoluciones stock conteniendo 20 μ M del correspondiente dansil derivado en NaCl 0,2 M. Todas las medidas se realizaron a en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y 4 mL de capacidad, y se registraron a temperatura ambiente y al aire.

Capítulo 5

**Nuevos compuestos fotoactivos como sondas para
demostrar la incorporación de ácido cólico y
colesterol en micelas mixtas**

5.1 Introducción

Los principales componentes de la bilis son las sales biliares (SBs), los fosfolípidos (como la lecitina (L)), y el colesterol (Ch).^{28,29} Estos últimos son secretados por los hepatocitos en forma de vesículas, que posteriormente son solubilizadas parcialmente por las sales biliares,^{1,9,10,110} formando micelas mixtas (MM).²⁸⁻³¹

Ambas especies (vesículas y micelas mixtas), coexisten en equilibrio dinámico^{70,126} y juegan un papel importante en la digestión y absorción intestinal de lípidos alimenticios, y en el mantenimiento de los niveles apropiados de Ch. En condiciones de ayuno, prevalece la formación de vesículas; sin embargo, en presencia de lípidos exógenos (provenientes de alimentos, medicamentos, etc) la concentración total de SBs aumenta, lo que se traduce en un predominio de MM en el organismo.²⁸

A pesar del considerable esfuerzo por entender las propiedades de asociación de las SBs,^{39,127} los mecanismos concretos de solubilización de las vesículas lipídicas por tensioactivos y las interesantes propiedades que proporcionan las micelas mixtas merecen una mayor investigación. Estos temas han sido tratados mediante diferentes técnicas, como son: calorimetría,⁶⁸ dispersión de luz dinámica (DLS),^{66,67} microscopía electrónica de transmisión (TEM),⁶⁵ dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS),⁸⁹ ultracentrifugación,⁷⁰ o resonancia magnética nuclear (RMN),¹²⁸ sin embargo, continua siendo necesaria una metodología directa y sensible que proporcione una información fiable acerca de cómo se estructuran las MM.

En este contexto, las propiedades fotofísicas son técnicas muy sensibles, por lo que utilizando un cromóforo apropiado se puede investigar la arquitectura de sistemas microheterogéneos.^{119,120,129-135}

En concreto, en la presente tesis doctoral, se ha citado previamente (**capítulo 4**) la utilización de dansil derivados de ácido cólico para investigar la agregación de las SBs, así como para determinar los diagramas de especiación de cada uno de ellas en base al aumento en el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de fluorescencia que el cromóforo experimenta al formar parte de los agregados de SBs.¹²⁷

Con estos antecedentes, en el presente capítulo se pretende ilustrar el uso de compuestos fotoactivos como sondas para demostrar la incorporación de ácido cólico y colesterol en micelas mixtas. Se eligieron los cromóforos dansilo (Dns) y naproxeno ((*R*)- o (*S*)-NPX) como sensores, unidos covalentemente a la posición 3 β - del esqueleto de CA y Ch. En la **Figura 5.1** se muestra la estructura química de las nuevas díadas fotoactivas sintetizadas **Dns-CA**, (*R*)-NPX-CA, (*S*)-NPX-CA, **Dns-Ch**, (*R*)-NPX-Ch y (*S*)-NPX-Ch. Estas sondas guardan una estrecha similitud estructural con CA y Ch, los principales componentes de las MM. Por lo tanto, en principio, deberían ocupar en las MM posiciones equivalentes a los componentes de origen, lo que constituirá una influencia insignificante en la formación de las mismas. Los estados excitados singlete del fluoróforo Dns y triplete del NPX, se utilizarán como sondas para demostrar la incorporación de CA y Ch en MM.

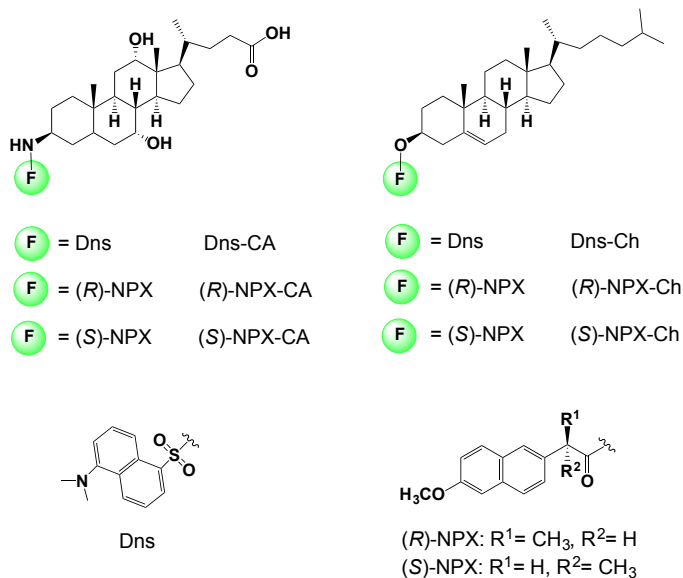


Figura 5.1. Estructura química de las díadas **Dns-CA**, (*R*)-NPX-CA, (*S*)-NPX-CA, **Dns-Ch**, (*R*)-NPX-Ch y (*S*)-NPX-Ch.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Caracterización física de las micelas mixtas

Se prepararon MM conteniendo L (13 mM), Ch (4 mM) y NaCA (28 mM), de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura.¹³⁶ Para monitorizar la incorporación de CA y Ch en MM, se sustituyó el 0,7% de CA o el 5% de Ch por la correspondiente diada, por lo que la concentración del cromóforo (2×10^{-4} M) fue la apropiada para la realización de las medidas fotofísicas sin introducir cambios significativos en la estructura de las MM. Las MM se caracterizaron por DLS y TEM; la combinación de ambos resultados reveló la presencia de MM, junto con un porcentaje menor de vesículas (**Figura 5.2A**). En la **Figura 5.2B** se muestra de forma esquemática la estructura de las MM sin y con las unidades fotoactivas incorporadas.

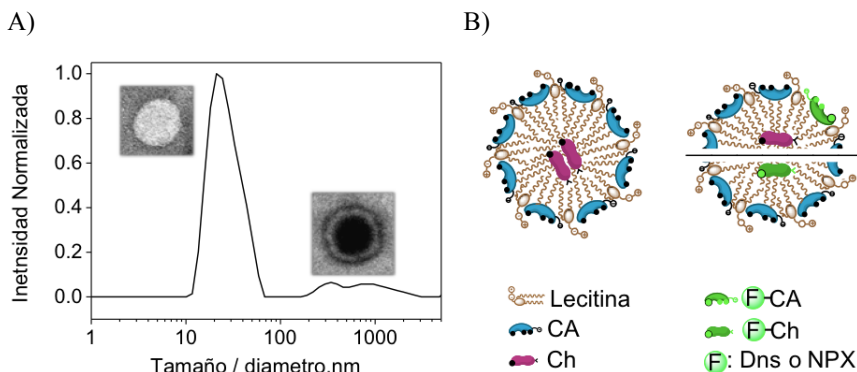


Figura 5.2. Micelas mixtas de L-CA-Ch. A) Curvas de distribución de tamaños para MM y vesículas en NaCl 0,2 M acuoso, obtenidas por DLS. Inserts: Imágenes de TEM correspondientes a MM y vesículas. B) Representación gráfica de MM sin y con los derivados fotoactivos.

5.2.2 Estudios de fluorescencia

Una vez caracterizadas las MM, se registraron los correspondientes espectros de excitación y emisión que resultaron idénticos (máximos a 358 y 510 nm, respectivamente) para **Dns-CA** o **Dns-Ch** incorporados en el interior de las MM a los obtenidos en disolución (**Figura 5.3**).

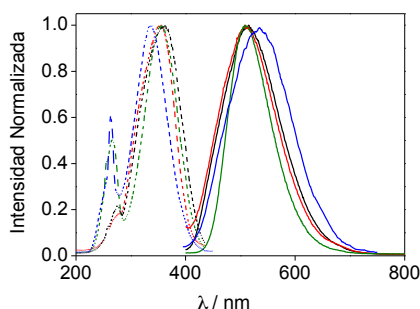


Figura 5.3. A) Espectro de emisión (línea continua) y excitación (línea discontinua) normalizados de **Dns-CA** en MM (rojo); **Dns-Ch** en MM (negro); **Dns-CA** en NaCl acuoso 0,2 M (azul) y **Dns-Ch** en CH₂Cl₂ (verde). La concentración de las díadas se fijó en 2×10^{-4} M y los experimentos se realizaron al aire.

Curiosamente, en el caso de **Dns-CA** se observó un espectro de emisión desplazado al azul, acompañado del correspondiente espectro de excitación desplazado al rojo, cuando se encuentra en el interior de las MM respecto a los mismos obtenidos en disolución; por otro lado, para **Dns-Ch**, se obtuvieron espectros de emisión y excitación idénticos cuando se registraron en MM y en CH₂Cl₂. Esto indicó que la naturaleza del entorno que envuelve a las díadas en el interior de las MM es marcadamente lipófilo y similar al proporcionado por disolventes orgánicos no polares como el CH₂Cl₂ (**Figura 5.4**). En medio acuoso, el rendimiento cuántico de emisión de **Dns-CA** se incrementó de 0,05 (NaCl 0,2 M) a 0,12 (MM). En el caso de **Dns-Ch**, los valores correspondientes fueron < 0,01 (NaCl 0,2 M) y 0,12 (MM).

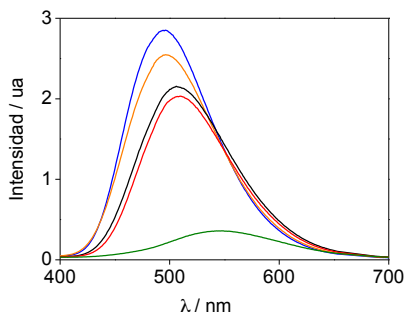


Figura 5.4. Espectros de emisión de **Dns-CA** en diclorometano (azul); tetrahidrofurano (naranja); etanol (negro); acetonitrilo (rojo) y NaCl acuoso 0,2 M (verde). La concentración de las díadas se fijó en 2×10^{-5} M y los espectros se registraron al aire.

Por otro lado, cuando se registraron los tiempos de vida de fluorescencia, se obtuvo un tiempo de vida de singlete de 4,8 ns para **Dns-CA** en medio acuoso, mientras que se obtuvo un valor de 15 ns para **Dns-Ch** en CH_2Cl_2 . Tras la incorporación **Dns-CA** o **Dns-Ch** en MM, se obtuvo un tiempo de vida intermedio de aprox. 10 ns, lo que indica que ambas sondas se integran en la arquitectura creada por estas entidades supramoleculares (**Figura 5.5**).

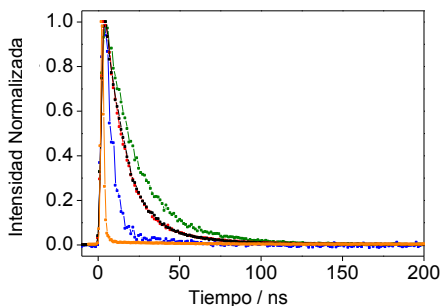


Figura 5.5. Trazas del tiempo de vida de fluorescencia de **Dns-CA** en MM (rojo); **Dns-Ch** en MM (negro); **Dns-CA** en NaCl acuoso 0,2 M (azul) y **Dns-Ch** en CH_2Cl_2 (verde). Se incluye el tiempo de respuesta de la lámpara (naranja). La concentración de las díadas se fijó en 2×10^{-4} M y los experimentos se realizaron al aire.

Una demostración visual que demuestra claramente cómo los dansil derivados de ácido cólico y colesterol se incorporan en las MM se muestra en la **Figura 5.6**, donde se tomaron fotografías de **Dns-CA** y **Dns-Ch** a la vez que se irradiaban con una lámpara UV ($\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$) en tres entornos diferentes: disolución acuosa (a, d), agregados de CA a concentración 28 mM (b, e) y MM (c, f).

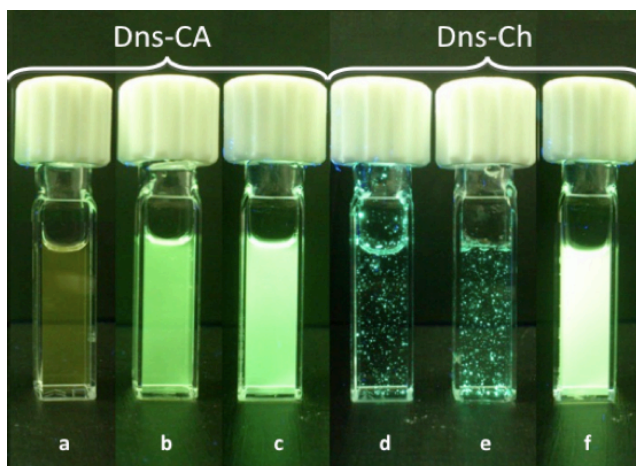


Figura 5.6. Fotografía de emisión real ($\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$) de **Dns-CA** y **Dns-Ch** en disolución acuosa (a, d), en presencia de 28 mM CA (b, e) e incorporado en MM (c, f), respectivamente. La concentración de **Dns-CA** o **Dns-Ch** se fijó en $2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Tal como ilustran las imágenes, en el caso de **Dns-CA**, a pesar de no disolverse perfectamente en agua (**Figura 5.6 a**), se observó una incorporación eficiente tanto en agregados de ácido cólico (**Figura 5.6 b**) como en MM (**Figura 5.6 c**) tal como demuestra la emisión de fluorescencia. Más interesante, en consonancia con el hecho de que la solubilidad de Ch en medios acuosos es extremadamente limitada, es que las imágenes revelaron que el derivado fluorescente **Dns-Ch** apenas está solubilizado en agua (**Figura 5.6 d**) o en agregados de CA (**Figura 5.6 e**); por el contrario, se observó una intensa emisión en presencia de MM (**Figura 5.6 f**), lo que resalta la importancia de estas estructuras en la solubilización de Ch en sistemas biológicos.²⁸

5.2.3 Estudios por fotólisis de destello láser

A continuación se decidió investigar la incorporación de CA y Ch en MM por fotólisis de destello láser. Para ello se eligieron las sondas que incorporaban naproxeno (NPX): (*R*)-NPX-CA, (*S*)-NPX-CA, (*R*)-NPX-Ch y (*S*)-NPX-CA, que fueron incorporadas en la preparación de las MM sustituyendo el 0,7% de CA o el 5% de Ch. Se registraron los espectros de absorción transitoria, que presentaron en todos los casos una banda a 440 nm, característica de la absorción triplete-triplete del NPX en disolución (Figura 5.7).

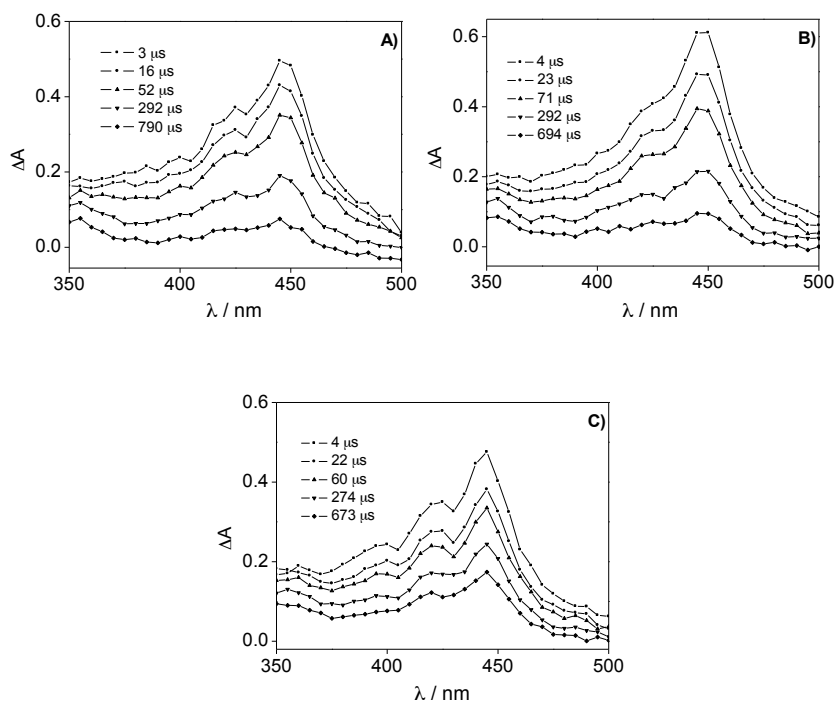


Figura 5.7. Espectro de absorción transitoria ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) obtenido a diferentes tiempos tras el pulso del láser para A) (*R*)-NPX-CA, B) (*S*)-NPX-CA y C) (*S*)-NPX-Ch incorporados en MM en NaCl acuoso 0,2 M bajo N_2 . La concentración de las diádas fotoactivas en las MM fue de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

El hecho de que el espectro del (**S**)-**NPX-Ch** pudiera registrarse a una concentración 2×10^{-4} M con una buena relación señal-ruido demostró de nuevo que la solubilización de Ch sólo se puede lograr en presencia de MM. Curiosamente, se observó un aumento notable del tiempo de vida de triplete (a cientos de microsegundos) en comparación con los valores encontrados para (**S**)-**NPX-CA** en disolución acuosa (aprox. 18 μ s) o para (**S**)-**NPX-Ch** en CH_2Cl_2 (aprox. 3,2 μ s), sin apreciarse estereodiferenciación (**Figura 5.8**).

El gran aumento del tiempo de vida de triplete puede ser empleado como un parámetro útil para demostrar la incorporación de las sondas fotoactivas en las entidades supramoleculares proporcionadas por las MM.

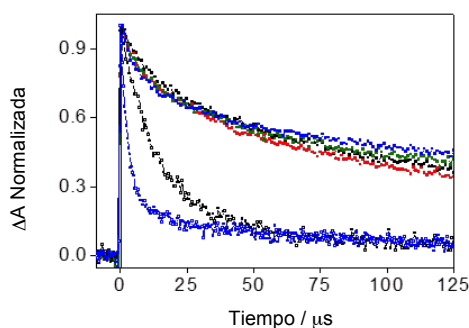


Figura 5.8. Trazas del tiempo de vida de triplete registradas a 440 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) para (**R**)-**NPX-CA** (rojo), (**S**)-**NPX-CA** (negro), (**R**)-**NPX-Ch** (verde) y (**S**)-**NPX-Ch** (azul) incorporados en MM. Se muestran también como referencia (**S**)-**NPX-CA** y (**S**)-**NPX-Ch** en disolución (NaCl acuoso 0,2 M y CH_2Cl_2 , respectivamente). La concentración de las sondas se fijó en 2×10^{-4} M y todas las medidas fueron registradas bajo N_2 .

5.3 Conclusiones

En resumen, se ha demostrado la incorporación de CA y Ch en la arquitectura supramolecular proporcionada por las MM mediante la utilización de técnicas fotofísicas. La morfología de las MM fue caracterizada mediante DLS y TEM. Se han sintetizado nuevas sondas fotoactivas mediante la unión covalente de los cromóforos dansilo o naproxeno al esqueleto esteroideo de CA y/o Ch. La sustitución de un porcentaje inferior al 5% de los componentes originales de la MM por cualquiera de los dansil derivados resulta en un gran aumento de la intensidad de fluorescencia (en un orden de magnitud) acompañado por un cambio en el tiempo de vida de singlete. Por otra parte, se observa un aumento notable del tiempo de triplete de las díadas marcadas con NPX (en un porcentaje inferior al 5%) por espectroscopía de absorción transitoria. En general, el uso de las técnicas fotofísicas ha resultado ser una metodología directa, sensible y sencilla para investigar la incorporación de CA y Ch en MM, lo que en principio podría extenderse a otros sistemas biológicos.

5.4 Método experimental

Colesterol (Ch), lecitina de huevo (L) y cloruro sódico (NaCl) fueron suministrados por Sigma–Aldrich, mientras que colato sódico (NaCA) fue suministrado por Acros Organics. Diclorometano fue suministrado por Scharlab.

Las MM se prepararon a partir de L, Ch y CA, de acuerdo al procedimiento descrito en la literatura.¹³⁶ Se disolvieron 5.4 μmol de colesterol en 100 μL de diclorometano y esta disolución se añadió a otra disolución de lecitina (17.8 μmol) y NaCA (38.8 μmol) en 400 μL de metanol. A continuación, sobre ésta, se añadió una disolución de **Dns-CA** o **(R)-NPX-CA** o **(S)-NPX-CA** (0.27 μmol) en 100 μL de metanol; **Dns-Ch** o **(R)-NPX-Ch** o **(S)-NPX-Ch** (0.27 μmol) en 100 μL de diclorometano. La mezcla resultante se diluyó con metanol hasta un volumen total de 10 mL y luego se rotavaporó a 50 °C durante 30 minutos. A continuación se mantuvo 30 minutos a vacío a temperatura ambiente hasta obtener un film fino y claro. Posteriormente, el film se hidrató con 1.37 mL de NaCl acuoso 0,2 M para obtener las disoluciones de MM. La concentración de L, Ch y CA en las MM fue de 13, 4 y 28 mM, respectivamente.

Las trazas de tiempo de vida fueron ajustadas a una función mono- o biexponencial, usando un procedimiento de deconvolución para separarlos del perfil de la lámpara de pulsos. Para las medidas de fluorescencia, la concentración del cromóforo fue 2×10^{-4} M. Las medidas se realizaron en la región de 330-600 nm con excitación en el intervalo de 200-340 nm. Todas las medidas se realizaron en condiciones aeróbicas.

En las medidas de fotólisis de destello láser, las concentraciones de las sondas se ajustó a 2×10^{-4} M. Todos los espectros de absorción transitoria se registraron a temperatura ambiente y las cubetas se burbujearon durante 15 minutos con N_2 antes de la adquisición. Los tiempos de vida de triplete de las díadas se midieron a 440 nm. Para comparar con los experimentos realizados en MM, se midieron los tiempos de vida de triplete en una solución acuosa NaCl 0,2 M para las díadas fotoactivas **(R)-** o **(S)-NPX-CA** o en diclorometano para las díadas fotoactivas **(R)-** o **(S)-NPX-Ch**.

Capítulo 6

**Sondas fotofísicas para evaluar el potencial de los
agregados de ácido cólico como transportadores de
fármacos**

6.1 Introducción

Los agregados de ácidos biliares juegan un papel importante en la solubilización de lípidos.¹ Por esta razón, podrían, en principio, ser utilizados en aplicaciones farmacéuticas como transportadores de fármacos poco solubles a través del epitelio intestinal; sin embargo, sólo se han encontrado algunos ejemplos de este concepto como la solubilización de β -bloqueantes,^{90,92} benzodiacepinas^{91,92} o morfina.⁹³ En estos casos la interacción fármaco-portador ha sido estudiada por diferentes técnicas, como por ejemplo: microcalorimetría,⁹⁰ espectrofotometría,⁹¹ resonancia de espín electrónico (REE),⁹² o resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación (STD NMR).⁹³ Algunas de estas técnicas se basan en mediciones indirectas, haciendo uso de sondas adicionales capaces de inducir interacciones secundarias, mientras que en otros casos, no informan sobre la accesibilidad de los fármacos dentro de los agregados. Por otra parte, la sensibilidad de las técnicas empleadas es baja, lo que limita su aplicabilidad a compuestos altamente hidrofílicos. Por lo tanto, si se pretende estudiar la interacción entre fármacos y agregados de sales biliares, sigue siendo necesaria una metodología directa, sensible y fiable.

En este contexto, las técnicas fotofísicas tales como fluorescencia o fotólisis de destello láser, han demostrado ser herramientas valiosas para investigar la unión de diferentes tipos de huéspedes (por ejemplo, derivados de naftaleno) a los agregados de ácido cólico,⁵¹ proporcionando información sobre la accesibilidad de desactivadores solubles en agua a los huéspedes incorporados.^{112,124} Además, se ha investigado la estereodiferenciación de diferentes derivados de triptófano dentro de los agregados empleando moléculas sonda como sensores desde el estado excitado singlete.¹³⁷

Por otra parte, el naproxeno (**NPX**) se utiliza comúnmente como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo tolerable, seguro, y altamente eficaz. Contiene un cromóforo naftaleno, por lo que este fármaco puede considerarse, en principio, una sonda adecuada para ser estudiada por medio de técnicas fotofísicas.^{129,138-142}

Además, el naproxeno puede emplearse como ácido carboxílico libre en sus dos formas enantioméricas, **(R)**- o **(S)**-NPX, y como sus correspondientes derivados éster metílico **(R)**- o **(S)**-NPXMe. Así se dispone de sondas que permiten considerar la estereodiferenciación además de la hidrofiliicidad para evaluar el potencial de los agregados de colato sódico (NaCA) como vehículo transportador de fármacos por medio de técnicas fotofísicas (**Figura 6.1**).

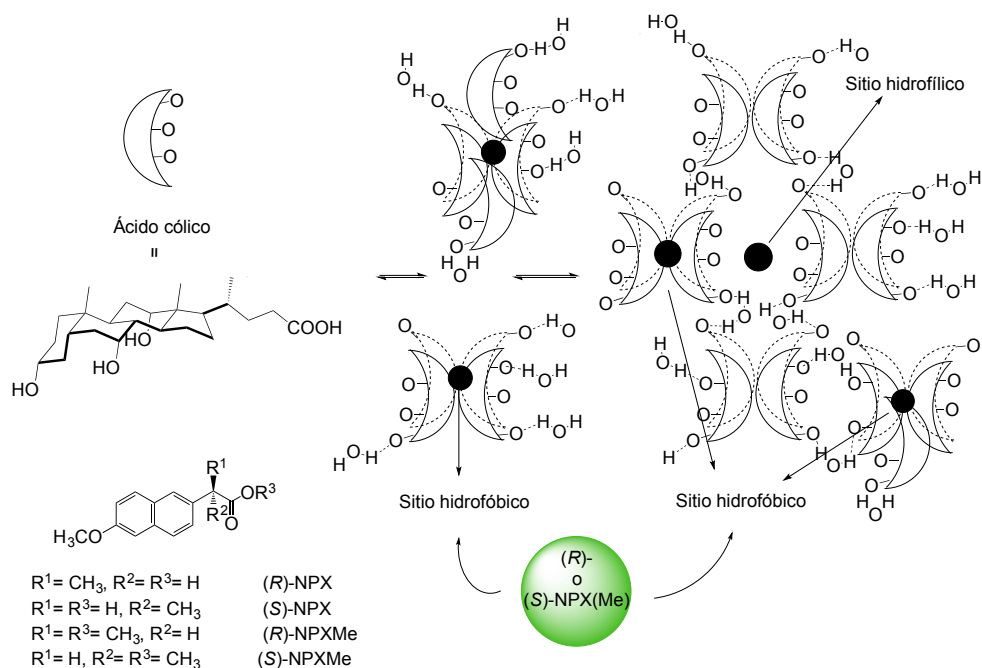


Figura 6.1. Representación esquemática de los derivados de Naproxeno **(R)**- o **(S)**-NPX(Me) incorporados en los agregados de CA.

6.2 Resultados y discusión

En primer lugar, se evaluó el efecto de la adición de NaCA en los espectros de absorción de las sondas utilizadas. Así, los espectros UV-vis de **(R)-** o **(S)-NPX** y **(R)-** o **(S)-NPXMe** se registraron en disoluciones salinas de NaCl 0,2 M al aire en presencia de diferentes concentraciones de NaCA (hasta 300 mM) (**Figura 6.2**). La adición de la sal biliar no produjo cambios significativos en los espectros de absorción, así la forma y posición de las bandas de absorción fueron coincidentes, con máximos a 262, 271, 316 y 332 nm.

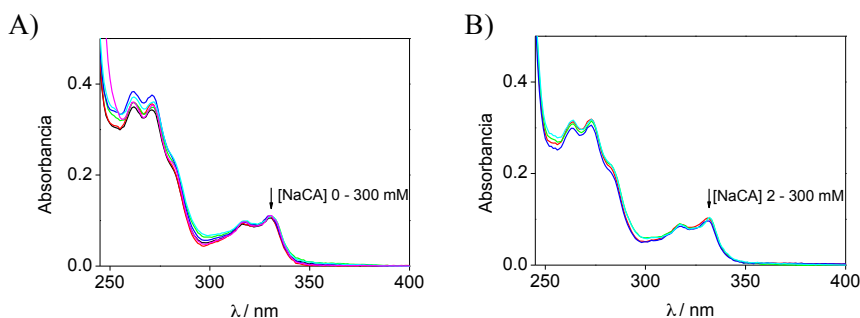


Figura 6.2. Espectros de absorción de disoluciones 60 μM de A) **(R)-** or **(S)-NPX** y B) **(R)-** or **(S)-NPXMe** tras adición de concentraciones crecientes de NaCA en NaCl acuoso 0,2 M.

Por otra parte, los espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 316 \text{ nm}$) tanto en disolución como en presencia de los agregados, mostraron un máximo a $\sim 355 \text{ nm}$ (**Figura 6.3**). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron al aire, en ausencia y presencia de los agregados, usando como patrón **(S)-NPX** en acetonitrilo bajo nitrógeno ($\phi_F = 0,47$).¹⁴³ Se observó un pequeño aumento en los valores de ϕ_F tras la incorporación a los agregados (de 0,39 a 0,41). Del mismo modo, los tiempos de vida de fluorescencia (τ_S) aumentaron de 10 ns en disolución acuosa a 12 o 15 ns para **NPX** o **NPXMe**, respectivamente, dentro de los agregados. Sin embargo, estas diferencias no fueron lo suficientemente significativas como para evaluar la incorporación de **NPX(Me)** en los sitios hidrofóbicos de los agregados primarios y/o secundarios de una manera fiable.

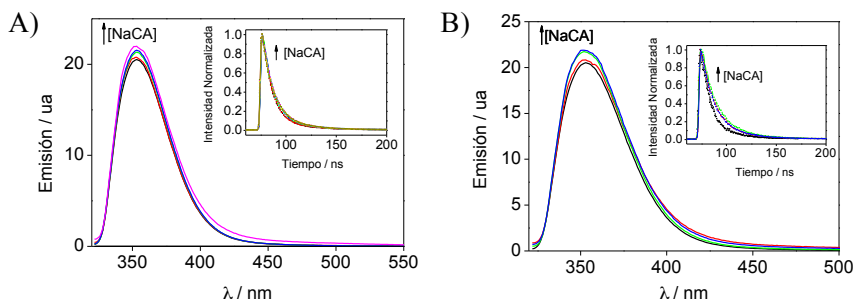


Figura 6.3. Espectros de emisión de: A) (*R*)- o (*S*)-NPX y B) (*R*)- o (*S*)-NPXMe vs. concentración de NaCA hasta 300 mM en NaCl acuoso 0,2 M. Gráficas insertadas: trazas de la desaparición de la fluorescencia.

Por ello, para investigar el grado de unión, se realizaron experimentos de fluorescencia en estado estacionario y tiempo resuelto utilizando una sal (NaI), que principalmente permanece en el agua, ya que la eficiencia de la desactivación, cuando es dinámica, puede ser interpretada como una medida de la accesibilidad del desactivador a la sonda.⁵¹

6.2.1 Estudio de la desactivación de la fluorescencia en estado estacionario y tiempo resuelto

Las **Figuras 6.4** y **6.5** muestran los espectros de fluorescencia de (*R*)-NPX y (*S*)-NPX, respectivamente, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI, a diferentes concentraciones de NaCA (hasta 300 mM). Tal como se observa, la emisión de NPX se desactivó tras la adición de concentraciones crecientes de yoduro sin cambios en la posición del máximo. Los correspondientes cambios en la trazas de la desaparición de la emisión se muestran en las **Figuras 6.6** y **6.7**. La disminución en el valor de la constante de velocidad de desactivación obtenida de los experimentos de tiempo resuelto indica que ésta es, en efecto, dinámica en todos los casos.

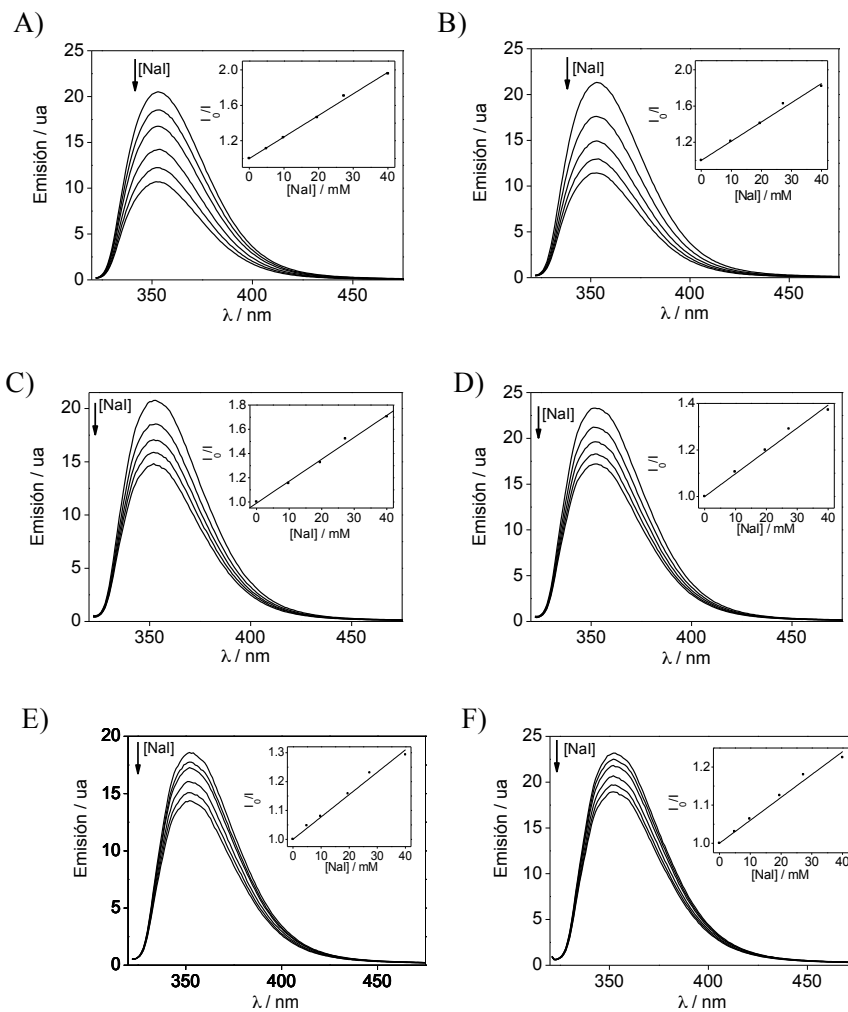


Figura 6.4. Variación en los espectros de emisión de (*R*)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM; D) 75 mM; E) 100 mM y F) 150 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

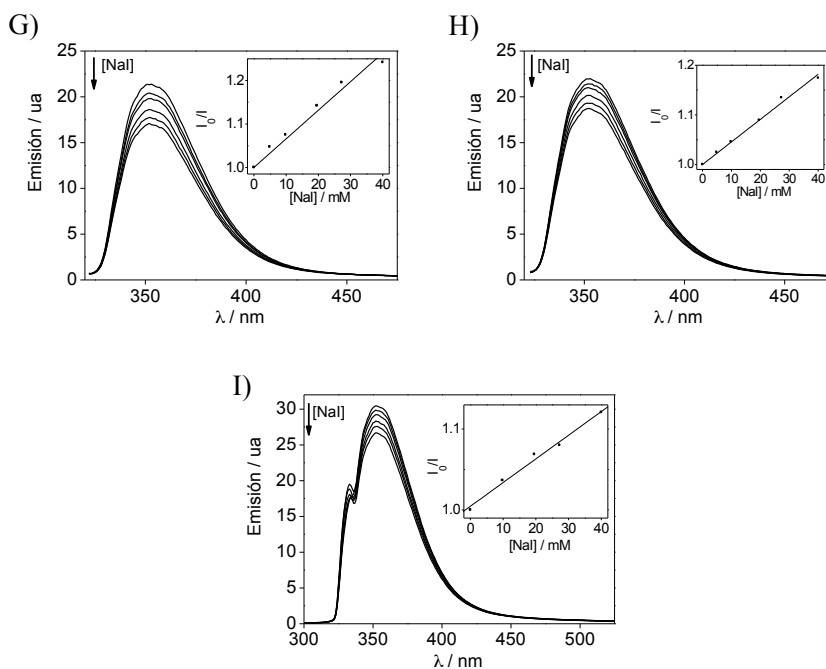


Figura 6.4. (continuación) Variación en los espectros de emisión de (R)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: G) 200 mM; H) 250 mM e I) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

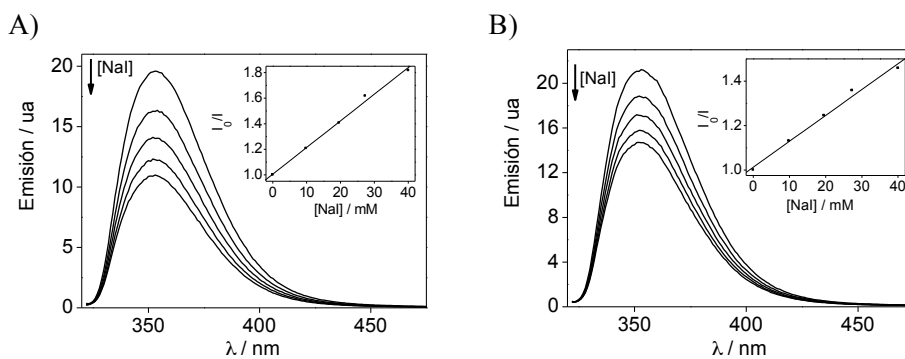


Figura 6.5. Variación en los espectros de emisión de (S)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM y B) 15 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

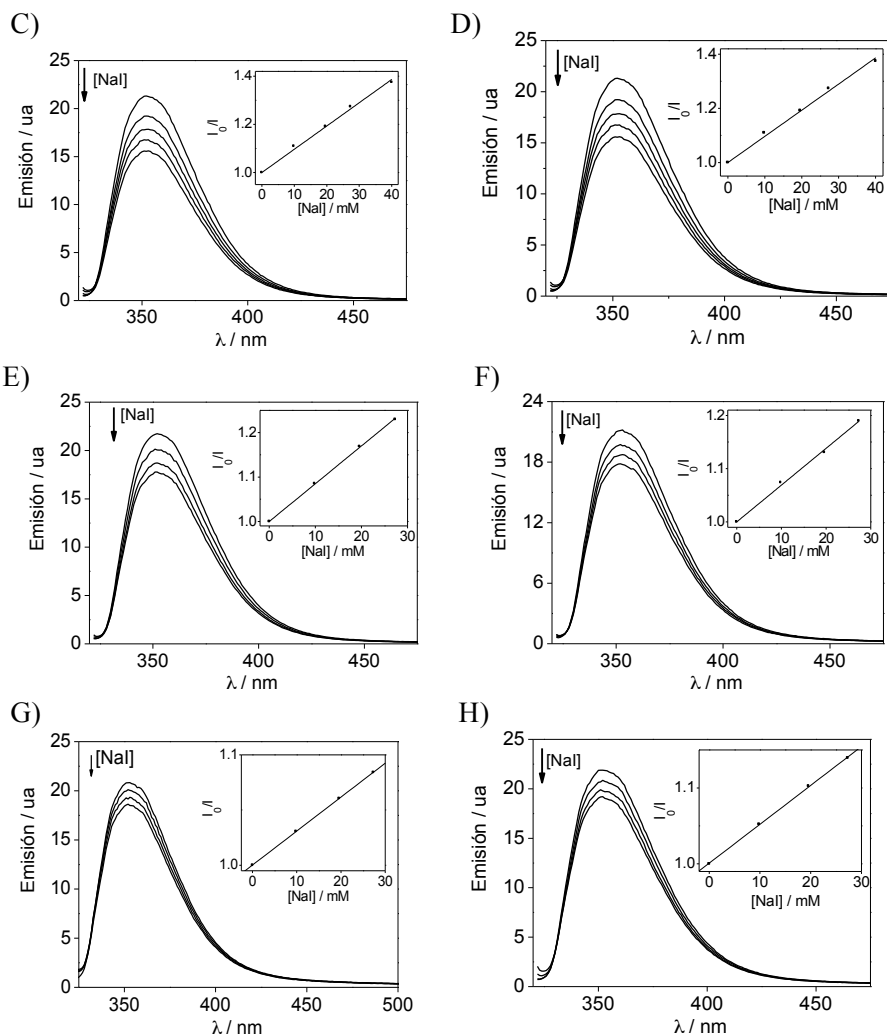


Figura 6.5. (continuación) Variación en los espectros de emisión de (S)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: C) 50 mM; D) 75 mM; E) 100 mM; F) 150 mM; G) 200 mM y H) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

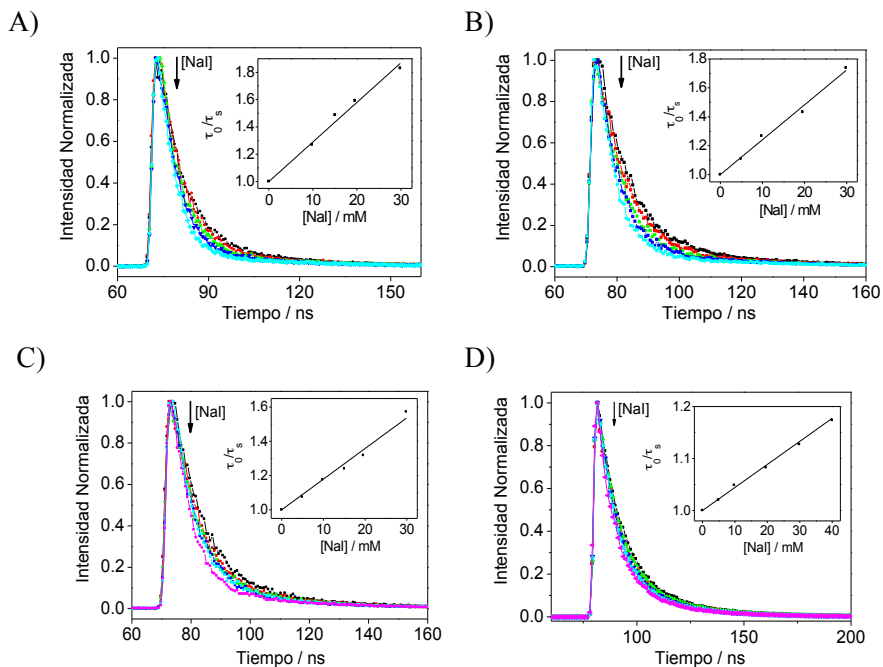


Figura 6.6. Variación en las trazas de desaparición de la fluorescencia de (*R*)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

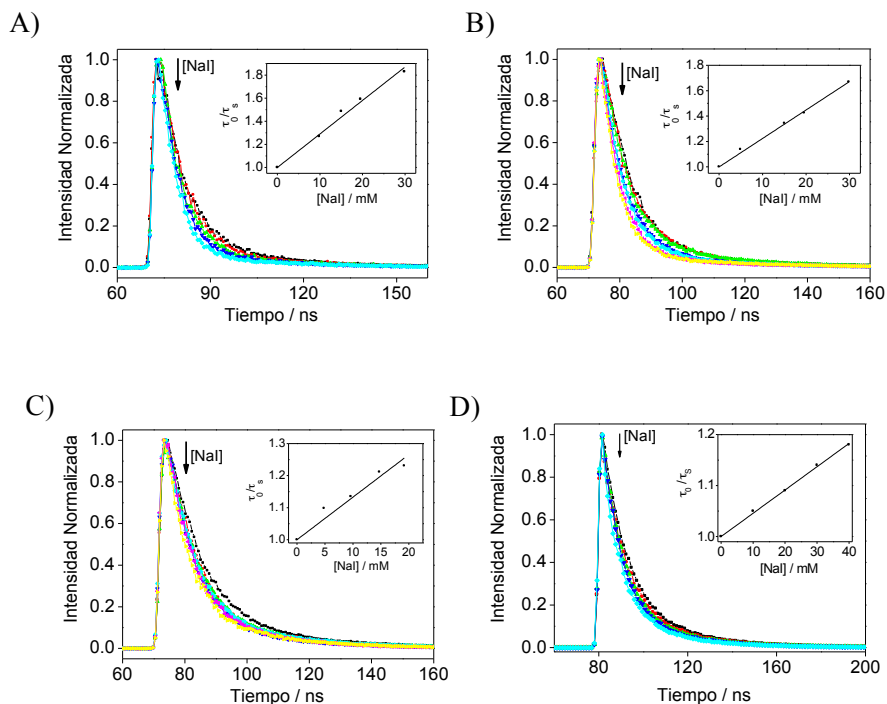


Figura 6.7. Variación en las trazas de desaparición de la fluorescencia de (*S*)-NPX, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

Análogamente, se realizaron los mismos experimentos para los correspondientes ésteres metílicos (**Figuras 6.8-6.11**), y de nuevo, se observó la desactivación dinámica por yoduro. En la **Tabla 6.1A** y **Tabla 6.1B** se muestran los valores obtenidos para las constantes de desactivación k_q^S ($M^{-1}s^{-1}$) en los experimentos realizados tanto en estado estacionario como en tiempo resuelto para (*R*)-, (*S*)-NPX, (*R*)- y (*S*)-NPXMe.

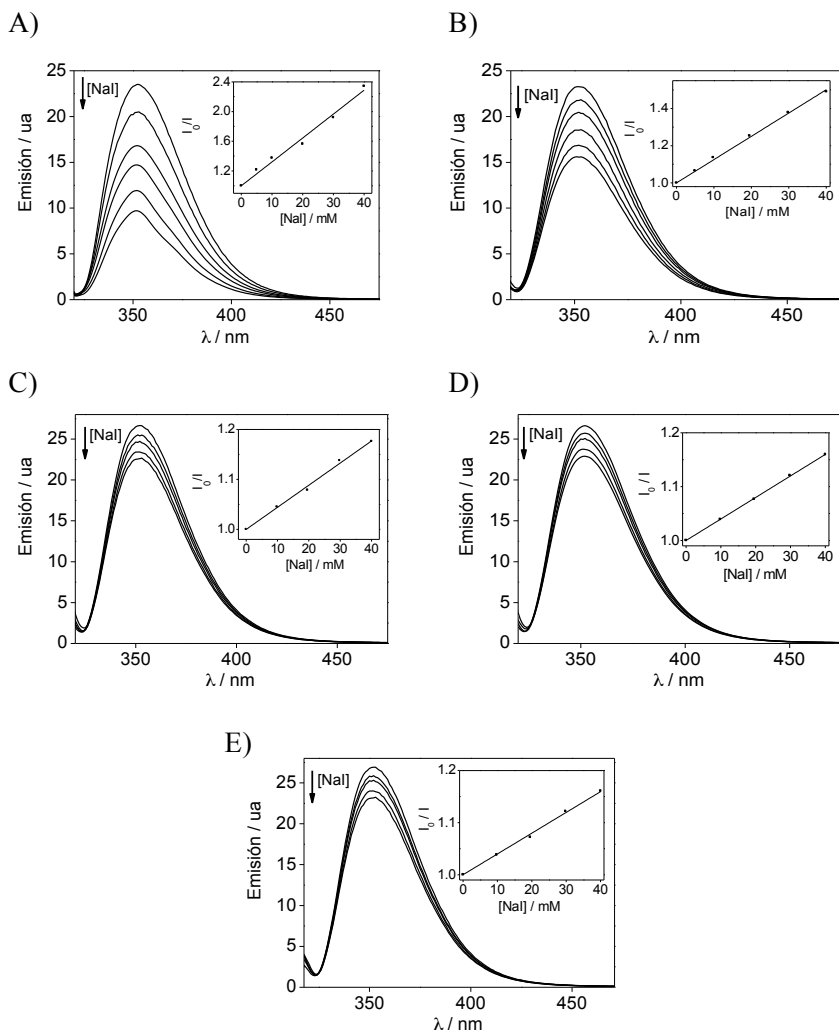


Figura 6.8. Variación en los espectros de emisión de (*R*)-NPXMe, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 2 mM; B) 15 mM; C) 50 mM; D) 200 mM y E) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

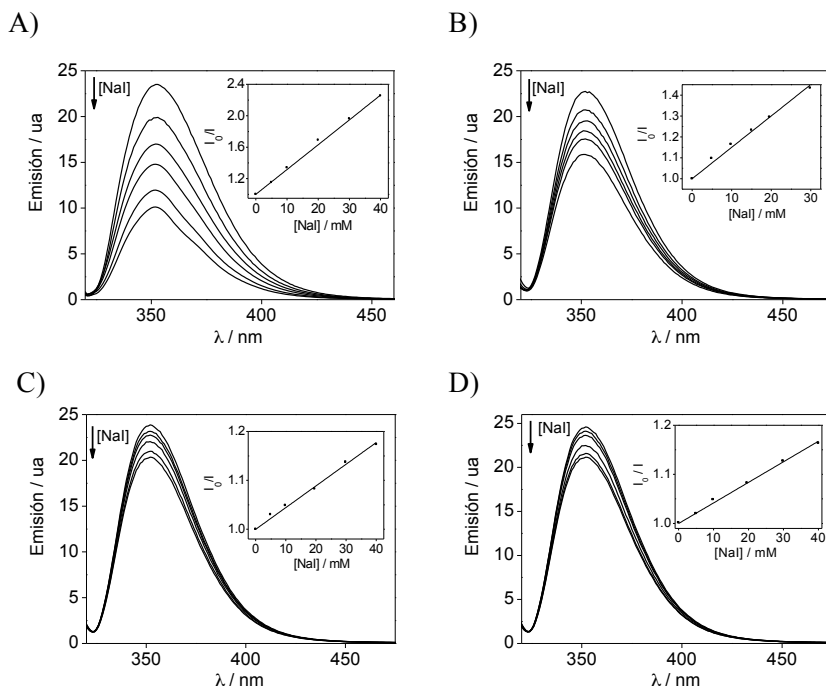


Figura 6.9. Variación en los espectros de emisión de (S)-NPXMe, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 2 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

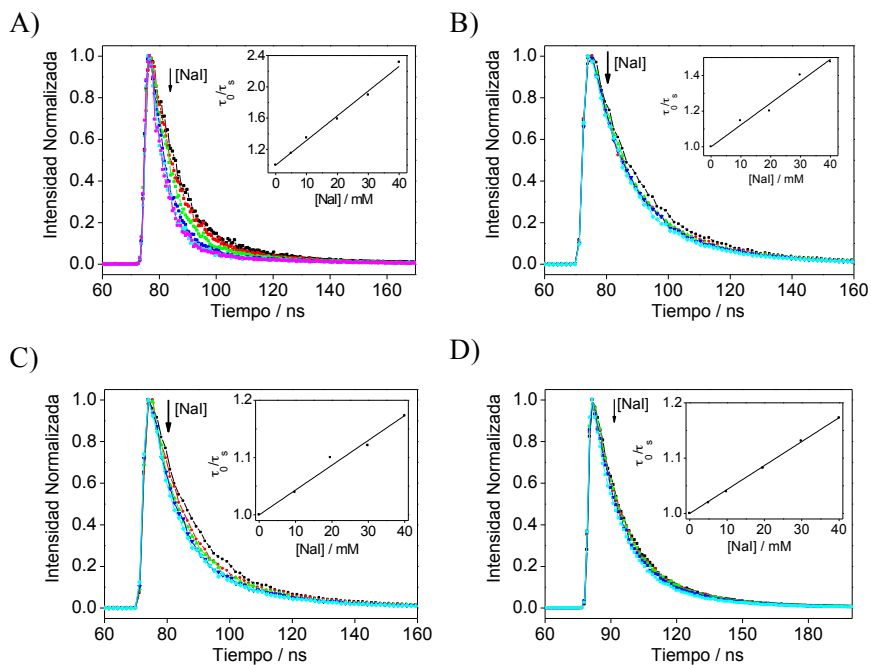


Figura 6.10. Variación en las trazas de desaparición de la fluorescencia de (*R*)-NPXMe en NaCl acuoso 0,2 M, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 2 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

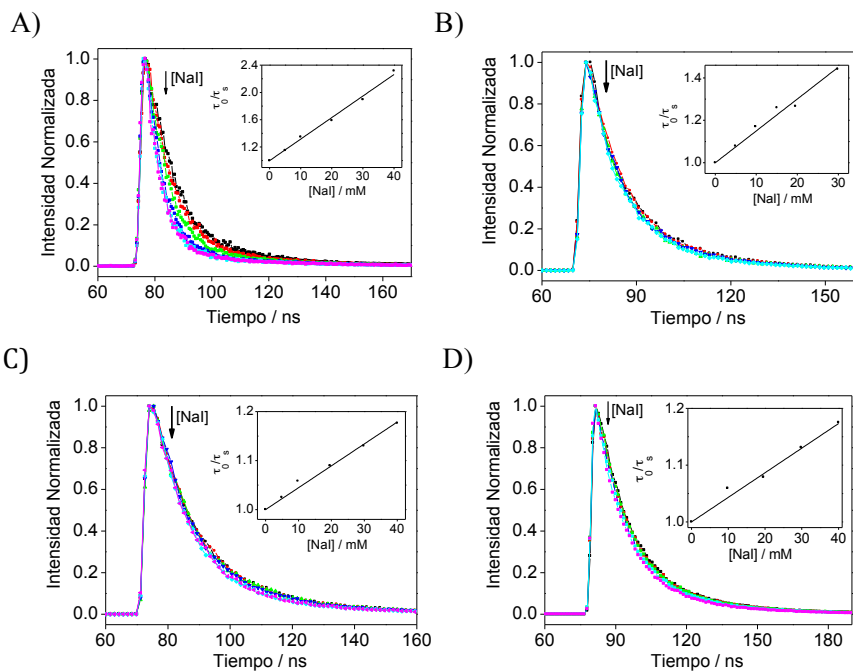


Figura 6.11. Variación en las trazas de desaparición de la fluorescencia de (S)-NPXMe, tras la adición de concentraciones crecientes de NaI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

Tabla 6.1A. Constantes de desactivación de la fluorescencia por yoduro.

$k_q^S / 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$						
[NaCA] / mM	(S)-NPX			(R)-NPX		
	Estado estacionario	Tiempo resuelto	% Incorporado ^b	Estado estacionario	Tiempo resuelto	% Incorporado ^b
0	2.40 ± 0.04	2.90 ± 0.09	0	2.40 ± 0.04	2.90 ± 0.09	0
2	--	--	--	--	--	--
15	2.10 ± 0.05	2.00 ± 0.04	14	2.20 ± 0.05	2.40 ± 0.07	9
50	1.09 ± 0.03	1.10 ± 0.07	62	1.60 ± 0.04	1.60 ± 0.06	37
75	0.87 ± 0.02	--	73	0.87 ± 0.03	--	71
100	0.71 ± 0.01	--	80	0.67 ± 0.02	--	81
150	0.53 ± 0.01	--	89	0.50 ± 0.01	--	89
200	0.41 ± 0.01	0.38 ± 0.01	94	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.01	92
250	--	--	--	0.37 ± 0.01	--	95
300	0.29 ± 0.01	--	100	0.29 ± 0.01	--	100

^a Los experimentos fueron realizados por duplicado y los errores corresponden a las desviaciones promedio.

^b Porcentaje de unión del fármaco (100X) se estimó como:

$$k_q^S = X \cdot k_q^S(a \text{ 300 mM NaCA}) + (1 - X) \cdot k_q^S(a \text{ 0 mM NaCA}) \quad \text{Ec 6.1}$$

^c Extrapolado.

Table 6.1B. Constantes de desactivación de la fluorescencia por yoduro.

$k_q^S / 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$						
[NaCA] / mM	(S)-NPXMe			(R)-NPXMe		
	Steady-State	Time-Resolved	% Incorporado ^b	Estado estacionario	Tiempo resuelto	% Incorporado ^b
0	4.43 ^c	--	0	4.43 ^c	--	0
2	3.30 ± 0.11	3.30 ± 0.08	27	3.30 ± 0.11	3.30 ± 0.08	27
15	1.25 ± 0.03	1.20 ± 0.04	77	0.98 ± 0.01	0.97 ± 0.04	83
50	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.04	99	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	99
75	--	--	--	--	--	--
100	--	--	--	--	--	--
150	--	--	--	--	--	--
200	--	0.32 ± 0.01	--	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.04	100
250	--	--	--	--	--	--
300	0.27 ± 0.01	--	100	0.27 ± 0.01	--	100

^a Los experimentos fueron realizados por duplicado y los errores corresponden a las desviaciones promedio.

^b Porcentaje de unión del fármaco (100X) se estimó como:

$$k_q^S = X \cdot k_q^S(a \text{ 300 mM NaCA}) + (1 - X) \cdot k_q^S(a \text{ 0 mM NaCA}) \quad \text{Ec 6.1}$$

^c Extrapolado.

En general, la constante de desactivación de la emisión por yoduro disminuyó con el aumento de la afinidad del fármaco por los sitios hidrofóbicos de los agregados (**Figura 6.12**). Así, para (*R*)- o (*S*)-NPX en disolución (**Figura 6.12 superior**), se observó una desactivación muy eficiente por yoduro en disolución; sin embargo, para el éster metílico en presencia de 50 mM NaCA (**Figura 6.12 inferior**) no se observó desactivación, lo que fue indicativo de la incorporación del éster en los agregados a esa concentración. Una situación intermedia se encontró para los ácidos a 50 mM, ya que a esa concentración de NaCA, el NPX se encuentra parcialmente en disolución (**Figura 6.12 centro**).

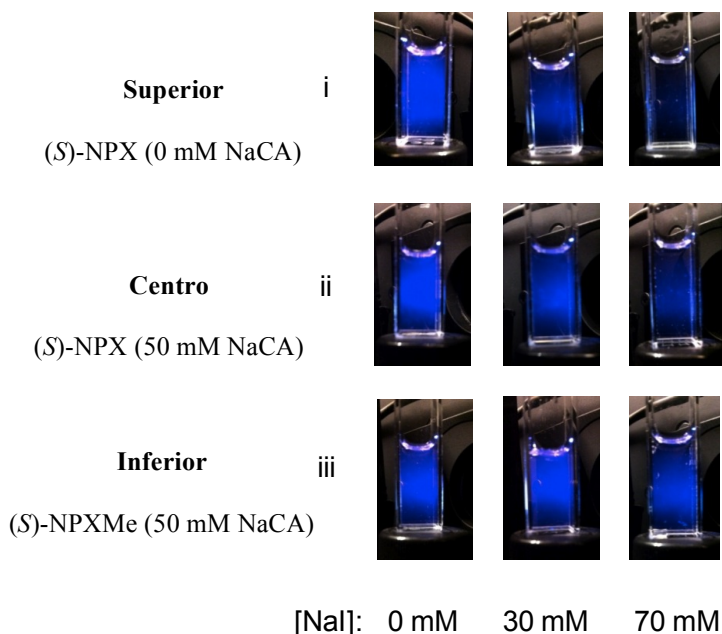


Figura 6.12. Imágenes de la emisión de la fluorescencia por yoduro (i) (*S*)-NPX en NaCl acuoso 0,2 M; (ii) (*S*)-NPX en NaCl acuoso 0,2 M en presencia de 50 mM NaCA y (iii) (*S*)-NPXMe en NaCl 0,2 M acuoso en presencia de 50 mM NaCA.

A continuación, se representaron las constantes de desactivación (k_q^S) frente a la concentración de NaCA (**Figura 6.13**). Se observó, un fuerte descenso en los valores de las constantes para los ésteres metílicos (**NPXMe**), mientras que para los ácidos carboxílicos la disminución fue mucho más gradual.

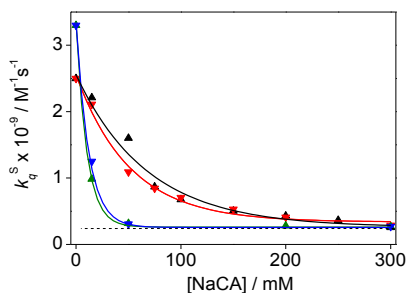


Figura 6.13. Variación de las constantes de desactivación de la fluorescencia por yoduro (k_q^S , $M^{-1}s^{-1}$) para (**R**)-NPX (\blacktriangle), (**S**)-NPX (\blacktriangledown), (**R**)-NPXMe (\blacktriangle) y (**S**)-NPXMe (\blacktriangledown) versus concentración de NaCA.

Como se muestra en la **Figura 6.13**, se observó una desactivación muy efectiva para **NPXMe** a 2 mM de NaCA ($3,3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$), mientras que ésta se redujo notablemente hasta $3 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ en presencia de 50 mM NaCA, lo que indica que el **NPXMe** está mayoritariamente incorporado en los sitios hidrofóbicos de los agregados a partir de esta concentración. En el caso de (**R**)- o (**S**)-NPX, los valores de las constantes de desactivación variaron de forma gradual de $2,4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ en disolución (**Figura 6.13**) a $3 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ a 300 mM NaCA indicando que no se incorporan de forma mayoritaria a los agregados hasta esa concentración. La disminución de la constante de desactivación en un orden de magnitud ya se ha observado en la literatura para sondas fluorescentes, tales como naftaleno o pireno, como un hecho inequívoco de la incorporación de las sondas a los agregados.¹¹² Teniendo en cuenta que en concentraciones de NaCA superiores a 50 mM, más de 95% del ácido cólico está formando agregados secundarios,¹ las tendencias observadas para los ácidos y sus ésteres metílicos, pueden ser interpretadas como una demostración de la diferente distribución de estos fármacos entre disolución y los microambientes hidrofóbicos proporcionados por los agregados primario / secundario.

6.2.2 Estudio de la desactivación del triplete por fotólisis de destello láser

Un enfoque complementario al estudio realizado anteriormente consistió en la realización de experimentos de fotólisis de destello láser para las sondas en disolución y a diferentes concentraciones de NaCA (hasta 200 mM). Los espectros de absorción transitoria en presencia de los agregados muestran una banda principal a 440 nm, característica de la absorción triplete-triplete del naproxeno en disolución (ver **Figura 6.14A** para el (*S*)-NPX como un ejemplo representativo).¹⁴⁴ Además, se observó un aumento significativo en el tiempo de vida de triplete a concentraciones altas de NaCA, lo que se asoció con la incorporación del fármaco en los agregados (**Figura 6.14B**).

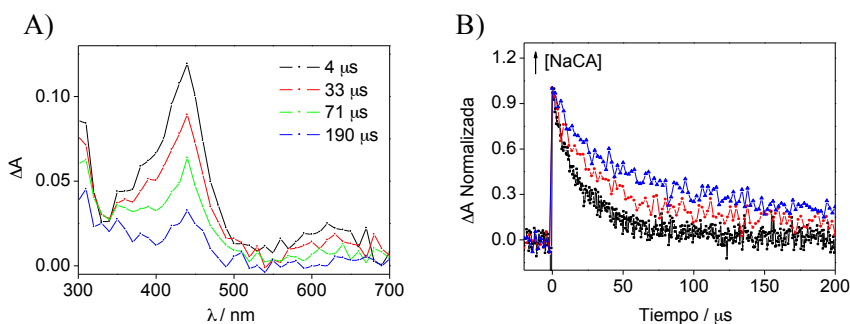


Figura 6.14. A) Espectros de absorción transitoria para (*S*)-NPX obtenidos a diferentes tiempos tras el pulso del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) a 200 mM NaCA, bajo N_2 . B) Trazas normalizadas de la desaparición del triplete registradas a 440 nm en presencia de diferentes concentraciones NaCA: (■) 0, (●) 100 mM, (▲) 200 mM.

De manera análoga a los experimentos en fluorescencia de tiempo resuelto, se registraron las trazas correspondientes al tiempo de vida de triplete en presencia de un desactivador acuoso, en este caso, NaNO_2 . En las **Figuras 6.15-6.18** se muestran las trazas registradas a 440 nm de (*R*)- o (*S*)-NPX(Me) en presencia de nitrito, así como los correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

Tal como se observa en las figuras, la desactivación fue muy eficiente, de acuerdo con los resultados obtenidos para la fluorescencia. En todos los casos, la desactivación del triplete de los **NPX(Me)** en presencia y ausencia de sales biliares se ajustaron a una ecuación monoexponencial (ver valores de constantes de desactivación en **Tabla 6.2**).

Se observó que las constantes eran fuertemente dependientes de la concentración NaCA, y se obtuvieron valores que variaron de $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para (**R**)- o (**S**)-NPX en disolución a $\sim 2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 200 mM. Una vez más, las constantes aparentes de velocidad de desactivación del triplete (k_q^T) por nitrito reflejan no sólo la constante de desactivación real, sino también el porcentaje de **NPX(Me)** que permanece en disolución.

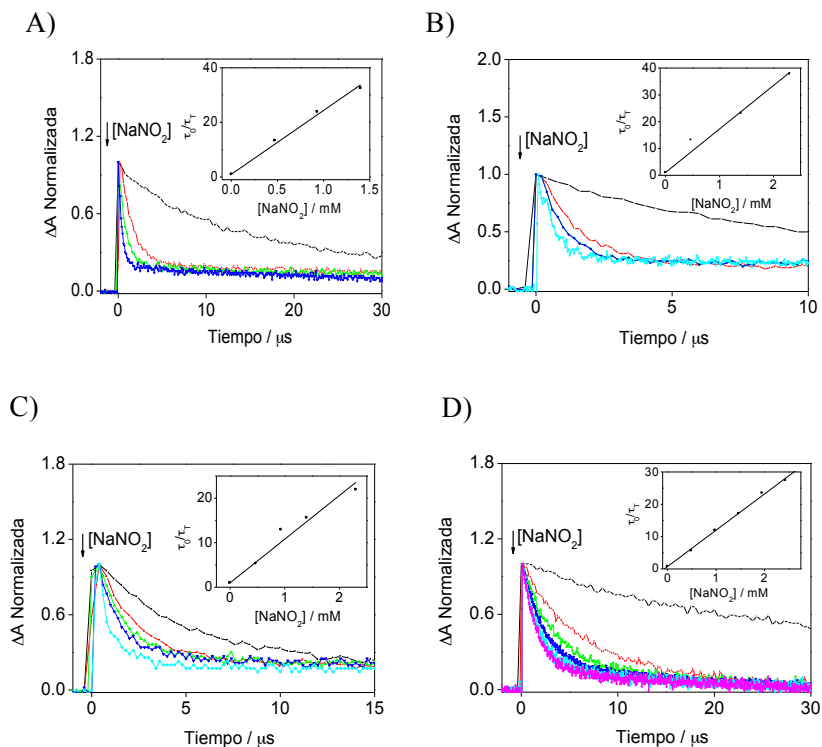


Figura 6.15. Variaciones en el tiempo de vida de triplete de (**R**)-NPX registrado a 440 nm con adiciones crecientes de NaNO_2 a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM, bajo N_2 . Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer. En todos los casos, la desaparición del tiempo de vida del triplete fue ajustado a una función monoexponencial, con valores de r^2 superiores a 0,98.

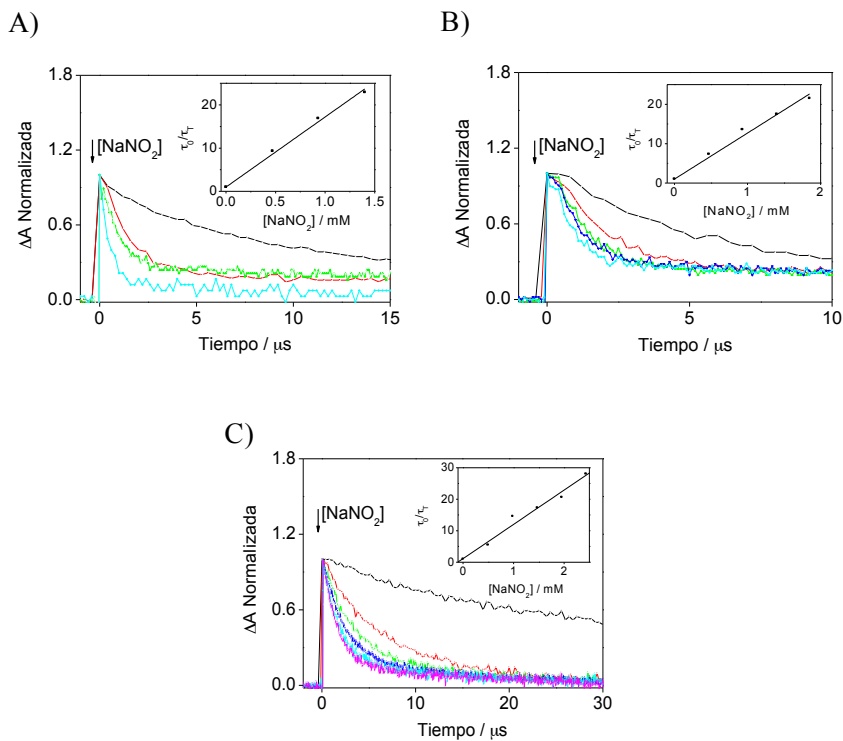


Figura 6.16. Variaciones en el tiempo de vida de triplete de (*S*)-NPX registrado a 440 nm con adiciones crecientes de NaNO₂ a diferentes concentraciones de NaCA: A) 15 mM; B) 50 mM y C) 200 mM, bajo N₂. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer. En todos los casos, la desaparición del triplete fue ajustado a una función monoexponencial, con valores de r² superiores a 0,98.

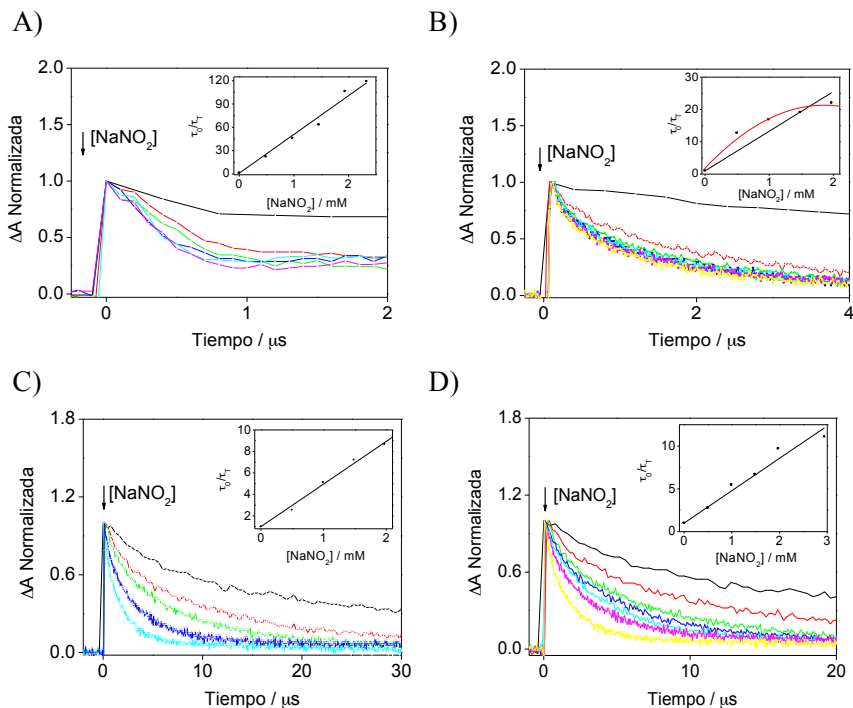


Figura 6.17. Variaciones en el tiempo de vida de triplete de (*R*)-NPXMe registrado a 440 nm con adiciones crecientes de NaNO₂ a diferentes concentraciones de NaCA: A) 2 mM; B) 15 mM; C) 50 mM y D) 200 mM, bajo N₂. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer. En todos los casos, la desaparición del triplete fue ajustado a una función monoexponencial, con valores de r^2 superiores a 0,98.

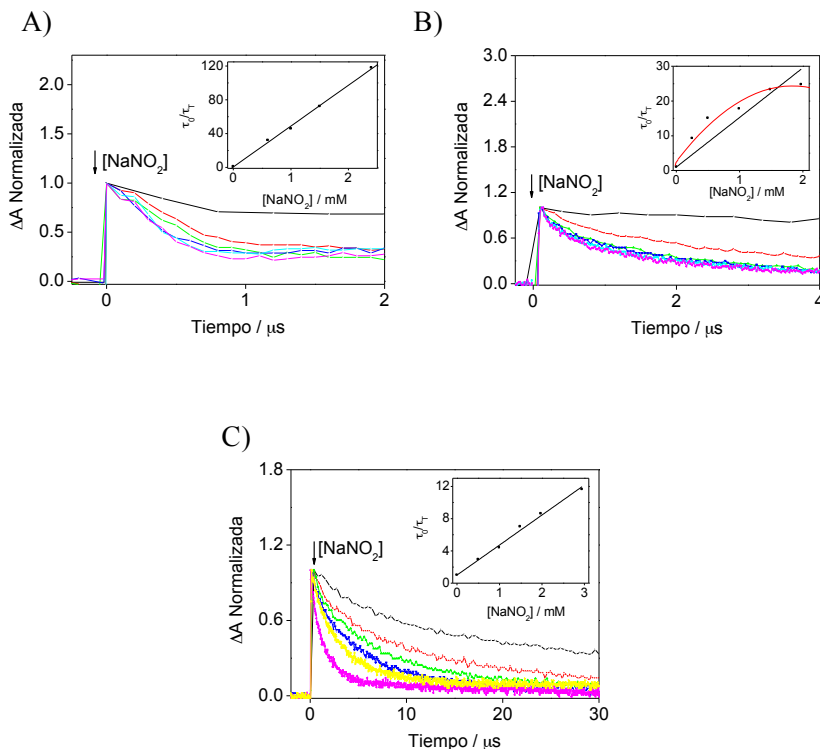


Figura 6.18. Variaciones en el tiempo de vida de triplete de (*S*)-NPXMe registrado a 440 nm con adiciones crecientes de NaNO₂ a diferentes concentraciones de NaCA: A) 2 mM; B) 15 mM y C) 50 mM, bajo N₂. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer. En todos los casos, la desaparición del triplete fue ajustado a una función monoexponencial, con valores de r² superiores a 0,98.

En general, como se observa en las **Figuras 6.15-6.18**, los ajustes de los resultados obtenidos de la desactivación fueron lineales. Sin embargo, a la concentración de 15 mM de NaCA para (*R*)- o (*S*)-NPXMe, resultaron ser curvados, lo que puede atribuirse a la movilidad del huésped en el estado excitado triplete entre el anfitrión y la fase acuosa. Para comprobar este hecho, los datos se analizaron empleando un modelo de ajuste previamente publicado en la literatura.^{112,145} Los nuevos valores de k_q^T obtenidos mediante la aplicación de este modelo fueron ligeramente inferiores ($2,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para (*S*)-NPXMe y (*R*)-NPXMe, respectivamente) a los determinados directamente del ajuste de SternVolmer (**Tabla 6.2**). Los valores de k_q^T para NPX(Me) variaron de a $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en disolución a $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en presencia de 200 mM NaCA.

Tabla 6.2. Constantes de desactivación del triplete por nitrito.

$k_q^T / 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$				
[NaCA] / mM	(S)-NPX	(R)-NPX	(S)-NPXMe	(R)-NPXMe
0	1.50 ± 0.03	1.50 ± 0.03	--	--
2	--	--	2.30 ± 0.10	2.30 ± 0.08
15	0.82 ± 0.02	0.92 ± 0.04	0.42 ± 0.05 *	0.48 ± 0.05 *
50	0.38 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
200	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	--	0.21 ± 0.01

^a Los experimentos fueron realizados por duplicado y los errores corresponden a las desviaciones promedio.

* Ecuación 6.2:

$$k_{obs} = k_0^{SB} + k_{dis} + k_q^{SB}[Q] - \frac{k_{dis}k_{as} \frac{[NaCA]}{N}}{k_{as} \frac{[NaCA]}{N} + k_0 + k_q[Q]} \quad \text{Ec 6.2}$$

donde k_0 y k_0^{SB} son las constantes de velocidad en ausencia del desactivador del **NPX(Me)** en disolución y en presencia de agregados de SBs, respectivamente, k_q y k_q^{SB} son las constantes de desactivación del triplete en disolución y en presencia de agregados de SBs, respectivamente, k_{as} y k_{dis} son las constantes de asociación y disociación del triplete de los **NPX(Me)** con los agregados, y $[NaCA]/N$ corresponde a la concentración de sitios de unión en su conjunto, siendo $[NaCA]$ la concentración de sal biliar y N el número de agregación.

Al representar los valores obtenidos de k_q^T en función de la concentración de NaCA se observó, de acuerdo con los resultados obtenidos para la desactivación del singlete, un descenso más acusado en los valores de k_q^T para **NPXMe** con el aumento de concentración de NaCA hasta llegar a una meseta ($[\text{NaCA}] \sim 50 \text{ mM}$) (**Figura 6.19**). Esto indica una alta afinidad del cromóforo más hidrófobo hacia el ambiente más protegido que proporcionan los agregados. Como era previsible dado el carácter más hidrófilo del ácido, la disminución de k_q^T para **NPX** fue más gradual, lo que se traduce en una afinidad menor por los microambientes hidrofóbicos de los agregados.

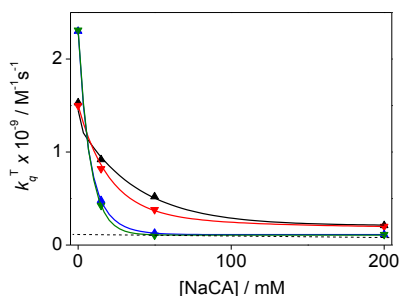


Figure 6.19. Variación de las constantes de desactivación del triplete (k_q^T , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) por nitrito para (*R*)-NPX (▲), (*S*)-NPX (▼), (*R*)-NPXMe (▲) y (*S*)-NPXMe (▼) vs concentración de NaCA en NaCl acuoso anaeróbico 0,2 M.

6.3 Conclusiones

Se ha demostrado que las técnicas fotofísicas son una metodología directa, sencilla y sensible para evaluar el potencial de los agregados de ácidos biliares como transportadores de fármacos. Para ello se han empleado (*R*)-, (*S*)-NPX, (*R*)- y (*S*)-NPXMe como sondas representativas con diferente hidrofobicidad. La desactivación de singlete y triplete utilizando sales que residen principalmente en la fase acuosa, pone de manifiesto la diferente distribución de los ácidos carboxílicos libres y sus ésteres entre la disolución y los agregados. Se ha demostrado que incluso los fármacos más hidrófilos pueden ser incorporados de manera sustancial en los agregados si se eligen las concentraciones apropiadas de sal biliar. Este concepto puede, en principio, extenderse a otros fármacos que contengan cromóforos fotoactivos.

6.4 Método Experimental

Colato sódico (NaCA), (*R*)- y (*S*)-NPX, dimetilsulfóxido (DMSO), y NaCl se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron tal y como se suministraron. Los metil ésteres (*R*)- y (*S*)-NPXMe fueron sintetizados como se describe en la literatura.¹²⁵ Se prepararon disoluciones stock de (*R*)- o (*S*)-NPX(Me) 5 mM en DMSO para su utilización posterior en las medidas fotofísicas.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron utilizando como patrón: NPX/ CH₃CN/ aire ($\phi = 0,47$),¹²⁵ utilizando la **ecuación 4.3 (Capítulo 4)**.

En las medidas de fluorescencia se corrigieron los espectros con experimentos control para eliminar la emisión Raman del disolvente. En todas las disoluciones, la concentración de NPX(Me) en presencia y ausencia de NaCA fue de 60 μ M, que aseguró que la absorbancia de todas las disoluciones fuera inferior de 0,1 a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 316$ nm). Todas las medidas se realizaron al aire. En los experimentos de desactivación de fluorescencia, se añadieron los volúmenes apropiados de una disolución recién preparada de NaI (2 M) a las disoluciones al aire de NPX(Me) con la correspondiente concentración de NaCA.

Para los experimentos de fotólisis de destello láser, la absorbancia de las soluciones se mantuvo a $\sim 0,3$ a $\lambda_{exc} = 266$ nm. En un experimento típico de desactivación, se añadieron los volúmenes apropiados de una disolución recién preparada de NaNO₂ (250 mM) a las disoluciones de NPX(Me) previamente purgadas bajo N₂ con la concentración correspondiente de NaCA.

Capítulo 7

Desactivación de fluorescencia en diferentes sistemas supramoleculares

7.1 Introducción

La albúmina sérica humana (HSA) se sintetiza en el hígado y constituye alrededor del 60% del total de proteína del plasma humano,¹⁴⁶ actuando como vehículo y distribuidor de ácidos biliares, hormonas o fármacos.¹⁴⁷ La HSA posee un único triptófano (Trp)¹⁴⁸ y las cadenas polipeptídicas que la forman se doblan formando hélices que se agrupan en tres dominios homólogos (I, II y III),¹⁴⁹ en los cuales interacciona con sustratos de distinta naturaleza. En el plasma, la HSA es la proteína de unión preferente de los ácidos biliares (88%)^{27,150-152} y es conocido que éstos son transportados de vuelta desde el intestino hasta el hígado por la albúmina, como parte del ciclo de la circulación enterohepática. En el grupo de investigación se estudió la incorporación de ácidos biliares fotoactivos derivatizados con nitrobenzofurano (NBD) o dansilo (Dns) en HSA, demostrándose la transferencia de energía entre el único triptófano presente en la HSA y el cromóforo unido covalentemente al esqueleto esteroideal del ácido cólico, a determinándose además el sitio de unión preferente.¹²¹

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la agregación de las sales biliares (SBs) más abundantes en el organismo utilizando sondas fotoactivas derivadas del ácido cólico (**Capítulo 4**).^{127,153} Empleando además sondas fotoactivas de colesterol, se ha demostrado la incorporación de ácido cólico y colesterol en micelas mixtas (**Capítulo 5**).¹⁵⁴ Se han utilizado además, las técnicas fotofísicas para demostrar el potencial de los agregados de SBs como transportadores de fármacos (**Capítulo 6**),¹⁵⁵ demostrando ser valiosas herramientas para investigar el grado de unión de diferentes tipos de huéspedes.

En este capítulo se aplicarán los conocimientos adquiridos en los capítulos anteriores sobre agregados de SBs y MM, así como de desactivación de estados excitados de sondas incorporadas en agregados de CA, para estudiar procesos de desactivación de la fluorescencia en sistemas supramoleculares como los agregados de SBs y las MM.

Se estudiará la desactivación por yoduro de la emisión de compuestos que contengan el cromóforo Trp o Dns libres o unidos a un esqueleto de ácido cólico. Se utilizarán además nuevos derivados fotoactivos que contengan los dos cromóforos unidos a la misma molécula, con objeto de asegurar una posición idéntica de los fluoróforos dentro de los microambientes. Estos últimos podrán ser empleados además como modelos para estudiar procesos de transferencia de energía (TE) (**Figura 7.1**).

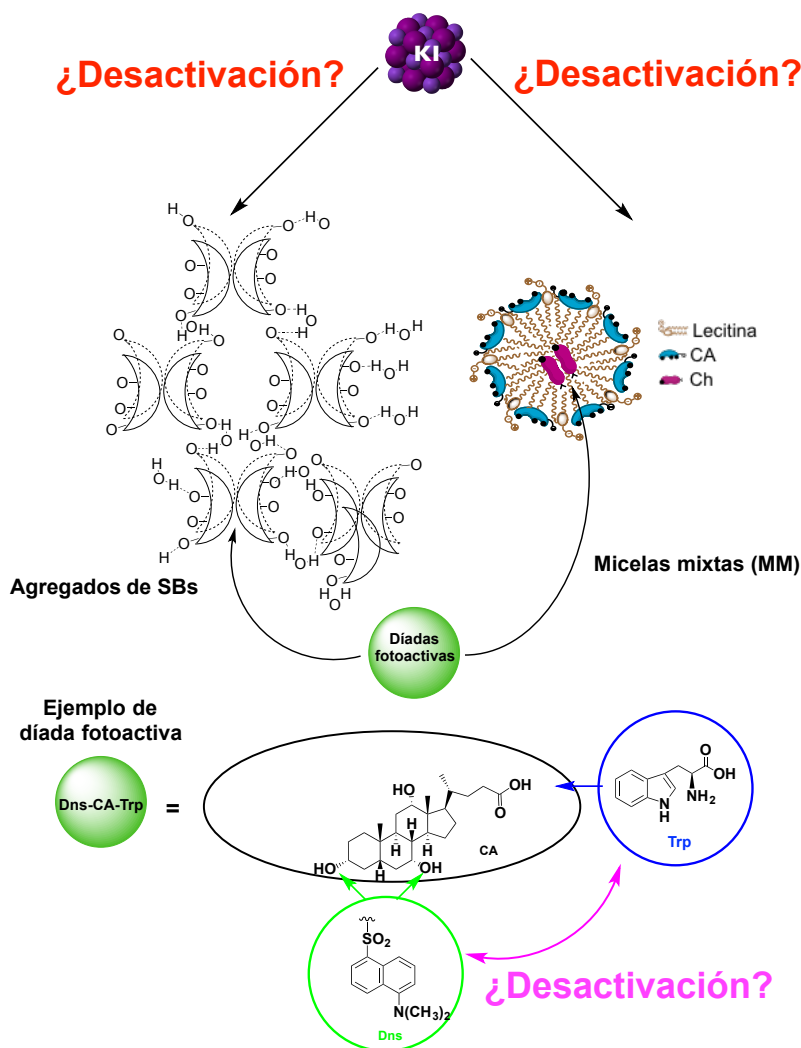


Figura 7.1. Representación esquemática del estudio de procesos de desactivación de la fluorescencia tras la incorporación de los derivados de Dns y Trp unidos covalentemente a ácido cólico formando una única diada en agregados de CA y micelas mixtas.

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Desactivación de la fluorescencia en derivados conteniendo el cromóforo triptófano

Para estudiar la desactivación de la fluorescencia del cromóforo **Trp** por yoduro se eligieron distintos derivados de **Trp** con distinta polaridad (**Figura 7.2**). En primer lugar, se evaluó el efecto de la adición de NaCA en los espectros de absorción de las sondas elegidas. Así, se registraron los espectros UV-vis de **Trp**, **AcTrpMe** y **CA-Trp** en disoluciones salinas de NaCl 0,2 M al aire, en presencia de diferentes concentraciones de NaCA (hasta 300 mM) (Véase **CA-Trp** en **Figura 7.3** como ejemplo). La adición de sal biliar no produjo cambios significativos en la forma y posición de las bandas de absorción respecto a disolución, presentando un máximo a 280 nm y dos pequeños hombros a 273 y 290 nm para los tres compuestos utilizados.

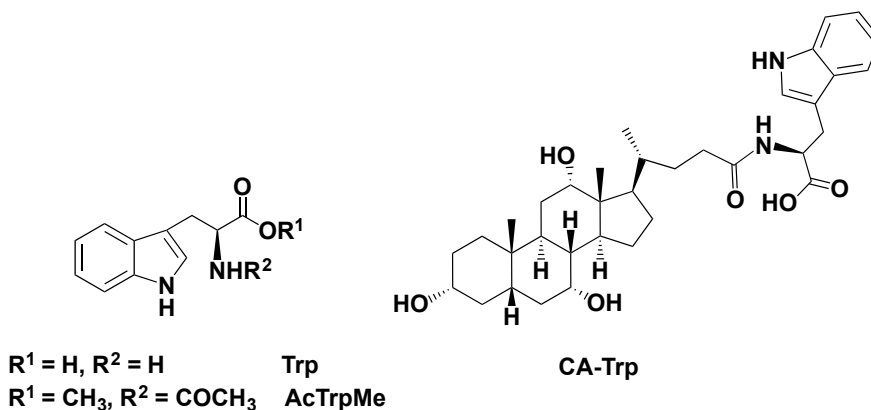


Figura 7.2. Estructuras de los derivados fotoactivos seleccionados.

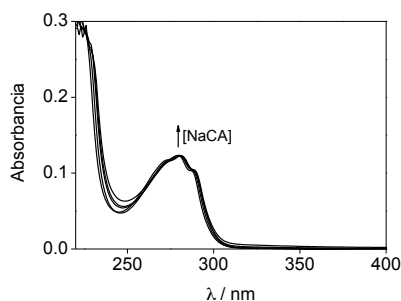


Figura 7.3. Espectros de absorción de disoluciones 15 μM de **CA-Trp** tras adición de concentraciones crecientes de NaCA (0-300 mM) en NaCl acuoso 0,2 M.

A continuación, se registraron los espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$) tanto en disolución como en presencia de los agregados (**Figura 7.4**). En todos los casos se observó un ligero aumento de la emisión a medida que se incrementó la concentración de NaCA. En el caso de **AcTrpMe** y **CA-Trp**, el máximo de emisión experimentó un efecto hipocrómico a medida que aumentó la concentración de NaCA (**Figuras 7.4B** y **C**), indicando cualitativamente la incorporación de la sondas en el interior de los agregados de CA. Esto no ocurrió para **Trp** (**Figura 7.4A**). Los tiempos de vida de fluorescencia (τ_s) para **Trp** y **AcTrpMe** aumentaron de 2,5 y 1,2 ns en disolución acuosa a 4,5 y 2,3 ns, respectivamente; mientras que para el caso de **CA-Trp** no se observó aumento del τ_s en presencia de los agregados, obteniéndose un valor constante de 5,9 ns.

Tras evaluar el comportamiento de las sondas frente a la adición de NaCA se realizaron los estudios de la desactivación de la fluorescencia tanto en disolución como en presencia de distintas concentraciones de NaCA.

Las **Figuras 7.5-7.7** muestran los espectros de fluorescencia de **Trp**, **AcTrpMe** y **CA-Trp**, respectivamente, tras la adición de concentraciones crecientes de KI, a diferentes concentraciones de NaCA (hasta 300 mM). La desactivación de la emisión disminuyó progresivamente en el caso de **Trp** y **AcTrpMe** conforme aumentó la concentración de NaCA, mientras que en el caso de **CA-Trp** se observó una disminución brusca entre 0 y 50 mM de NaCA, manteniéndose constante a partir de esa concentración.

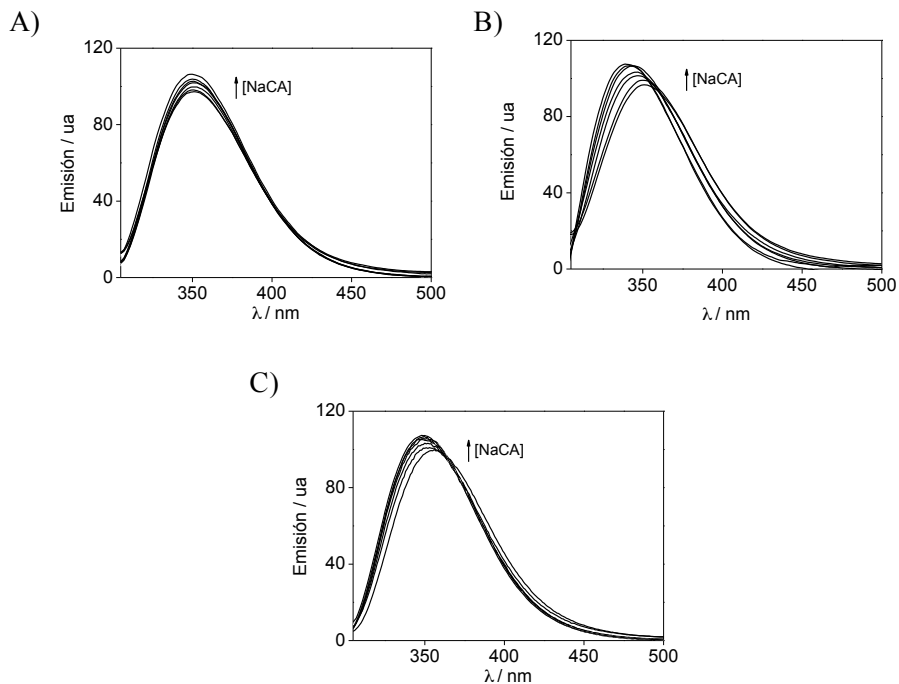


Figura 7.4. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de A) **Trp**, B) **AcTrpMe** y C) **CA-Trp** tras la adición de concentraciones crecientes de NaCA (hasta 300 mM) en NaCl acuoso 0,2 M. La concentración del derivado fotoactivo en todas las muestras fue de 15 μ M.

En la **Tabla 7.1** se muestran los valores obtenidos para las constantes de desactivación k_q^S ($M^{-1}s^{-1}$) de los diferentes **Trp**, **AcTrpMe** y **CA-Trp** en los experimentos realizados en estado estacionario.

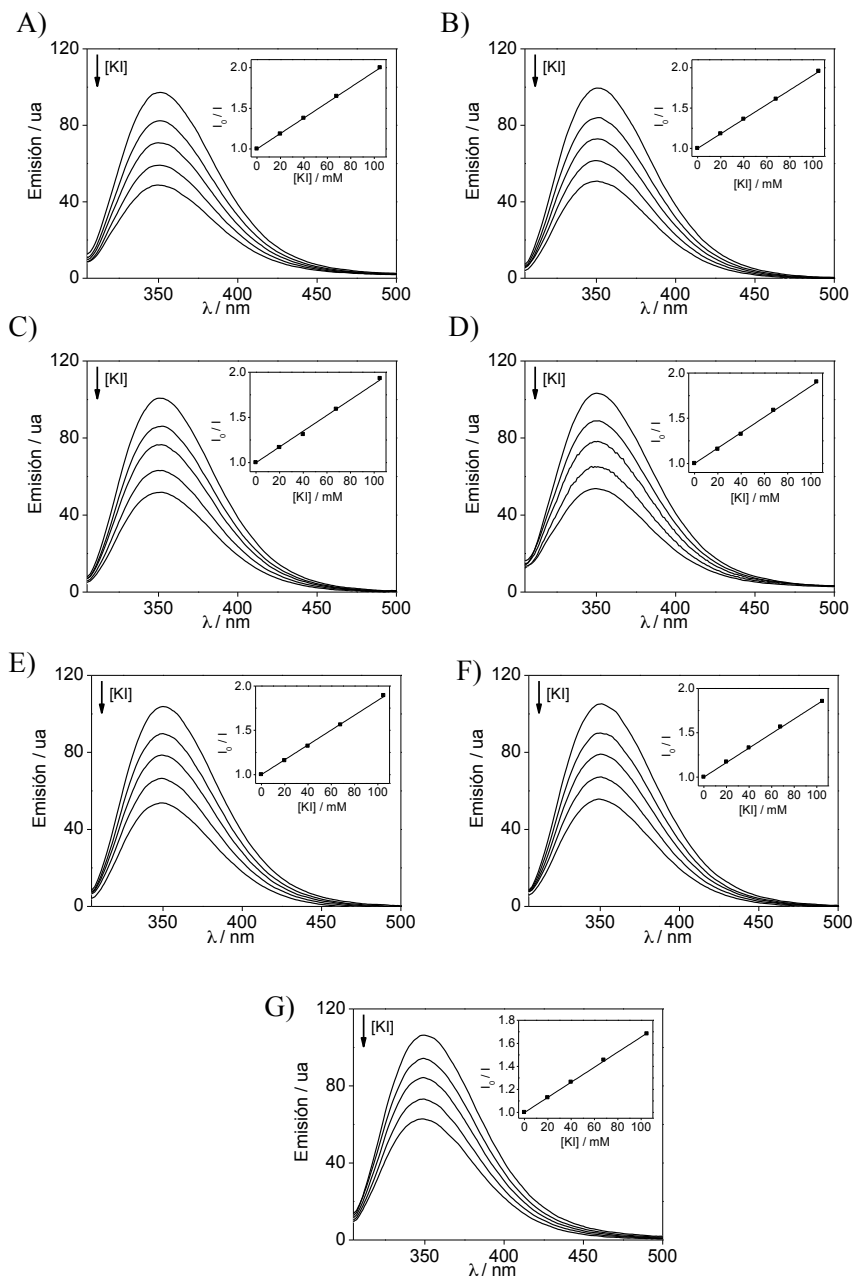


Figura 7.5. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de **Trp** tras la adición de concentraciones crecientes de KI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM; B) 15 mM; C) 50 mM; D) 75 mM; E) 100 mM; F) 200 mM y G) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

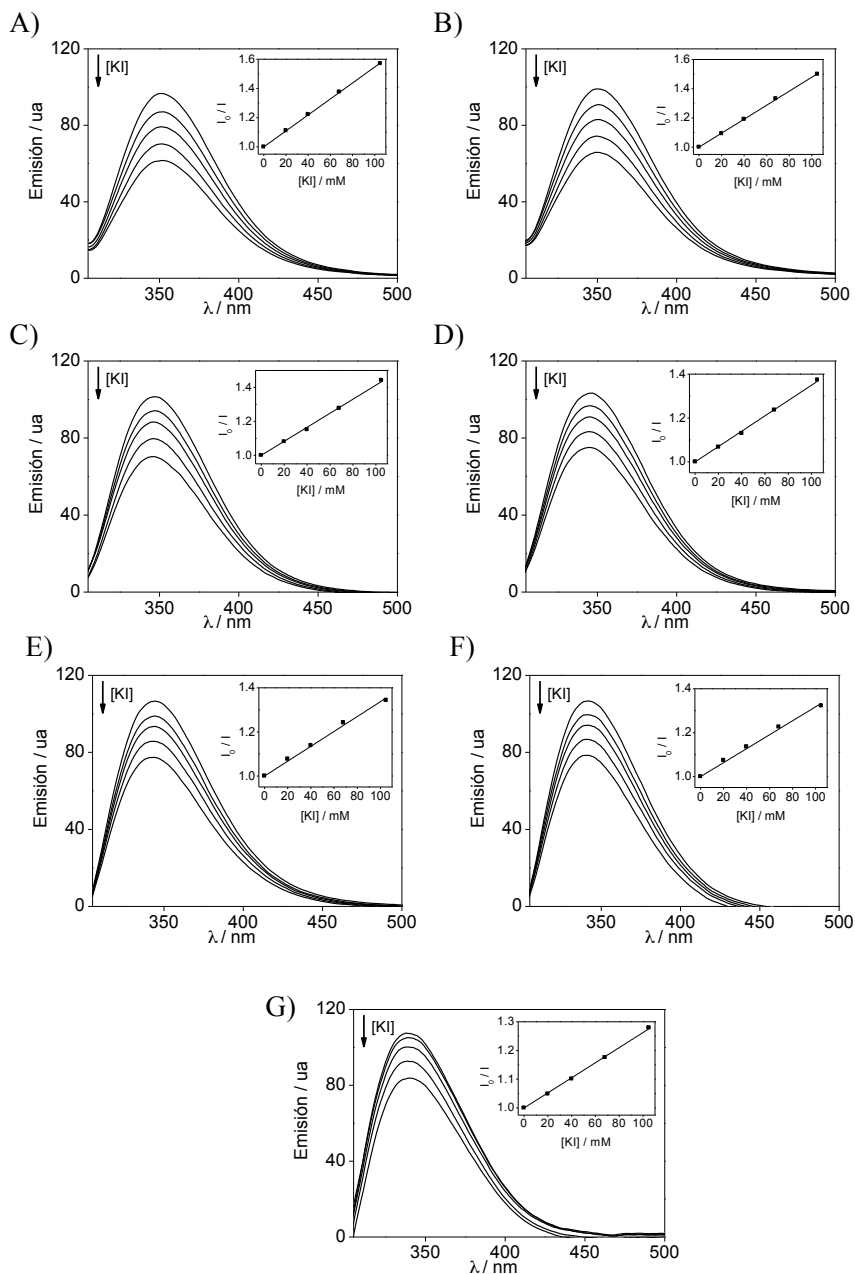


Figura 7.6. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de AcTrpMe tras la adición de concentraciones crecientes de KI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM y B) 15 mM; C) 50 mM; D) 75 mM; E) 100 mM; F) 200 mM y G) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

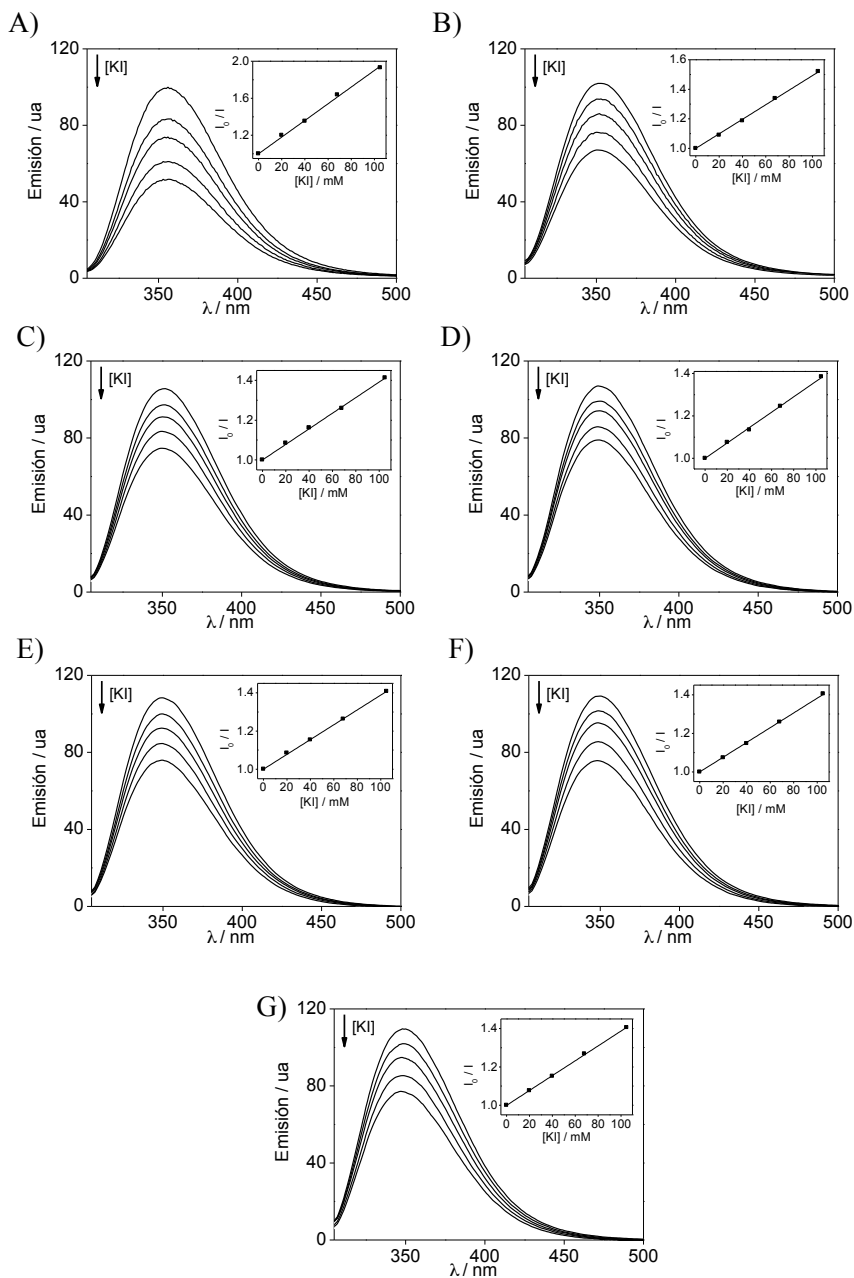


Figura 7.7. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de CA-Trp tras la adición de concentraciones crecientes de KI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM y B) 15 mM; C) 50 mM; D) 75 mM; E) 100 mM; F) 200 mM y G) 300 mM. Gráficas insertadas: correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

Table 7.1. Constantes de desactivación de la fluorescencia por yoduro.

$k_q^S / 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$			
[NaCA] / mM	Trp	AcTrpMe	CA-Trp
0	3.80 ± 0.05	4.50 ± 0.10	1.60 ± 0.04
15	3.30 ± 0.04	3.42 ± 0.05	0.84 ± 0.10
50	2.70 ± 0.10	2.50 ± 0.03	0.65 ± 0.02
75	2.50 ± 0.03	2.00 ± 0.03	0.62 ± 0.05
100	2.25 ± 0.10	1.87 ± 0.02	0.60 ± 0.02
200	1.90 ± 0.05	1.30 ± 0.10	0.63 ± 0.01
300	1.45 ± 0.10	1.10 ± 0.05	0.62 ± 0.02

^a Los experimentos fueron realizados por duplicado y los errores corresponden a las desviaciones promedio.

Las constantes de desactivación de la emisión por yoduro disminuyeron conforme aumentó la concentración de SB. En el caso de **Trp** y **AcTrpMe** se observó una disminución continua en el valor de la k_q^S ; sin embargo, para **CA-Trp** el comportamiento fue muy diferente, ya que la k_q^S disminuyó bruscamente y se mantuvo constante a partir de concentración de 50 mM de NaCA. Estas diferencias se pusieron de manifiesto más claramente cuando se representaron conjuntamente las constantes de desactivación (k_q^S) frente a la concentración de NaCA (**Figura 7.8**).

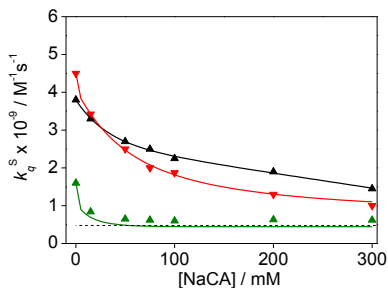


Figura 7.8. Variación de las constantes de desactivación por yoduro de la fluorescencia (k_q^S , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para **Trp** (▲), **AcTrpMe** (▼) y **CA-Trp** (▲) versus concentración de NaCA.

En la **Figura 7.8** se observa una desactivación del singlete del triptófano por yoduro muy efectiva en disolución para todos los casos ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), que fue disminuyendo gradualmente conforme se aumentó la concentración de NaCA (hasta 300 mM) para **Trp** y **AcTrpMe**, y de manera más brusca para **CA-Trp**. La forma de las curvas indica que **Trp** y **AcTrpMe** no llegan a incorporarse del todo dentro de los agregados incluso a 300 mM de NaCA, mientras que la afinidad de **CA-Trp** por los agregados es mucho mayor. Por tanto, la eficiencia del proceso disminuye conforme las diferentes sondas se van incorporando dentro de los agregados de NaCA.

En cuanto al mecanismo por el que tiene lugar la desactivación de la fluorescencia por yoduro, una posibilidad consiste en que se produzca transferencia electrónica (Te) desde el yoduro al cromóforo Trp. El cálculo de la variación de la energía libre (ΔG) mediante la ecuación de Rehm-Weller (ecuación 1.3, **Capítulo 1**) estima que el proceso es termodinámicamente favorable; sin embargo, no se puede descartar el efecto del átomo pesado, que acelera el cruce intersistemas, provocando un aumento de la emisión de la fosforescencia incluso a bajas concentraciones de yoduro.¹⁵⁶

7.2.2 Desactivación de la fluorescencia en derivados conteniendo el cromóforo dansilo

Para estudiar la desactivación de la fluorescencia del cromóforo dansilo por yoduro se eligió **3 β -Dns-CA** (Figura 7.9). El espectro de absorción de **3 β -Dns-CA** no varió con la adición de NaCA, mientras que el rendimiento cuántico de emisión y el tiempo de vida de fluorescencia aumentaron de forma considerable (ver Capítulo 4). En la Figura 7.10, se observa la desactivación de la emisión por adición de concentraciones crecientes de yoduro, tanto en disolución como en presencia de NaCA 300 mM, observándose que resultó ser más eficiente en disolución. Teniendo en cuenta que los τ_s fueron de 4,8 y 14,5 ns en disolución y a 300 mM NaCA, respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores de las constantes de desactivación $7,00 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1,50 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A pesar de observarse la misma tendencia que para la desactivación de **CA-Trp**, el cromóforo Dns resultó ser menos sensible.

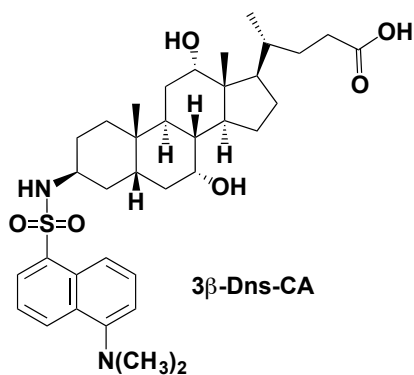


Figura 7.9. Estructura del derivado fotoactivo seleccionado: **3 β -Dns-CA**.

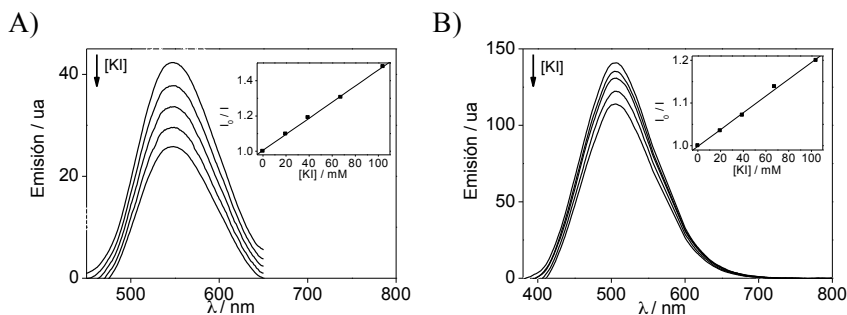


Figura 7.10. Variación en los espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$) de **3 β -Dns-CA**, tras la adición de concentraciones crecientes de KI a diferentes concentraciones de NaCA: A) 0 mM y B) 300 mM. Inserciones: Correspondientes ajustes de Stern-Volmer.

Se ha demostrado que existe desactivación de la fluorescencia de Trp o Dns por yoduro tanto en disolución como en agregados de NaCA y que ésta disminuye su eficiencia conforme los fluoróforos se incorporan en el interior de los agregados. Sin embargo, queda por resolver si las dos sondas se colocan en el mismo microambiente dentro de los agregados. Para asegurar su incorporación al mismo tipo de entorno y estudiar simultáneamente en ambos cromóforos la desactivación de la fluorescencia, se prepararon una serie de díadas que contuvieran ambos cromóforos.

Nuevamente, el cálculo de la variación de la energía libre (ΔG) mediante la ec. 1.3 está de acuerdo con un proceso de transferencia electrónica, sin poder descartar que tengan lugar simultáneamente otros mecanismos de desactivación.

7.2.3 Caracterización fotofísica de las nuevas sondas bidentadas dansilo-cólico-triptófano

En la **Figura 7.11** se muestran las estructuras de los nuevos derivados fotoactivos que serán empleados en estudios de desactivación de la fluorescencia en sistemas supramoleculares asegurando su incorporación al mismo microentorno.

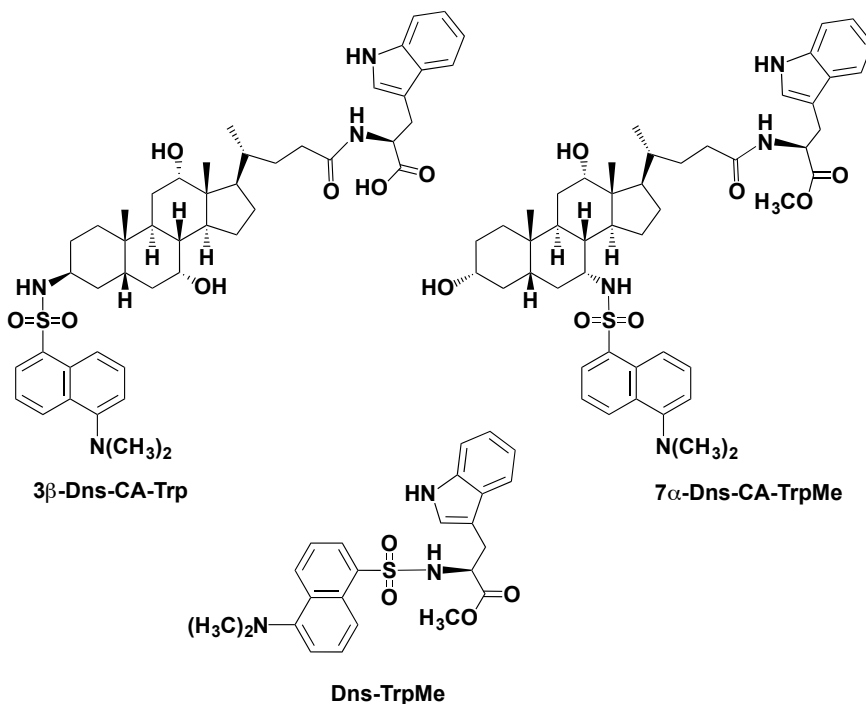


Figura 7.11. Estructuras de las díadas empleadas: **3β-Dns-CA-Trp**, **7α-Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**.

Para realizar los experimentos control se han utilizado los derivados que se muestran en la **Figura 7.12**.

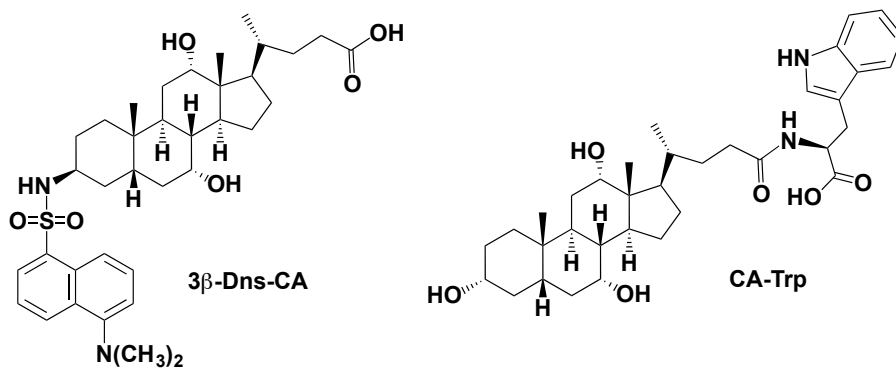


Figura 7.12. Estructuras de los derivados utilizados para los experimentos control: **3β-Dns-CA** y **CA-Trp**.

En primer lugar, se registraron los espectros UV-vis de las diferentes díadas bidentadas **3β-Dns-CA-Trp**, **7α-Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe** en disolución acuosa (NaCl 0,2 M) (**Figura 7.13**). Todos ellos exhibieron un máximo alrededor de 330 nm y un hombro a ~ 250 nm debido a la contribución del cromóforo Dns, y una banda con un máximo a 280 nm que se puede atribuir mayoritariamente a la absorción del cromóforo Trp y en menor medida a la del cromóforo dansilo.

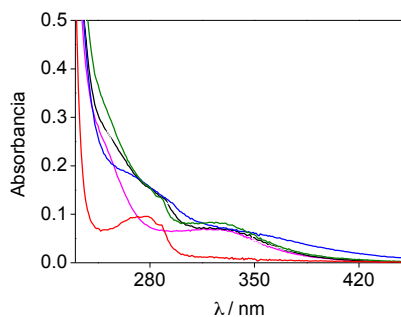


Figura 7.13. Espectros de absorción de **3β-Dns-CA-Trp** (negro), **7α-Dns-CA-TrpMe** (azul), **Dns-TrpMe** (celeste), **3β-Dns-CA** (verde) y **CA-Trp** (rojo) en disolución de NaCl acuoso 0,2 M.

A continuación, se registraron los espectros de fluorescencia excitando a 290 nm, donde absorbe mayoritariamente el **Trp** en las tres díadas (**Figura 7.14**). Todas mostraron un máximo entre 500-525 nm debido a la emisión del cromóforo dansilo; sin embargo, solamente la díada **3 β -Dns-CA-Trp** mostró además una banda de emisión centrada a 350 nm correspondiente al cromóforo triptófano. Este hecho indicó que para las díadas **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe** se producía un proceso de transferencia de energía total, mientras que para la díada **3 β -Dns-CA-Trp** la transferencia resultó ser parcial. En la **Figura 7.15** se muestran los espectros de fluorescencia de una mezcla intermolecular 1:1 de **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** junto a cada uno de ellos por separado. Tal como se puede observar, las bandas de emisión son totalmente coincidentes, indicando que intermolecularmente no ocurre el proceso de transferencia de energía.

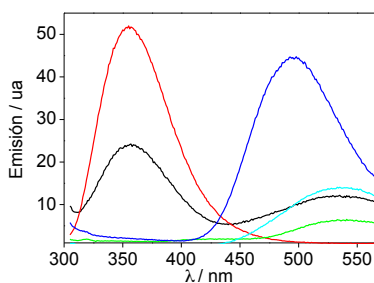


Figura 7.14. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de **3 β -Dns-CA-Trp** (negro), **7 α -Dns-CA-TrpMe** (azul), **Dns-TrpMe** (celeste), **3 β -Dns-CA** (verde) y **CA-Trp** (rojo) en disolución de NaCl acuoso 0,2 M.

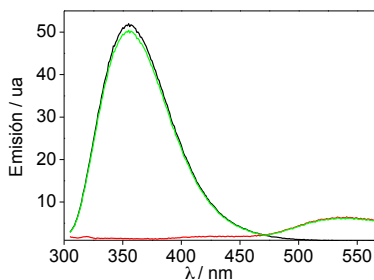


Figura 7.15. Espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de una mezcla intermolecular 1:1 de **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** (verde), **3 β -Dns-CA** (rojo) y **CA-Trp** (negro) en disolución de NaCl acuoso 0,2 M.

En la **Figura 7.16** se muestran los espectros de excitación y emisión para **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp**. A partir de ellos se obtuvieron los valores de las energías de singlete (E_S) para **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** (280 y 386 KJ), respectivamente, demostrándose que es posible la transferencia de energía desde el triptófano al dansilo.

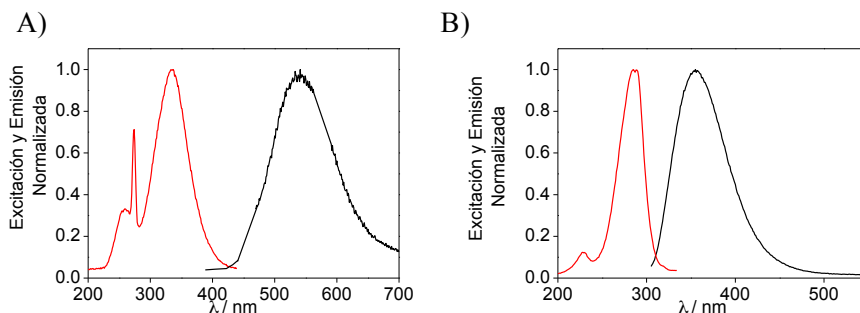


Figura 7.16. Espectros de excitación (rojo) y emisión (negro) de A) **3 β -Dns-CA** y B) **CA-Trp** en disolución de NaCl acuoso 0,2 M.

Con el fin de establecer si la transferencia de energía seguía un mecanismo de tipo Förster o de tipo Dexter, se registraron los espectros de emisión de la díada **7 α -Dns-CA-TrpMe** en disolventes de diferentes viscosidades (en el rango 0.33 – 3 cP y 1200 cP para el glicerol). El aumento de viscosidad reduce el movimiento de las moléculas y, por lo tanto, de los choques moleculares, por lo que si la transferencia de energía se produce a través de un mecanismo tipo Dexter, éste deber ser menos eficiente a medida que aumenta la viscosidad del medio, debiendo observarse de nuevo, al menos parcialmente, la banda a 350 nm debida a la emisión del Trp. Sin embargo, cuando se registraron los espectros en los diferentes disolventes, no se observó en ningún caso la recuperación de la banda de Trp (**Figura 7.17**), por lo que aunque no se puede descartar que la TE tenga lugar por un mecanismo de tipo Dexter, se puede concluir que el mecanismo de tipo de Förster contribuye de forma significativa.

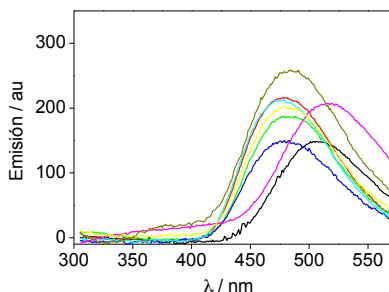


Figura 7.17. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$) de **7 α -Dns-CA-TrpMe** en hexano (0.33 cP) (rojo), tolueno (0.59 cP) (verde), acetonitrilo (0.37 cP) (negro), ciclohexano (1.00 cP) (celeste), dodecano (1.35 cP) (amarillo), tetradecano (2.18 cP) (ocre) hexadecano (3.34 cP) (azul) y glicerol (1200 cP) (rosa).

Por otro lado, según la teoría de Förster,¹⁵⁷ una molécula excitada a una longitud de onda determinada puede transferir su energía (no radiativa) a otra molécula que actúa de aceptor mediante interacciones dipolo-dipolo. El proceso depende de: i) la distancia entre el dador y el aceptor (r) (10 – 100 Å), ii) el solapamiento (J) entre la emisión del dador y la absorción del aceptor y iii) la orientación del dipolo de transición del dador y del aceptor. La eficiencia de este proceso (E), se puede calcular a partir de la ecuación 7.1:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{I}{I_0} \quad \text{Ec. 7.1}$$

en donde (r) es la distancia entre el dador y el aceptor, (R_0) es la distancia crítica a la cual se transfiere el 50% de la energía en condiciones de proporción dador : aceptor 1:1, y por último, I_0 e I son las intensidades de fluorescencia del dador en ausencia y presencia del aceptor (en proporciones 1:1), respectivamente.

La distancia crítica (R_0) se puede calcular mediante la expresión 7.2:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} \kappa^2 n^4 \phi_D J \quad \text{Ec. 7.2}$$

en donde κ^2 es el factor de orientación espacial, n es el índice de refracción del disolvente, ϕ_D es el rendimiento cuántico de fluorescencia del dador y J es la integral de solapamiento entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor que se calcula mediante la expresión 7.3:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad \text{Ec. 7.3}$$

Para calcular la distancia entre los cromóforos Trp y Dns en los derivados **3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe** se tomaron como valores de $\kappa^2 = 0,67^{158}$ para una distribución isotrópica de la orientación del dador y aceptor, $n = 1,333$ (índice refracción del agua) y $\phi_D = 0,14$ para el cromóforo Trp en disolución acuosa.¹⁵⁹

Mediante el empleo de las **Ec. 7.1**, **7.2** y **7.3** se obtuvieron los valores de la eficiencia (E) y la distancia (r), siendo estos valores: $E = 53\%$, 95% y 100% , para **3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**, respectivamente. El valor de la distancia (r) obtenido para **3 β -Dns-CA-Trp** fue de $\sim 32 \text{ \AA}$. Estos resultados explican las TE observadas y para todos los casos, las distancias calculadas se encuentran dentro del rango de la Teoría de Förster.¹⁵⁹

Una vez estudiado el proceso de TE en las díadas dansilo-cólico-triptófano en disolución, se examinó su comportamiento en presencia de colato sódico 300 mM. Así, se registraron los espectros de absorción y emisión de los diferentes **Dns-CA-Trps** (15 μ M) observándose que la adición de SBs no produjo cambios significativos en los espectros de absorción de ninguno de los tres derivados (**Figura 7.18A**). Los espectros de emisión demostraron nuevamente una transferencia de energía total para las díadas **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**, y parcial para la díada **3 β -Dns-CA-Trp** (**Figura 7.18B**), análogas a las observadas en disolución. Nuevamente, mediante el empleo de las **Ec. 7.1, 7.2 y 7.3** se obtuvieron los valores de la eficiencia y la distancia para **3 β -Dns-CA-Trp** obteniéndose **E = 62%**, con un valor de distancia **r \sim 30 Å**. La ligera diferencia con respecto a disolución puede deberse a que los agregados de NaCA proporcionan una estructura más rígida, que acerca ligeramente los dos cromóforos, aumentando la eficiencia de la TE.

El hecho de que la emisión de las dos bandas en la díada **3 β -Dns-CA-Trp** muestren una proporción diferente en disolución y en presencia de NaCA a 300 mM (**Figuras 7.14 y 7.18B**, respectivamente) se debe al aumento del rendimiento cuántico de emisión del cromóforo dansilo en los agregados, tal como se había observado en ocasiones anteriores (**Capítulo 4**).

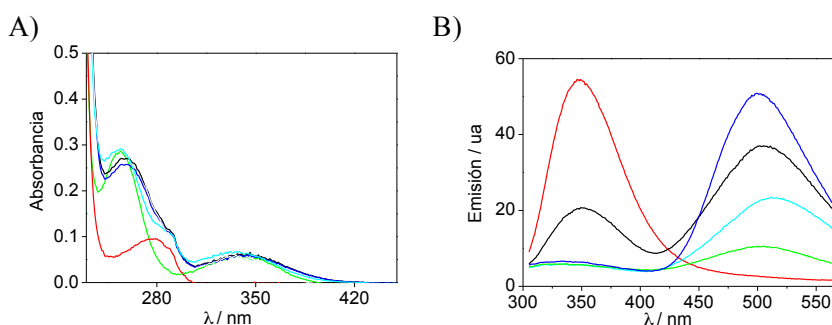


Figura 7.18. A) Espectros de absorción y B) Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de **3 β -Dns-CA-Trp** (negro), **7 α -Dns-CA-TrpMe** (azul), **Dns-TrpMe** (celeste), **3 β -Dns-CA** (verde) y **CA-Trp** (rojo) en 300 mM de NaCA.

De nuevo, con objeto de comprobar la necesidad de la unión covalente de los dos cromóforos para que se produzca la transferencia de energía en el interior de los agregados de NaCA, se registró la emisión de una mezcla 1:1 de **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** en presencia de NaCA a 300 mM (**Figura 7.19**). De nuevo no se observó transferencia de energía intermolecular, indicando que a las concentraciones de trabajo, los dos cromóforos se alojan en sitios diferentes de los agregados y no existe interacción entre ellos. Por tanto, para estudiar procesos de TE es necesario utilizar díadas en las que los dos cromóforos se encuentren unidos covalentemente.

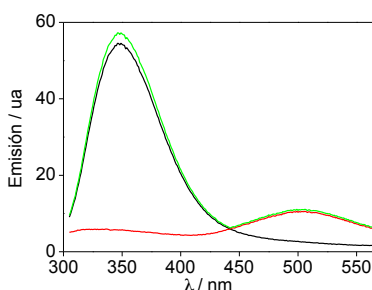


Figura 7.19. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm) de una mezcla intermolecular 1:1 de **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** (verde), **3 β -Dns-CA** (rojo) y **CA-Trp** (negro) en NaCA 300 mM.

Se han empleado tres nuevas díadas (**3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**), con objeto de asegurar que tanto Trp como Dns se alojaban en el mismo microambiente dentro de los agregados y estudiar la desactivación de la fluorescencia por yoduro en ambos cromóforos simultáneamente. Estas tres díadas han resultado ser modelos útiles para estudiar procesos de transferencia de energía entre Trp y Dns, siendo ésta total en dos casos (**7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**) y parcial en uno de ellos (**3 β -Dns-CA-Trp**), apuntando este hecho a un mecanismo de tipo Förster y resultando además independiente del hecho de estar en disolución o en presencia de NaCA 300 mM. Por ello, solo **3 β -Dns-CA-Trp** será empleada para estudiar la desactivación por yoduro a los dos cromóforos simultáneamente.

7.2.4 Desactivación de la fluorescencia mediante anión yoduro de una sonda bidentada en diferentes sistemas supramoleculares.

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, se eligió la díada **3 β -Dns-CA-Trp**, en la que se producía una transferencia de energía parcial, para estudiar la desactivación de fluorescencia simultánea en dos cromóforos localizados en el mismo microambiente. Para investigar además la influencia de la hidrofobicidad del entorno supramolecular, se utilizaron agregados de diferentes sales biliares (colato sódico (NaCA), taurocolato sódico (NaTCA) y desoxicolato sódico (NaDCA), así como micelas mixtas (MM)).

En primer lugar, se registraron los espectros de emisión de **3 β -Dns-CA-Trp** en los agregados de las diferentes SBs y en las MM con objeto de comprobar la eficiencia de la TE en estos sistemas. En la **Figura 7.20** se observa TE parcial en todos los microambientes (NaCA, NaTCA, NaDCA y MM), con una eficiencia (E) del 70% para NaTCA, y alrededor del ~ 62% para NaCA, NaDCA y MM, por lo que todos los sistemas serán adecuados para estudiar la desactivación de la fluorescencia simultáneamente en ambos cromóforos.

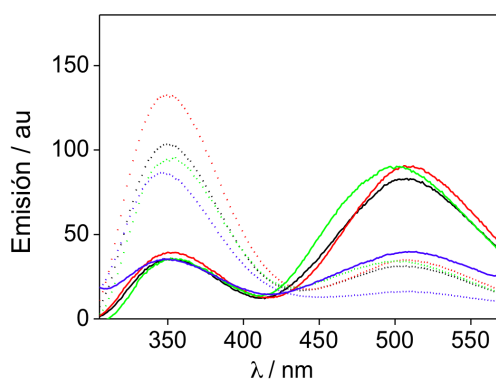


Figura 7.20. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de **3 β -Dns-CA-Trp** (línea continua) y mezcla intermolecular 1:1 (**3 β -Dns-CA** y **CA-Trp**) (línea discontinua) en diferentes microambientes: NaCA 300 mM (negro), NaTCA 300 mM (rojo), NaDCA 75 mM (verde) y MM (azul).

A continuación, se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia (τ_s) de cada uno de los cromóforos de la díada **3 β -Dns-CA-Trp** en los agregados de las diferentes SBs y MM (**Tabla 7.2**). En todos los casos se observó que los τ_s aumentaban cuando los derivados se incorporaban en los sistemas supramoleculares.

Tabla 7.2. Tiempos de vida de fluorescencia para 3 β -Dns-CA-Trp y su correspondiente mezcla 1:1 (3 β -Dns-CA + CA-Trp).

τ_s (ns)				
Sistema supramolecular	3 β -Dns-CA-Trp		Mezcla 1:1 (3 β -Dns-CA + CA-Trp)	
	λ_{obs} 350 nm	λ_{obs} 550 nm	λ_{obs} 350 nm	λ_{obs} 550 nm
Disolución NaCl 0,2 M	6.15	5.10	5.70	4.90
NaTCA (300 mM)	12.00	16.10	8.00	15.75
NaCA (300 mM)	8.50	14.00	8.00	14.25
NaDCA (75 mM)	11.50	13.50	11.20	13.25
MM	11.40	10.50	6.80	10.20

A continuación, se registraron los espectros de fluorescencia de **3 β -Dns-CA-Trp** en disolución tras adiciones crecientes de yoduro, observándose una disminución de la emisión tanto en la banda de emisión del Trp como en la del Dns (**Figura 7.21A**). Para comparar, se realizó el mismo experimento con una mezcla 1:1 de **3 β -Dns-CA** y **CA-Trp** (**Figura 7.21B**).

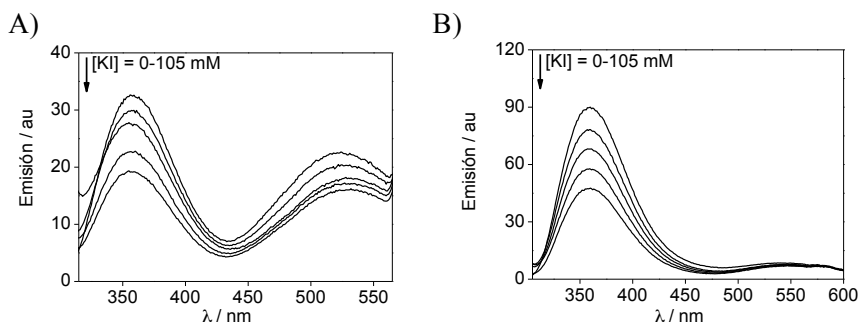


Figura 7.21. Variación en los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 290$ nm) de A) **3 β -Dns-CA-Trp** y B) mezcla intermolecular 1:1 (**3 β -Dns-CA** y **CA-Trp**) tras la adición de concentraciones crecientes de KI en NaCl 0,2 M.

Los ajustes de Stern-Volmer (**Figura 7.22**) revelaron una desactivación más eficiente para el Trp ($2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que para el cromóforo Dns ($7,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), y no se apreció una clara diferencia entre la desactivación de cada fluoróforo en la díada y la correspondiente mezcla intermolecular ($2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $8,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Trp y Dns, respectivamente).

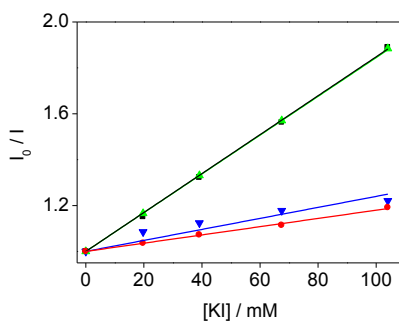


Figura 7.22. Variación relativa de la desactivación de la fluorescencia por yoduro para **3β-Dns-CA-Trp** ($\lambda_{\text{obs}} = 350$ nm) (▲), **3β-Dns-CA-Trp** ($\lambda_{\text{obs}} = 500$ nm) (●), **mezcla 1:1** ($\lambda_{\text{obs}} = 350$ nm) (▲) y **mezcla 1:1** ($\lambda_{\text{obs}} = 500$ nm) (▼) versus concentración de KI en NaCl 0,2 M.

A continuación, se realizaron experimentos análogos de desactivación de **3β-Dns-CA-Trp**, así como de la mezcla intermolecular 1:1 (**3β-Dns-CA** y **Trp-CA**) en NaCA, NaTCA, NaDCA y MM (**Figura 7.23**). Los correspondientes ajustes de Stern-Volmer se muestran en la **Figura 7.24**. Empleando los valores de τ_S de la **Tabla 7.2** y las correspondientes K_{sv} obtenidas de las pendientes de los ajustes de regresión lineal de la **Figura 7.24** se obtuvieron las constantes de desactivación k_q^S ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) que se muestran en la **Tabla 7.3**. Tal como se observa en esta Tabla, las constantes de desactivación disminuyeron significativamente conforme aumentó la lipofilia del sistema supramolecular y no se observaron cambios significativos entre los resultados obtenidos en la diada y la mezcla intermolecular.

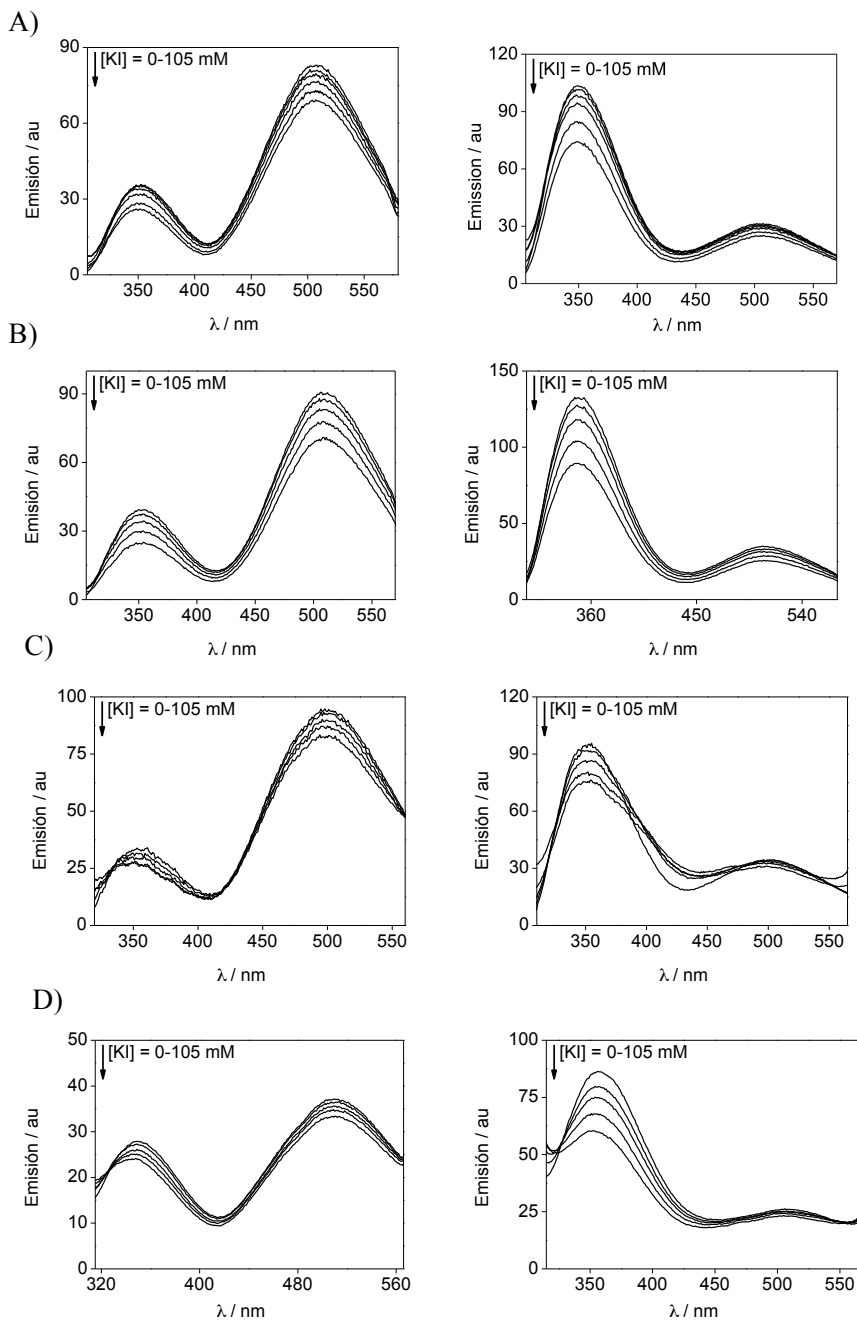


Figura 7.23. Variación en los espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm) de 3β -Dns-CA-Trp (columna izquierda) y mezcla intermolecular 1:1 (3β -Dns-CA y CA-Trp) (columna derecha) tras la adición de concentraciones crecientes de KI en: A) NaCA 300 mM, B) NaTCA 300 mM; C) NaDCA 75 mM y D) MM.

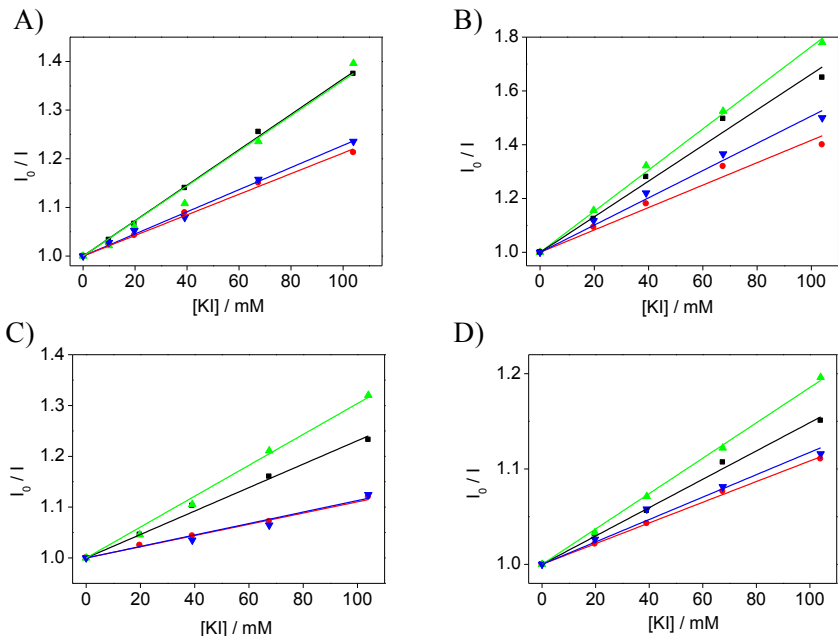


Figura 7.24. Variación relativa de la desactivación de la fluorescencia por yoduro para 3β -Dns-CA-Trp ($\lambda_{obs} = 350$ nm) (■), 3β -Dns-CA-Trp ($\lambda_{obs} = 500$ nm) (●), mezcla 1:1 ($\lambda_{obs} = 350$ nm) (▲) y mezcla 1:1 ($\lambda_{obs} = 500$ nm) (▼) versus concentración de KI en: A) NaCA 300 mM, B) NaTCA 300 mM; C) NaDCA 75 mM y D) MM.

Tabla 7.3. Constantes de desactivación $k_q^S / 10^8 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$ de la fluorescencia por yoduro para $3\beta\text{-Dns-CA-Trp}$ y la mezcla 1:1 ($3\beta\text{-Dns-CA} + \text{CA-Trp}$).

$k_q^S / 10^8 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}^a$				
Sistema supramolecular	$3\beta\text{-Dns-CA-Trp}$		Mezcla 1:1 ($3\beta\text{-Dns-CA} + \text{CA-Trp}$)	
	$\lambda_{\text{obs}} 350 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{obs}} 550 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{obs}} 350 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{obs}} 550 \text{ nm}$
Disolución NaCl 0,2 M	20.50 ± 0.07	7.40 ± 0.03	25.00 ± 0.05	8.00 ± 0.05
NaTCA (300 mM)	6.50 ± 0.02	3.10 ± 0.07	9.50 ± 0.03	3.38 ± 0.04
NaCA (300 nM)	3.06 ± 0.05	1.45 ± 0.03	3.50 ± 0.05	1.60 ± 0.04
NaDCA (75 mM)	2.50 ± 0.03	0.80 ± 0.01	4.50 ± 0.05	0.84 ± 0.02
MM	2.00 ± 0.05	0.90 ± 0.03	3.15 ± 0.04	1.10 ± 0.05

La desactivación de la fluorescencia de los cromóforos Trp o Dns fue muy similar, tanto en la díada $3\beta\text{-Dns-CA-Trp}$, como en la mezcla intermolecular 1:1 ($3\beta\text{-Dns-CA}$ y Trp-CA) y fue menos eficiente conforme se aumentó la lipofilia del microambiente. Así, mientras que en disolución se obtuvieron constantes de desactivación de $\sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $\sim 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para los cromóforos Trp y Dns, respectivamente, tanto en la díada como en la mezcla intermolecular 1:1, éstas fueron disminuyendo progresivamente en las diferentes SBs y MM hasta alcanzar valores que resultaron en un orden de magnitud menor ($2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $\sim 9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) en los microambientes más lipófilos (NaDCh y MM) comparados con los obtenidos en disolución.

7.3 Conclusiones

En el presente capítulo, se ha demostrado que la derivatización del ácido cólico mediante la unión covalente de los fluoróforos dansilo (Dns) en posiciones C-3 o C-7 y triptófano (Trp) en la cadena lateral, proporciona modelos en los que se han podido estudiar simultáneamente procesos de desactivación de fluorescencia inter e intramolecular en disolución y en diferentes entornos supramoleculares.

La desactivación del singlete en diferentes derivados de triptófano (**Trp**, **AcTrpMe** y **CA-Trp**) y en **3 β -Dns-CA** por yoduro fue muy efectiva en disolución para todos los casos ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para los derivados de Trp y $\sim 7,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para **3 β -Dns-CA**) y disminuyó gradualmente conforme los fluoróforos se incorporaron en el interior de los agregados de NaCA. Para asegurar la incorporación de las dos sondas al mismo tipo de entorno y estudiar simultáneamente en ambos cromóforos la desactivación de la fluorescencia, se prepararon las díadas **3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe**.

Los espectros de emisión de éstas revelaron que para las díadas **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe** se producía un proceso de transferencia de energía total desde el Trp al Dns, mientras que para la díada **3 β -Dns-CA-Trp** la transferencia resultó ser parcial. Por ello, se eligió **3 β -Dns-CA-Trp** para estudiar desactivación del singlete simultáneamente en los dos cromóforos. Se observó tanto para Trp como para Dns en todos los sistemas supramoleculares. La constante de desactivación K_q^s ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) decreció con la misma tendencia para ambos hasta un orden de magnitud ($2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Trp o Dns, respectivamente) conforme se aumentó la lipofilia del entorno en comparación con las obtenidas en disolución ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $7,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para Trp o Dns, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en los valores de las constantes de desactivación obtenidas entre **3 β -Dns-CA-Trp** y la correspondiente mezcla intermolecular 1:1 (**3 β -Dns-CA** y **Trp-CA**), indicando que ambos cromóforos cuando están unidos al esqueleto del ácido cólico se colocan en el mismo tipo de entorno en las diferentes SBs y MM.

7.4 Método Experimental

Colato sódico (NaCA), Taurocolato sódico (NaTCA), Deoxicolato sódico (NaDCA), Lecitina (L), Colesterol (Ch) y NaCl se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron tal y como se suministraron. Los compuestos **3 β -Dns-CA**, **CA-Trp**, **3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe** y **Dns-TrpMe** fueron sintetizados como se describe en el **Capítulo 3** de la presente Tesis Doctoral. Se prepararon disoluciones stock 5 mM en DMSO de todos los derivados para su utilización posterior en las medidas fotofísicas.

En las medidas de fluorescencia se corrigieron los espectros con experimentos de control para eliminar la emisión Raman del disolvente. En todas las disoluciones, la concentración de los fluoróforos fue de 15 μ M, lo que aseguró que su absorbancia fuera inferior a 0,1 a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 290$ nm para los experimentos en estado estacionario). En los experimentos de desactivación de fluorescencia, se añadieron los volúmenes apropiados de una disolución recién preparada de KI (2 M) a las disoluciones de los derivados fotoactivos con la correspondiente concentración de SB o MM.

La energía de singlete se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$E_S = N_A \frac{hc}{\lambda_{cr}} \quad [\text{J mol}^{-1}]$$

donde λ_{cr} es la longitud de onda del cruce de los espectros normalizados de emisión y excitación expresada en metros.

Capítulo 8

Instrumentación

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las micrografías TEM fueron recogidas con un microscopio Phillips CM-10 operando a 100 kV. Se depositó una gota de la preparación en una rejilla de cobre recubierta de carbono y después de un minuto, el exceso se eliminó con papel de filtro. Luego se trató con una tinción negativa depositando una gota de una disolución al 1% de molibdato amónico, y se utilizó de nuevo papel de filtro para eliminar el exceso. La película resultante se secó en un lugar libre de polvo.

Dispersión de luz dinámica (DLS)

Las medidas de tamaño de MM se realizaron utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las disoluciones de MM se diluyeron con agua desionizada y las medidas DLS se registraron a 25 °C con un ángulo de dispersión de 173°. El diámetro hidrodinámico medio fue determinado por análisis acumulativo.

Medidas Fotofísicas

Los espectros de absorción ultravioleta-visible se registraron en un espectrofotómetro Cary 300 UV-Vis (UV0811M209, Varian). Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se registraron en un Photon Technology Internacional (PTI) modelo LPS-220B equipado con lámpara de Xenón de 75 W y un monocromador en el rango de 200-700 nm. Las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron en un espectrómetro PTI modelo TM-2/2003 equipado con lámpara H₂/N₂ (50/50, duración del pulso de 1,8 ns) y un detector estroboscópico.

Los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se registraron en un láser pulsado de Nd-YAG (L52137 V LOTIS TII) a la longitud de onda de excitación de 266 nm. La duración de pulso fue de 10 ns, con energía de 20 mJ/pulso. El sistema de FDL consiste en un láser pulsado, lámpara de Xe, un monocromador Oriel 77200 y un osciloscopio Tektronik DP04054. Las señales del osciloscopio se transfirieron a un ordenador personal.

Capítulo 9

Referencias bibliográficas

- (1) Hofmann, A. F. *Archives of Internal Medicine* **1999**, *159*, 2647.
- (2) Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 2461.
- (3) Nair, P. P. K., D. *The Bile Acid's Chemistry, Physiology and Metabolism* Plenum Press: NY, **1971**; Vol. 1.
- (4) Hofmann, A. F. *News Physiol. Sci.* **1999**, *14*, 24.
- (5) Bohne, C. *Langmuir* **2006**, *22*, 9100.
- (6) Zarras, P.; Vogl, O. *Progress in Polymer Science* **1999**, *24*, 485.
- (7) Eggertsen, G. O., M.; Andersson, U.; Ishida, H.; Kubota, S.; Hellman, U.; Okuda, K. I.; Bjorkhem, I. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 32269.
- (8) Cali, J. J. R., D. W. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7774.
- (9) Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids and Surfaces* **1988**, *30*, 145.
- (10) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Current Science* **2004**, *87*, 1666.
- (11) Kullak-Ublick, G. A. P., G.; Berr, F. *Hepatology* **1995**, *21*, 41.
- (12) Solaas, K. U., A.; Soreide, O.; Kase, B. F. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1154.
- (13) Beuers, U.; Boyer, J. L.; Paumgartner, G. *Hepatology* **1998**, *28*, 1449.
- (14) Kowdley, K. *American Journal of Medicine* **2000**, *108*, 690.
- (15) Kumar, D. T., R. K. J. *Gastroenterology Hepatology* **2001**, *16*, 3.
- (16) Carey, M. C. S., D. M. *Am. J. Med.* **1970**, *49*, 590.
- (17) Carey, M. C. S., D. M. *Arch. Intern. Med.* **1972**, *130*, 506.
- (18) *Structure-Performance Relationships in Surfactants*; 1 ed.; Esumi, K. U., M., Ed.; Marcel and Dekker: New York, **1997**.
- (19) Wiedmann, T. S.; Kamel, L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *91*, 1743.
- (20) *The Liver: Biology and Pathobiology*; 3 ed.; Arias, I. M. B., J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A.; Shafritz, D. A., Ed.; NY: Raven Press: New York, **1994**.
- (21) *Handbook of Physiology, Section on the Gastrointestinal System*; Schultz, S. G., Ed.; Md: American Physiological Society: Bethesda, **1989**.
- (22) Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *Journal of Physical Chemistry* **1987**, *91*, 356.

- (23) Kast, C. S., B.; Winterhalter, K. H.; Meier, P. J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5179.
- (24) Stieger, B. F., K.; Madon, J.; Kullak-Ublick, G. A.; Meier, P. J. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 422.
- (25) Gerloff, T. S., B.; Hagenbuch, B.; Madon, J.; Landmann, L.; Roth, J.; Hofmann, A. F.; Meier, P. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10046.
- (26) Kramer, W. S., K.; Baringhaus, K.-H.; Kurz, M.; Stengelin, S.; Lange, G.; Corsiero, D.; Girbig, F.; König, W., Weyland, C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7291.
- (27) Kramer, W. B., H. P. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *102*, 1.
- (28) Porter, C. J. H.; Trevaskis, N. L.; Charman, W. N. *Nature Reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, 231.
- (29) Wang, Q. D.; Cui, D. F.; Lin, Q. H. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1997**, *1324*, 69.
- (30) Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5633.
- (31) Nagadome, S.; Numata, O.; Sugihara, G.; Sasaki, Y.; Igimi, H. *Colloid and Polymer Science* **1995**, *273*, 675.
- (32) Donovan, J. M.; Timofeyeva, N.; Carey, M. C. *Journal of Lipid Research* **1991**, *32*, 1501.
- (33) Cabral, D. J. S., D. M. *Physical chemistry of bile. Handbook of physiology: The gastrointestinal System III, section 6.; American Physiological Society, Waverly Press: Baltimore* **1989**.
- (34) Carey, M. C. *Lipid solubilization in bile; Klumer Academic: Dordrecht, The Netherlands* **1988**.
- (35) McKenna, J. M. T., D. W. J. *Chemical Communications* **1977**, *22*, 809.
- (36) Menger, F. M.; McCreery, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96*, 121.
- (37) SotoTellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Mejjide, F.; VazquezTato, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 13679.
- (38) Davis, A. P. *Molecules* **2007**, *12*, 2106.
- (39) Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1969**, *176*, 178.

- (40) Hildebrand, A.; Garidel, P.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 320.
- (41) Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3064.
- (42) *Sterols and Bile Acids*; Danielsson, H. S., J., Ed.; Elsevier, **1985**.
- (43) Ekwall, P.; Lindstrom, E. V.; Setala, K. *Acta Chemica Scandinavica* **1951**, *5*, 990.
- (44) Kratochvil, J. P. *Advances in colloid and interface science* **1986**, *26*, 131.
- (45) Coello, A.; Meijide, F.; Nunez, E. R.; Tato, J. V. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, *85*, 9.
- (46) Hofmann, A. F. R., A. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 1477.
- (47) Maitra, U.; Kumar, P. V.; Chandra, N.; D'Souza, L. J.; Prasanna, M. D.; Raju, A. R. *Chemical Communications* **1999**, 595.
- (48) Jover, A.; Meijide, F.; Nunez, E. R.; Tato, J. V. *Langmuir* **2002**, *18*, 987.
- (49) Paul, R.; Mathew, M. K.; Narayanan, R.; Balaram, P. *Chemistry and Physics of Lipids* **1979**, *25*, 345.
- (50) Small, D. M. *Adv. Chem. Ser* **1968**, *84*, 31.
- (51) Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 1140.
- (52) Kawamura, H.; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P. *Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 3321.
- (53) Jover, A. M., F.; Rodríguez Nuñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem* **1999**, *3*, 323.
- (54) Vethamuthu, M. S. A., M.; Mukhatar, E.; Bahadur, P. *Langmuir* **1992**, *8*, 2396.
- (55) Campanelli, A. R.; Desanctis, S. C.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Quagliata, C. *Journal of Inclusion Phenomena* **1989**, *7*, 391.
- (56) Ulmius, J.; Lindblom, G.; Wennerstrom, H.; Johansson, L. B. A.; Fontell, K.; Soderman, O.; Arvidson, G. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1553.
- (57) Alonso, A.; Saez, R.; Villena, A.; Goni, F. M. *Journal of Membrane Biology* **1982**, *67*, 55.
- (58) Nichols, J. W. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4596.

- (59) Almgren, M.; Edwards, K.; Karlsson, G. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *174*, 3.
- (60) Sievanen, E. *Molecules* **2007**, *12*, 1859.
- (61) le, M. M.; Champeil, P.; Moller, J. V. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1508*, 86.
- (62) Lichtenberg, D.; Robson, R. J.; Dennis, E. A. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1983**, *737*, 285.
- (63) Cohen, D. E.; Angelico, M.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 55.
- (64) Wiedmann, T. S.; Kamel, L. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1743.
- (65) delaMaza, A.; Manich, A. M.; Parra, J. L. *Journal of Microscopy-Oxford* **1997**, *186*, 75.
- (66) Cohen, D. E.; Thurston, G. M.; Chamberlin, R. A.; Benedek, G. B.; Carey, M. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14798.
- (67) Sun, C. Q.; Sano, Y.; Kashiwagi, H.; Ueno, M. *Colloid and Polymer Science* **2002**, *280*, 900.
- (68) Hildebrand, A.; Neubert, R.; Garidel, P.; Blume, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 2836.
- (69) Schwarz, M. A.; Raith, K.; Ruttinger, H. H.; Dongowski, G.; Neubert, R. H. H. *Journal of Chromatography A* **1997**, *781*, 377.
- (70) Yuet, P. K.; Blankschein, D.; Donovan, J. M. *Hepatology* **1996**, *23*, 896.
- (71) Walter, A.; Vinson, P. K.; Kaplun, A.; Talmon, Y. *Biophysical Journal* **1991**, *60*, 1315.
- (72) delaMaza, A.; Manich, A. M.; Parra, J. L. *J. Microsc-Oxford* **1997**, *186*, 75.
- (73) Wang, D. Q. H.; Cohen, D. E.; Carey, M. C. *J. Lip. Res.* **2009**, S406.
- (74) Roda, A.; Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 6362.
- (75) Carrigan, P. J.; Bates, T. R. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1973**, *62*, 1476.
- (76) Armstrong, N. A.; James, K. C. *International Journal of Pharmaceutics* **1980**, *6*, 185.

-
- (77) Armstrong, N. A.; James, K. C. *International Journal of Pharmaceutics* **1980**, *6*, 195.
- (78) Palin, K. J.; Wilson, C. G.; Davis, S. S.; Phillips, A. J. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1982**, *34*, 707.
- (79) Humberstone, A. J.; Charman, W. N. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *25*, 103.
- (80) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 361.
- (81) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *7*, 49.
- (82) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *169*, 55.
- (83) Alkanonyuksel, H.; Ramakrishnan, S.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M. *Pharmaceutical Research* **1994**, *11*, 206.
- (84) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Pharmazie* **1998**, *53*, 790.
- (85) Jablonski, A. Z. *Phys.* **1935**, *94*, 38.
- (86) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3 ed.; Springer, **2006**.
- (87) Wieland, H. *Angewandte Chemie* **1929**, *4*, 421.
- (88) Nichols, J. W.; Ozarowski, J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4600.
- (89) Mueller, K. *Biochemistry* **1981**, *20*, 404.
- (90) Grosvenor, M. P.; Lofroth, J. E. *Pharmaceutical Research* **1995**, *12*, 682.
- (91) de Castro, B.; Gameiro, P.; Guimaraes, C.; Lima, J.; Reis, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2001**, *24*, 595.
- (92) Reis, S.; Moutinho, C. G.; Pereira, E.; de Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45*, 62.
- (93) Posa, M.; Csanadi, J.; Kover, K. E.; Guzsvany, V.; Batta, G. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2012**, *94*, 317.
- (94) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, *7*, 860.
- (95) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *7*, 4973.
-

- (96) Marion, T. L. L., E. M.; Brouwer, K. L. R. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 911.
- (97) Kemp, D. C. Z.-G., M. J., Brouwer, K. L. R. *Toxicol. Sci.* **2005**, *83*, 207.
- (98) Mita, S. S., H.; Akita, H.; Hayashi, H.; Onuki, R.; Hofmann, A. F.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1575.
- (99) Kostrubsky, V. E. S., S. C.; Hanson, J.; Urda, E., Rose, K.; Burliegh, J.; Zocharski, P.; Cai, H.; Sinclair, J. F., Sahi, J. *Toxicol. Sci.* **2003**, *76*, 220.
- (100) Lengyel, G. V., Z.; Tugyi, R.; Vereczkey, L.; Molnár, T.; Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Jemnitz, K. *Hepatology Res.* **2008**, *38*, 300.
- (101) Noe, J. K.-U., G. A.; Jochum, W.; Stieger, B.; Kerb, R.; Haberl, M.; Müllhaupt, B.; Meier, P. J.; Pauli-Magnus, C. *J. Hepatology* **2005**, *43*, 536.
- (102) Horikawa, M. K., Y.; Tyson, C. A.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Pharmacokin.* **2003**, *18*, 16.
- (103) Brown, D. A.; London, E. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1998**, *14*, 111.
- (104) Bartzatt, R. *Journal of biochemical and biophysical methods* **2001**, *47*, 189.
- (105) Singh, O. G.; Ismail, K. *Journal of Surfactants and Detergents* **2008**, *11*, 89.
- (106) Zollner, G. F., P.; Silbert, D. ; Fuchsbichler, A.; Marschall, H.-U.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. *J. Hepatology* **2003**, *38*, 717.
- (107) Zollner, G. F., P.; Fuchsbichler, A.; Silbert, D.; Wagner, M.; Arbeiter, S.; Gonzalez, F. J.; Marschall, H.-U.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. *J. Hepatology* **2003**, *39*, 480.
- (108) Beuers, U. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatology* **2006**, *3*, 318.
- (109) Armstrong, M. J.; Carey, M. C. *Journal of Lipid Research* **1982**, *23*, 70.
- (110) Hofmann, A. F. *American Journal of Surgery* **1989**, *158*, 198.
- (111) Crosignani, A.; Battezzati, P. M.; Setchell, K. D. R.; Invernizzi, P.; Covini, G.; Zuin, M.; Podda, M. *Digestive Diseases and Sciences* **1996**, *41*, 809.
- (112) Ju, C.; Bohne, C. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 60.
- (113) Li, R.; Carpentier, E.; Newell, E. D.; Olague, L. M.; Heafey, E.; Yihwa, C.; Bohne, C. *Langmuir* **2009**, *25*, 13800.
- (114) Gouin, S.; Zhu, X. X. *Langmuir* **1998**, *14*, 4025.

- (115) Navas Díaz, A.; García Sánchez, F.; García Pareja, A. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1998**, *142*, 27.
- (116) Ninomiya, R.; Matsuoka, K.; Moroi, Y. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2003**, *1634*, 116.
- (117) Zana, R.; Guveli, D. *The Journal of Physical Chemistry* **1985**, *89*, 1687.
- (118) Matsuoka, K.; Maeda, M.; Moroi, Y. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *32*, 87.
- (119) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 2039.
- (120) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; Diaz, L.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Chemmedchem* **2009**, *4*, 466.
- (121) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 4710.
- (122) Holzinger, F. S., C. D.; Ton Nu, H. T.; Cerre, C.; Steinbach, J. H.; Yeh, H.-Z.; Hofmann, A. F. *Hepatology* **1998**, *28*, 510.
- (123) Yokota, A.; Fukiya, S.; Islam, K. B. M. S.; Ooka, T.; Ogura, Y.; Hayashi, T.; Hagio, M.; Ishizuka, S. *Gut Microbes* **2012**, *3*, 455.
- (124) Ju, C.; Bohne, C. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 3847.
- (125) Jones II, G. J., W. R.; Choi, Ch. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 294.
- (126) Lichtenberg, D.; Ragimova, S.; Bor, A.; Almog, S.; Vinkler, C.; Kalina, M.; Peled, Y.; Halpern, Z. *Biophysical Journal* **1988**, *54*, 1013.
- (127) Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 782.
- (128) Stark, R. E.; Roberts, M. F. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1984**, *770*, 115.
- (129) Perez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 4460.
- (130) Ariola, F. S.; Mudaliar, D. J.; Walvicka, R. P.; Heikal, A. A. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 4517.
- (131) Barnadas-Rodriguez, R.; Estelrich, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 1972.

- (132) Mandal, S.; Rao, V. G.; Ghatak, C.; Pramanik, R.; Sarkar, S.; Sarkar, N. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 12108.
- (133) Moyano, F.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J.; Correa, N. M. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 11838.
- (134) Pandey, S.; Baker, G. A.; Kane, M. A.; Bonzagni, N. J.; Bright, F. V. *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 3547.
- (135) Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16224.
- (136) Wacker, M.; Schubert, R. *International Journal of Pharmaceutics* **1998**, *162*, 171.
- (137) Cuquerella, M. C.; Rohacova, J.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 4965.
- (138) Costanzo, L. L.; Deguidi, G.; Condorelli, G.; Cambria, A.; Fama, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **1989**, *3*, 223.
- (139) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *104*, 119.
- (140) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 1158.
- (141) Partyka, M.; Au, B. H.; Evans, C. H. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *140*, 67.
- (142) Vaya, I.; Perez-Ruiz, R.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *486*, 147.
- (143) Murov, S. L. C., I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (144) Bosca, F. M., M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 637.
- (145) Pace, T. C. S.; Bohne, C. *Advances in Physical Organic Chemistry* **2008**, *42*, 167.
- (146) Peters, T. *All about Albumin: biochemistry, genetics, and medical application*; Academic Press, **1996**.
- (147) Dockal, M. C., D. C.; Rüker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.
- (148) He, K. M. C., D. C. *Nature* **1992**, *358*, 29.

- (149) Sudlow, G. B., D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.
- (150) Kramer, W. G., F.; Glombik H.; Corsiero, D.; Stengelin, S.; Weyland, C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36020.
- (151) Rudman, D. K., F. E. *J. Clin. Invest.* **1957**, *36*, 538.
- (152) Ceryak, S. B., B.; Fromm, H. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1661.
- (153) Gomez-Mendoza, M.; Luisa Marin, M.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 14776.
- (154) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Andreu, I.; Luisa Marin, M.; Miranda, M. A. *Organic Letters* **2013**, *15*, 298.
- (155) Gomez-Mendoza, M.; Nuin, E.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 10213.
- (156) Lammers, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Consuelo Jimenez, M.; Ariese, F.; Miranda, M. A.; Gooijer, C. *Chirality* **2012**, *24*, 840.
- (157) Förster, T. *Modern Quantum Chemistry*; Academic Press: New York, **1996**; Vol. 3.
- (158) Förster, T. *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7.
- (159) Eaton, D. F. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107.

Conclusiones Generales

Conclusiones

De la presente tesis doctoral, que versa sobre la utilidad de las técnicas fotofísicas, aplicadas a derivados fotoactivos de los ácidos biliares y colesterol para investigar algunas de sus características y funciones, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Sobre la agregación de los ácidos biliares:

- La derivatización del ácido cólico mediante la unión covalente del fluoróforo dansilo en posiciones **3 α -**, **3 β -** o **7 α -** del esqueleto proporciona sondas fluorescentes cuyas propiedades en el estado excitado singlete dependen fuertemente del medio.

- Estos derivados fotoactivos experimentan un aumento en la intensidad, el rendimiento cuántico de emisión y el tiempo de vida de fluorescencia, así como un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de la emisión, tras su incorporación en los agregados de diferentes sales biliares.

- El análisis combinado de la variación relativa de la fluorescencia en estado estacionario y tiempo resuelto frente a la concentración de SBs ha permitido construir los diagramas de especiación de las SBs más abundantes.

2. Sobre la incorporación de ácido cólico y colesterol a micelas mixtas:

- La unión covalente de dansilo o naproxeno al esqueleto esteroideo de ácido cólico y colesterol proporciona sondas cuyos estados excitados singlete y triplete permiten estudiar su incorporación en micelas mixtas.

- La sustitución de un porcentaje inferior al 5% de los componentes originales de la micela mixta por cualquiera de los dansil derivados de ácido cólico o colesterol resulta en un gran aumento de la intensidad de fluorescencia, acompañado por un cambio en el tiempo de vida de singlete.

- La imagen de fluorescencia obtenida por irradiación con una lámpara UV ($\lambda_{\text{exc}} = 254 \text{ nm}$) demuestra claramente cómo los dansil derivados de ácido cólico y colesterol se incorporan en las micelas mixtas.

- La sustitución de un porcentaje inferior al 5% de los componentes originales de la micela mixta por cualquiera de los derivados de naproxeno de ácido cólico o colesterol resulta en un aumento del tiempo de vida de triplete.

3. Sobre la capacidad de los agregados de ácido cólico como transportadores de fármacos:

- La desactivación de los estados excitados singlete y triplete por yoduro y nitrito, respectivamente, de (**R**)- y (**S**)-NPX, así como de sus ésteres metílicos (**R**)- y (**S**)-NPXMe, permite demostrar la diferente distribución de los ácidos carboxílicos libres y sus ésteres entre la disolución y los agregados.

- La incorporación de los ácidos libres, así como de sus ésteres metílicos, es posible en un porcentaje superior al 95%, a una concentración de colato sódico de 250 y 50 mM, respectivamente. Si se eligen concentraciones suficientemente altas de sal biliar, incluso los fármacos más hidrófilos pueden ser incorporados.

- El tiempo de vida de triplete de (**R**)- y (**S**)-NPX, así como de sus ésteres metílicos es mucho más largo cuando se encuentran incorporados en los agregados de colato sódico.

4. Sobre el estudio de procesos de desactivación de la fluorescencia y de transferencia de energía en los agregados de sales biliares y micelas mixtas:

- La unión covalente de dansilo en posiciones **3 β -** o **7 α -** del ácido cólico y de triptófano en la cadena lateral, proporciona modelos adecuados para estudiar simultáneamente procesos de desactivación de la fluorescencia inter e intramolecular en disolución y en diferentes entornos supramoleculares.

- La eficiencia en la desactivación del singlete (por yoduro) en diferentes derivados de triptófano y dansilo disminuye conforme los fluoróforos se incorporan en el interior de los agregados de colato sódico.

- Se produce transferencia de energía total en la díada **7 α -Dns-CA-TrpMe**, así como en el modelo **Dns-TrpMe** y parcial en la díada **3 β -Dns-CA-Trp**.

- La distancia estimada entre los cromóforos triptófano y dansilo de la díada **3 β -Dns-CA-Trp** es de ~ 30 Å.

- Se produce desactivación de singlete para los cromóforos dansilo y triptófano en la díada **3 β -Dns-CA-Trp** en disolución, en agregados de diferentes sales biliares y en micelas mixtas.

- La constante de desactivación de fluorescencia de la díada **3 β -Dns-CA-Trp** por yoduro decrece conforme aumenta la lipofilia del entorno en el que se encapsula.

Conclusions

From this doctoral thesis, which deals with the usefulness of photophysical techniques, applied to photoactive derivatives of bile acids and cholesterol to investigate some of its features and functions, the following conclusions can be drawn:

1. About the aggregation of bile acids:

- Derivatization of cholic acid by the covalent attachment of the dansyl fluorophore into positions **3 α -**, **3 β -** or **7 α -** of the skeleton provides fluorescent probes whose properties in the excited singlet state depend heavily on the environment.

- These photoactive derivatives experience an increase in intensity, quantum yield and lifetime of fluorescence, as well as a hypsochromic shift in the emission maximum, upon their incorporation into the aggregates of the different bile salts.

- Combined analysis of the relative variation of the steady-state and time-resolved fluorescence *versus* the concentration of SBs allows building the corresponding speciation diagrams of the most abundant SBs.

2. About the incorporation of cholic acid and cholesterol into mixed micelles:

- Dansyl or naproxen covalently bound to the steroidal skeleton of cholic acid and cholesterol provides probes whose singlet and triplet excited states allow investigating their incorporation into mixed micelles.

- Replacement of a percentage lower than 5% of the original components of the mixed micelle by either of the dansyl derivatives of cholic acid or cholesterol results in a large increase in their fluorescence intensity, accompanied by a change in the singlet lifetime.

- Fluorescence images obtained by irradiation with a UV lamp ($\lambda_{\text{exc}} = 254 \text{ nm}$) clearly demonstrate how the dansyl derivatives of cholic acid and cholesterol are incorporated into mixed micelles.

- Replacement of a percentage lower than 5% of the original components of the mixed micelle by any of the naproxen derivatives of cholic acid or cholesterol results in an increase in the triplet lifetime.

3. About the ability of cholic acid aggregates as drug carriers:

- Deactivation of the singlet and triplet excited states by iodide or nitrite, respectively, of (*R*) - and (*S*)-NPX, as well as their methyl esters (*R*)- and (*S*)-NPXMe has allowed demonstrating the different distribution of the free carboxylic acids and esters between the bulk solution and the aggregates.

- Incorporation of the free acids and their methyl esters is possible, in a percentage higher than 95%, at a concentration of sodium cholate of 250 or 50 mM, respectively. If sufficiently high concentrations of bile salts are chosen even the most hydrophilic drugs can be incorporated.

- Lifetime of the triplet of (*R*)- and (*S*)-NPX, or their methyl esters are much longer when they are incorporated into sodium cholate aggregates.

4. About the study of fluorescence quenching inter and intramolecular processes in the aggregates of bile salts and mixed micelles:

- Covalent attachment of dansyl at **3 β** - or **7 α** - cholic acid positions and tryptophan in the lateral chain provides suitable models to study simultaneously fluorescence quenching inter and intramolecular processes in solution and in different supramolecular environments.

- Deactivation efficiency of the singlet excited state (by iodide) in the different tryptophan derivatives and dansyl fluorophores decreases as upon incorporation of the probes inside sodium cholate aggregates.

- Total energy transfer occurs in the dyad **7 α -Dns-CA-TrpMe** as well as in **Dns-TrpMe** whereas it is only partial in the **3 β -Dns-CA-Trp** dyad.

- Estimated distance between tryptophan and dansyl chromophores in the dyad **3 β -Dns-CA-Trp** was $\sim 30 \text{ \AA}$.

- Fluorescence quenching occurs for dansyl and tryptophan chromophores in the **3 β -Dns-CA-Trp** dyad in solution, in different aggregates of bile salts and mixed micelles.

- The quenching constant of the **3 β -Dns-CA-Trp** dyad by iodide, decreases with increasing lipophilicity of the different environments where the chromophore and tryptophan chromophore are encapsulated.

Resúmenes

Resumen

Los ácidos biliares son estereoides biosintetizados en los hepatocitos del hígado que actúan como tensoactivos para facilitar la digestión de grasas, colesterol y lípidos mediante la formación de agregados y micelas mixtas, entre otras funciones.

En la presente tesis doctoral se planteó el empleo de técnicas fotofísicas tales como fluorescencia y fotólisis de destello láser, aplicadas a nuevos derivados fotoactivos de ácidos biliares y colesterol, para investigar las propiedades de diferentes sistemas supramoleculares como agregados o micelas mixtas.

En primer lugar, se prepararon nuevos derivados del ácido cólico y del colesterol empleando diferentes fluoróforos tales como dansilo, naproxeno y triptófano. Para los derivados de ácido cólico, éste se transformó en los amino intermedios en las posiciones **3 α -**, **3 β -** o **7 α -**. A partir de éstos se sintetizaron los derivados de dansilo en las tres posiciones, y el derivado **3 β -naproxeno**. Los derivados **3 β -** y **7 α -** dansilo también se utilizaron para unir covalentemente triptófano a la cadena lateral. Además, se prepararon otras dos díadas de triptófano, una de ellos uniendo el cromóforo por el grupo carboxilo del ácido cólico en ausencia de dansilo y otra uniendo directamente triptófano y dansilo. Las nuevas díadas de colesterol se prepararon mediante esterificación directa con los cromóforos dansilo o naproxeno.

A continuación, se estudiaron las propiedades fotofísicas de su estado fundamental, así como de sus estados excitados singlete y triplete. La unión covalente del fluoróforo dansilo en las posiciones **3 α -**, **3 β -** o **7 α -** del ácido cólico proporcionó sondas fluorescentes cuyas propiedades dependieron fuertemente del medio. Así se observó un desplazamiento hipsocrómico de la posición del máximo de emisión tras su incorporación a los agregados. Además, el rendimiento cuántico de emisión y el tiempo de vida de fluorescencia aumentaron más de tres veces respecto a los valores obtenidos en disolución para los derivados **3 α -** y **3 β -**. El análisis combinado de los experimentos en estado estacionario y tiempo resuelto permitió investigar la agregación de las SBs más abundantes,

proporcionando información clave para construir los diagramas de especiación. Éstos revelaron diferencias en las concentraciones de comienzo de formación de los agregados, siendo mayores, conforme se aumentaba la lipofilia de la sal biliar.

El empleo de derivados de dansilo y/o naproxeno unidos covalentemente al ácido cólico y/o colesterol ha demostrado la incorporación de ambos en la arquitectura supramolecular proporcionada por las micelas mixtas mediante la utilización de técnicas fotofísicas. La sustitución de un porcentaje inferior al 5% de los componentes originales de la micela mixta por los dansil derivados de ácido cólico o colesterol resultó en un gran aumento de la intensidad de fluorescencia, así como del tiempo de vida de singlete. El tiempo de triplete de las díadas marcadas con naproxeno aumentó en un orden de magnitud en micela mixta.

Por otra parte, se demostró la utilidad de las técnicas fotofísicas para evaluar el potencial de los agregados de ácidos biliares como transportadores de fármacos. Para ello, se evaluó la diferente distribución de las sondas entre la disolución y los agregados mediante el estudio de la desactivación de singlete y triplete por yoduro y nitrito, respectivamente, de los dos enantiómeros del antiinflamatorio no esteroideo (**R**)- y (**S**)-**NPX**, así como de sus ésteres metílicos (**R**)- y (**S**)-**NPXMe**. Mientras que en disolución se observaron constantes de desactivación de singlete eficientes ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), éstas se vieron reducidas en un orden de magnitud ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) cuando las sondas eran incorporadas a los agregados.

Se observó que las sondas más hidrofóbicas ((**R**)- o (**S**)-**NPXMe**) se incorporaban en los agregados a partir de 50 mM de colato sódico, mientras que las sondas más hidrofílicas ((**R**)- o (**S**)-**NPX**) se incorporaron, en un porcentaje superior al 95%, solo a partir de 250 mM de CA. El estudio mediante fotólisis de destello láser reveló la misma tendencia en la desactivación por nitrito del triplete de las sondas, indicando que ambas técnicas son herramientas que nos permiten evaluar la incorporación a los agregados.

Finalmente, se utilizaron los diferentes sistemas supramoleculares caracterizados durante la tesis doctoral (diferentes agregados de sales biliares y micelas mixtas) para estudiar procesos de desactivación de fluorescencia. La desactivación del singlete en diferentes derivados de triptófano o dansilo por yoduro fue muy efectiva en disolución para todos los casos ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para los derivados de triptófano y $\sim 7,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para dansilo) y disminuyó gradualmente conforme los fluoróforos se incorporaron en el interior de los agregados. Para asegurar la incorporación de las dos sondas al mismo tipo de entorno y estudiar simultáneamente en ambos cromóforos la desactivación del singlete, se prepararon díadas que contenían ambos en la misma molécula de ácido cólico. En concreto se prepararon nuevos derivados fotoactivos de ácido cólico mediante la unión covalente de dansilo en posiciones C-3 o C-7 y triptófano en la cadena lateral (**3 β -Dns-CA-Trp**, **7 α -Dns-CA-TrpMe**, respectivamente). Los espectros de emisión de estas nuevas díadas revelaron que para **7 α -Dns-CA-TrpMe** se producía un proceso de transferencia de energía total desde el triptófano al dansilo, mientras que para **7 α -Dns-CA-TrpMe**, la transferencia resultó ser parcial. Asumiendo un mecanismo de tipo Förster, se estimó la distancia entre ambos cromóforos en la díada **3 β -Dns-CA-Trp**, resultando del orden de 30 Å. Por otra parte, se eligió el derivado **3 β -Dns-CA-Trp** para estudiar la desactivación de la fluorescencia en diferentes agregados de sales biliares y micelas mixtas y se observó desactivación del singlete por yoduro en todos los sistemas supramoleculares. La constante de desactivación decreció con la misma tendencia para ambos cromóforos conforme se aumentó la lipofilia del entorno, alcanzando valores de un orden de magnitud inferiores a los obtenidos en disolución.

Resum

Els àcids biliars són esteroides biosintetitzats en els hepatòcits del fetge que actuen com tensioactius per facilitar la digestió de greixos, colesterol i lípids mitjançant la formació d'agregats i micel·les mixtes, entre altres funcions.

En la present tesi doctoral es va plantejar l'ús de tècniques fotofísiques com ara fluorescència i fotòlisi de flaix làser, aplicades a nous derivats fotoactius d'àcids biliars i colesterol, per investigar sobre les seves propietats en diferents sistemes supramoleculars com agregats o micel·les mixtes.

Per a començar, es van preparar nous derivats de l'àcid còlic i del colesterol emprant diferents fluoròfors com ara dansil, naproxèn i triptòfan. Per als derivats d'àcid còlic, aquest es va transformar en els amino derivats d'àcid còlic en posicions **3 α -**, **3 β -** o **7 α -**. A partir d'aquests es van sintetitzar els derivats de dansil en les tres posicions i el derivat **3 β -naproxèn**. Els derivats **3 β -** i **7 α -dansil** també es van utilitzar per unir covalentment triptòfan a la cadena lateral. A més, es van preparar dos derivats de triptòfan addicionals, un d'ells unint el cromòfor pel grup carboxil de l'àcid còlic en absència de dansil, i un altre unint directament triptòfan i dansil. En el cas del colesterol, els derivats es van preparar mitjançant esterificació directa amb els cromòfors dansil o naproxèn.

A continuació, es van estudiar les propietats fotofísiques del seu estat fonamental així com dels seus estats excitats singlet i triplet. Es va observar que la unió dels fluoròfors al esquelet esteroidal d'àcid biliar o colesterol no alteraven les propietats fotofísiques característiques del cromòfor. La unió covalent del fluoròfor dansil en les posicions **3 α -**, **3 β -** o **7 α -** de l'àcid còlic va proporcionar sondes fluorescents on les propietats depenien fortament del medi. Així es va observar un desplaçament hipsocròmic de la posició del màxim d'emissió després de la seua incorporació als agregats. A més, es va observar un augment en la intensitat del rendiment quàntic d'emissió i el temps de vida de fluorescència respecte a l'obtingut en dissolució per als derivats **3 α -** i **3 β -** de més de tres vegades.

L'anàlisi combinat dels experiments en estat estacionari i temps resolt ha permès investigar l'agregació de les SBs més abundants, proporcionant informació clau per construir els diagrames d'especiació. Aquests van revelar les diferències entre les concentracions de començament de formació dels agregats, sent majors conforme augmentava la hidrofobicitat de la sal biliar .

L'ús de derivats de dansil i/o naproxèn units covalentment a l'àcid còlic i/o colesterol ha demostrat la incorporació de tots dos en l'arquitectura supramolecular proporcionada per les micel·les mixtes mitjançant la utilització de tècniques fotofísiques. La substitució d'un percentatge inferior al 5% dels components originals de la micel·la mixta pels dansil derivats d'àcid còlic o colesterol va resultar en un gran augment de la intensitat de fluorescència, així com del temps de vida de singlet. El temps de vida de triplet dels derivats marcats amb naproxèn augmentaren un ordre de magnitud en micel·la mixta .

A continuació, es va demostrar la utilitat de les tècniques fotofísiques per evaluar el potencial dels agregats d'àcids biliars com a transportadors de fàrmacs. Per a això, es va evaluar la diferent distribució de les sondes entre la dissolució i els agregats mitjançant l'estudi de la desactivació de singlet i triplet per iodur i nitrit, respectivament, dels dos enantiòmers del antiinflamatori no esteroïdal (**R**)- i (**S**)-**NPX**, així com dels seus èsters metàlics (**R**)- i (**S**)-**NPXMe**. Així, mentre que en dissolució es van observar constants de desactivació de singlet molt eficients ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), aquestes es van veure reduïdes en un ordre de magnitud ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) quan les sondes era incorporades als agregats. Es va observar que les sondes més hidrofòbiques ((**R**)- o (**S**)-**NPXMe**) es van incorporar als agregats a partir de 50 mM de colat sòdic, mentre que les sondes més hidrofíliques ((**R**)- o (**S**)-**NPX**) es van incorporar, en un percentatge superior al 95 %, només a partir de 250 mM de CA. L'estudi mitjançant fotòlisi de flaix làser va revelar la mateixa tendència en la desactivació per nitrit del triplet de les sondes, indicant que ambdues tècniques són ferramentes que ens permeten evaluar la incorporació de les sondes als agregats .

Finalment, es van utilitzar els diferents sistemes supramoleculars caracteritzats durant la tesi doctoral (diferents agregats de sals biliars i micel·les mixtes) per a estudiar processos de desactivació de fluorescència. La desactivació del singlet en diferents derivats de triptòfan o dansil per iodur va ser molt efectiva en dissolució ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ per als derivats de triptòfan i $\sim 7,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ per als dansil derivats) i va disminuir gradualment conforme els fluoròfors es van incorporar a l'interior dels agregats. Per assegurar la incorporació de les dues sondes al mateix tipus d'entorn i estudiar simultàniament en ambdós cromòfors processos de desactivació de fluorescència, es van preparar diades que van contenir tots dos a la mateixa molècula d'àcid còlic. En concret, es van preparar nous derivats fotoactius d'àcid còlic mitjançant la unió covalent en les posicions C-3 o C-7 i triptòfan en la cadena lateral (**3 β -Dns-CA-Trp** i **7 α -Dns-CA-TrpMe**, respectivament). Els espectres d'emissió d'aquestes noves diades van revelar que per aquelles en què els cromòfors dansil i triptòfan estaven units covalentment a les posicions C-7 i cadena lateral, respectivament, es produïa un procés de transferència d'energia total des del triptòfan al dansil, mentre que per a la diada en què el dansil i triptòfan estaven units en posicions C-3 i cadena lateral, respectivament, la transferència resultà ser parcial. Assumint un mecanisme de tipus Förster, es va estimar la distància entre ambdós cromòfors, resultant de l'ordre de 30 Å. Es va triar aquest derivat per estudiar processos de desactivació del singlet en diferents agregats de sals biliars i micel·les mixtes i es va observar que en ambdós cromòfors es produïa ja que es va observar desactivació de la fluorescència per iodur en tots els sistemes supramoleculars. La constant de desactivació va créixer amb la mateixa tendència quan es va augmentar la lipofília de l'entorn per a ambdós cromòfors, arribant a valors d'un ordre de magnitud menor en comparació als obtinguts en dissolució.

Summary

Bile acids are steroids biosynthesized in the hepatocytes of the liver acting as surfactants to aid digestion of fats, cholesterol and lipids by forming aggregates and mixed micelles, among other functions.

In this thesis, photophysical techniques such as fluorescence and laser flash photolysis have been applied to new photoactive derivatives of bile acids and cholesterol, to investigate the properties of different supramolecular systems such as aggregates or mixed micelles.

First of all new derivatives of cholic acid and cholesterol were prepared using different fluorophores such as dansyl, naproxen or tryptophan. Cholic acid was first transformed into the amino intermediates at positions **3 α -**, **3 β -** or **7 α -**, and the dansyl chromophore was covalently attached to the three positions. The **3 β -**naproxen analog was also synthesized from the 3 β -amino. Moreover, tryptophan was covalently linked to the side chain of **3 β -** and **7 α -dansyl** functionalized cholic acid. Furthermore, two additional tryptophan dyads were prepared by reaction of the parent of cholic acid at the carboxyl group or by direct dansylation of tryptophan. In the case of cholesterol, the photoactive dyads were prepared by esterification at the 3 β - position with the dansyl chromophore or naproxen.

Next, the photophysical properties of the excited singlet and triplet states of all derivatives were studied. Covalent attachment of the dansyl fluorophore at positions **3 α -**, **3 β -** or **7 α -** of cholic acid gave fluorescent probes, whose properties depended strongly on the environment. Thus, a hypsochromic shift of the emission maximum after incorporation into the aggregates was observed. Moreover, an increase of the emission quantum yields and lifetimes of more than three times, compared to the values obtained in solution, was observed for **3 α -** and **3 β -** derivatives. The combined analysis of steady-state and time-resolved experiments allowed investigation of the aggregation behavior of the most

abundant SBs, providing key information to build the corresponding speciation diagrams. They revealed the differences in the concentrations at which aggregation starts, which increase with increasing lipophilicity of the bile salt.

The use of dansyl or naproxen derivatives of cholic acid or cholesterol has demonstrated the incorporation of both building blocks in the supramolecular architecture provided by the mixed micelles using photophysical techniques. Replacement of less than 5% of the original components of the mixed micelle by their fluorescent analogs resulted into a huge increase of the fluorescence intensity as well as of the singlet lifetime. The triplet lifetime of the naproxen labelled compounds increased by an order of magnitude in mixed micelles.

Next, the usefulness of the photophysical techniques to evaluate the potential of bile acids aggregates as drug carriers was demonstrated. Thus, the different distribution of the probes between the solution and the aggregates was evaluated by quenching of singlet and triplet excited states by iodide and nitrite, respectively. For this purpose, the two enantiomers of the anti-inflammatory drugs (**R**)- or (**S**)-**NPX**, as well as their methyl esters (**R**)- and (**S**)-**NPXMe** were used. While singlet quenching was more efficient in solution ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), the rate constants decreased by an order of magnitude when the probes were incorporated into the aggregates.

It was observed that the most hydrophobic probes (**R**)- or (**S**)-**NPXMe** were fully incorporated at the aggregates already at 50 mM sodium cholate, while hydrophilic probes (**R**)- or (**S**)-**NPX** were only incorporated substantially (> 95%) to 250 mM of CA. The laser flash photolysis study revealed the same trend in the triplet quenching by nitrite, indicating that both techniques are useful tools that allow us to evaluate the incorporation of the probes to the aggregates.

Finally, different supramolecular systems characterized during the thesis (various bile salts aggregates and mixed micelles) were used to study fluorescence quenching processes. Quenching of the singlet excited state by iodide in different tryptophan or dansyl probes was very effective in solution in all cases ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for tryptophan and $\sim 7.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for dansyl) and gradually decreased as the fluorophores were incorporated inside the aggregates. To ensure the location of the two probes in the same type of environment, dyads containing both chromophores linked to the same molecule of cholic acid were prepared. In particular, new photoactive derivatives of cholic acid, in which dansyl was covalently bound at positions C-3 or C-7 and tryptophan at the lateral chain (**3 β -Dns-CA-Trp** and **7 α -Dns-CA-TrpMe**, respectively) were prepared. Emission spectra of these new dyads revealed that for **7 α -Dns-CA-TrpMe** full energy transfer from tryptophan to dansyl occurred, while for **3 β -Dns-CA-Trp** the process turned out to be only partial. Assuming a Förster type mechanism, the distance between both chromophores in the dyad was estimated to be around 30 Å. Thus, **3 β -Dns-CA-Trp** was chosen to study singlet quenching in different bile salts aggregates and mixed micelles; it was observed that in both chromophores fluorescence quenching by iodide occurred in supramolecular systems. Quenching constants decreased with increasing lipophilicity of the environment, reaching values an order of magnitude lower than in solution.

Contribuciones a congresos

Contribuciones a congresos de la presente Tesis Doctoral:

1. M. Gómez-Mendoza, M. L. Marín, M. A. Miranda. “**Fluorescent cholic acid derivatives as probes for the photophysical characterization of bile acid aggregates**”. IX Congreso de Fotoquímica. Septiembre **2009**. Bilbao (Leioa) (España). Póster
2. M. Gómez-Mendoza, M. L. Marín, M. A. Miranda. “**Dansyl Derivatives of Cholic Acid as Tools to Build Speciation Diagrams for Sodium Cholate Aggregation**”. III Jornadas ibéricas de Fotoquímica. Septiembre **2011**. Granada (España). Póster.
3. E. Nuín, M. Gómez-Mendoza, I. Andreu, M. L. Marín, M. A. Miranda. “**Photophysical Probes to Assess the Potential of Cholic Acid Aggregates as Drug Carriers**”. XXIV IUPAC: Symposium on Photochemistry. Julio **2012**, Coimbra (Portugal). Póster.
4. M. L. Marín, E. Nuín, M. Gómez-Mendoza, I. Andreu, M. A. Miranda. “**New Photoactive Compounds To Probe Cholic Acid and Cholesterol Inside Mixed Micelles**”. Gordon Research Conference on Photochemistry. Julio **2013**. Stonehill College in Easton MA (United States). Póster.

Anexo: Publicaciones

Publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral:

1. Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“Dansyl Derivatives of Cholic Acid as Tools to Build Speciation Diagrams for Sodium Cholate Aggregation”**. *Journal Physical Chemistry Letters* **2011**, 2, 782–785.
2. Gomez-Mendoza, M.; Nuin, E.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“Photophysical Probes To Assess the Potential of Cholic Acid Aggregates as Drug Carriers”**. *Journal Physical Chemistry B* **2012**, 116, 10213-10218.
3. Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“Dansyl-Labeled Cholic Acid as a Tool To Build Speciation Diagrams for the Aggregation of Bile Acids”**. *Journal Physical Chemistry B* **2012**, 116, 14776–14780.
4. Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“New Photoactive Compounds To Probe Cholic Acid and Cholesterol Inside Mixed Micelles”** *Organic Letters* **2013**, 15 , 298-301
5. Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“Fluorescence quenching processes in different supramolecular systems”**. (En preparación).

Otras publicaciones relacionadas

6. E. Nuin, M. Gómez-Mendoza, M. L. Marin, I. Andreu, M. A. Miranda. **“Influence of Drug Encapsulation within Mixed Micelles on the Excited State Dynamics and Accessibility to Ionic Quenchers”**. *Journal Physical Chemistry B* **2013**, 117, 9327-9332.

7. Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. **“New Photoactive Cholic Acid Aggregates Based on Dansyl and / or Naproxen Labeled Cholic Acid”**. (En preparación).

Dansyl Derivatives of Cholic Acid as Tools to Build Speciation Diagrams for Sodium Cholate Aggregation

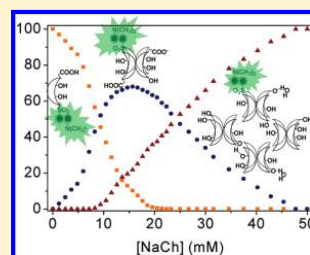
Miguel Gomez-Mendoza, M. Luisa Marin,* and Miguel A. Miranda*

Instituto de Tecnología Química-Departamento de Química (UPV-CSIC), Avda de los Naranjos s/n, E-46022, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Three fluorescent cholic acid derivatives incorporating the dansyl chromophore at positions 3 α , 3 β , and 7 α have been successfully employed to build the speciation diagram of sodium cholate by means of steady-state and time-resolved fluorescence.

SECTION: Biophysical Chemistry



Bile acids (BAs) are a family of water-soluble steroids that play an important role in a variety of physiological functions, including (i) elimination of cholesterol by conversion into BAs and by micellar solubilization, (ii) lipid transport as mixed micelles, or (iii) stimulation of biliary phospholipid secretion.^{1,2} Chemically, they are steroids with an unusual cis fusion between rings A and B, a different number of hydroxyl groups in the α -face, and a short lateral chain ending in a carboxyl group. As a consequence, they exhibit facial amphiphilia; therefore, their β convex face is hydrophobic, whereas the α concave face shows a more hydrophilic character. Moreover, in aqueous solution, they tend to form aggregates that increase in size with concentration.

Although the key physiological functions of BAs are due to their ability to form aggregates in solution, the detailed aggregation behavior still remains a matter of discussion and is not yet fully understood. Different experimental techniques have been used to gain insight into the aggregation of BAs. They include NMR³ as well as steady-state^{4–7} and time-resolved photophysical techniques.^{8–12}

Currently, the primary/secondary aggregation model proposed by Small and co-workers, based on a different nuclear magnetic resonance broadening of the signals at the hydrophobic and hydrophilic sides, is widely accepted.³ According to this model, at low bile salt concentrations, the interaction of the hydrophobic faces of a small number of monomers (2–10) leads to the formation of primary aggregates. When the concentration raises, agglomeration into secondary aggregates takes place. However, specific information about the distribution of the different types of aggregates in a broad range of concentrations, as required to build speciation diagrams, is still missing.

We have recently reported on the synthesis of fluorescent cholic acid (ChA) derivatives to investigate the kinetics of BA uptake by hepatocytes using flow cytometry, as well as the

binding to human serum albumin for transport in portal blood. For these purposes, 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) and dansyl (Dns) chromophores have been covalently attached at positions 3 α , 3 β , 7 α , and 7 β of ChA.^{13–15} These small fluorophores display convenient photophysical properties for monitoring different physiological functions. In addition, they have been demonstrated to produce minimal changes of the molecule, which do not affect significantly the physiological behavior of the parent compounds. As an example to illustrate their biomimetic nature, the taurine conjugate of modified ChA (3 β -NBD-ChTau) is taken up by human transport peptides with a kinetics very similar to that shown by the nonderivatized tritium-labeled taurocholic acid.¹⁵

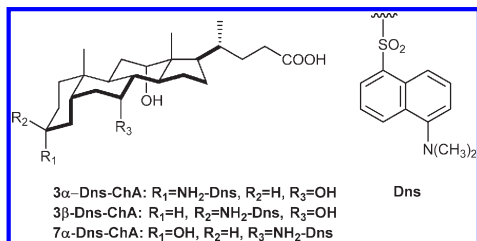
In the present paper, we report on the utility of fluorescent ChA derivatives to investigate BA aggregation behavior. Specifically, we have used 3 α -, 3 β -, and 7 α -Dns-ChA (Chart 1) as probes. By means of steady-state and time-resolved photophysical techniques, the percentage of the different aggregates as a function of the sodium cholate (NaCh) concentration has been established.

The UV-vis spectra of 3 α -, 3 β -, and 7 α -Dns-ChA in aqueous NaCl (0.2 M) exhibited a maximum at around 330 nm and a shoulder at \sim 250 nm (see Table 1). The fluorescence spectra of the three derivatives showed a maximum at \sim 550 nm. Fluorescence quantum yields close to 0.05 were determined in aerated saline aqueous solution (ϕ_s). Lifetimes of the singlet excited states (τ_s) ranged from 4.8 to 4.9 ns for 3 α - and 3 β -Dns-ChA and to 7.4 ns for 7 α -Dns-ChA. As expected, the emission maxima were red-shifted with respect to less polar solvents (ethanol),¹⁴

Received: February 7, 2011

Accepted: March 9, 2011

Published: March 15, 2011

Chart 1. Structures of the Dns Derivatives Used for the Characterization of ChA Aggregates**Table 1. Photophysical Properties of Dns Derivatives in Aqueous Solution (NaCl 0.2 M)**

	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ_s^a	τ_s^a
3 α -Dns-ChA	248, 328	544	0.05	4.8
3 β -Dns-ChA	248, 327	547	0.05	4.9
7 α -Dns-ChA	247, 327	538	0.06	7.4
Dns-Gly	244, 327	558	0.03	1.5

^a Errors were lower than 5% of the stated values.

besides, fluorescence quantum yields and singlet lifetimes were significantly lower (see Table 1). Data for dansylglycine (Dns-Gly) have been included for comparison.

The behavior of the fluorescent ChA derivatives was examined in the presence of nonfluorescent NaCh. Thus, saline solutions of Dns-ChAs (20 μ M) containing up to 40 mM NaCh were subjected to absorption and emission measurements. The addition of nonderivatized NaCh did not produce significant changes in the absorption spectra; however, it resulted in a marked enhancement of the emission intensity, accompanied by a hypsochromic shift of the maxima (see Figure 1 top for a representative example).

For the three Dns-ChAs, the fluorescence quantum yield increased with increasing concentration of NaCh due to the progressive incorporation of the fluorophore to a more protected microenvironment. Moreover, when the relative emission intensity of the three isomers was plotted against NaCh concentration (Figure 1 bottom), it became evident that the Dns moiety covalently attached to positions 3 α and 3 β was more sensitive to incorporation into NaCh aggregates. In addition, clear curvature changes were noticed at concentrations roughly coincident with those usually associated with transitions between solution (S), primary (I), and secondary (II) aggregates.^{3,8,12} Thus, it is remarkable that the emission behavior was strongly dependent on the position of the chromophore and also on the stereochemistry. In the case of the 7 α -isomer, the effect was quantitatively less important, probably due to the lower protective effect provided by the hydrophilic concave α face.

The importance of the covalent link between the chromophore and the steroidal skeleton in Dns-ChAs was emphasized by performing analogous experiments using Dns-Gly, in order to make it water-soluble. In this case, the emission enhancement was only 1.5 fold, and the curvature changes were not clearly distinguishable.

To investigate the nature of the observed behavior, fluorescence lifetimes of the Dns-ChA derivatives were measured in the

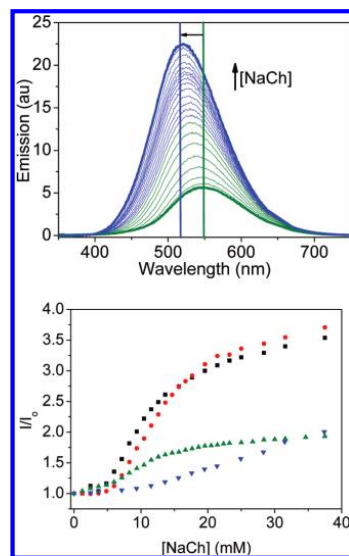


Figure 1. (Top) Emission spectra of 3 α -Dns-ChA (20 μ M) in 0.2 M NaCl upon addition of increasing amounts of NaCh (0–40 mM). (Bottom) Changes in the relative emission (I/I_0) of 3 α - (■), 3 β - (●), 7 α -Dns-ChA (▲) and Dns-Gly (▼) versus NaCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl.

Table 2. Fluorescence Lifetimes of Dns Derivatives in Primary (I) and Secondary (II) NaCh Aggregates^a

	τ_I	τ_{II}
3 α -Dns-ChA	10.6	12.8
3 β -Dns-ChA	11.2	14.5
7 α -Dns-ChA	12.2	13.6

^a Errors were lower than 5% of the stated values.

presence of increasing concentrations of NaCh. Below 5 mM, the singlet excited state emission followed a first-order exponential law; the corresponding τ_s values are shown in Table 1. Interestingly, as the concentration of NaCh increased, two different τ values were necessary to obtain satisfactory fittings. Thus, between 5 and 12 mM NaCh, apart from the τ_s corresponding to the chromophore in the bulk solution, a second lifetime value (τ_I) indicated the location of the chromophore into a different microenvironment. Moreover, above 12 mM NaCh, a third component (τ_{II}) was needed to fit the fluorescence decay traces; this was taken as an indication of the presence of the Dns chromophore in another type of medium. Table 2 shows the τ_I and τ_{II} values obtained for 3 α -, 3 β -, and 7 α -Dns-ChA in primary (I) and secondary (II) NaCh aggregates.

In order to make use of the singlet excited state lifetimes as a probe for the aggregation behavior, the average lifetimes, readily obtained from the lifetime components (τ_s , τ_I , and τ_{II}) and the preexponential factors (A_s , A_I , and A_{II}), were plotted against NaCh concentration (Figure 2).

The relative increase in the average singlet lifetimes was up to 3 times in the case of 3 α - or 3 β -Dns-ChA and less than twice for

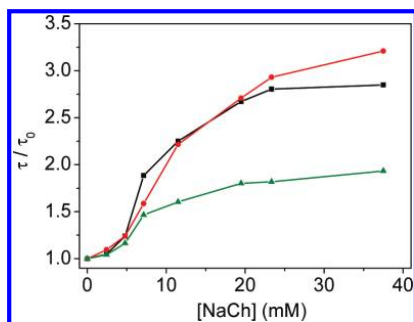


Figure 2. Changes in the relative singlet lifetimes (τ/τ_0) of 3α - (■), 3β - (●), and 7α -Dns-ChA (▲) versus NaCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl.

the 7α - isomer. The observed trend was analogous to that observed in the steady-state fluorescence experiments (see above), with 3β -Dns-ChA being again the most sensitive derivative. Again, in the presence of increasing concentrations of NaCh (Figures 1 bottom and 2), three different regions can be clearly differentiated that can be correlated with the presence of NaCh in solution and formation of primary and secondary aggregates. Although it is generally accepted that the aggregation of bile salts is a continuous process, the obtained results are in excellent agreement with the model proposed by Small.³

After establishing the qualitative correlation between fluorescence properties and aggregation behavior, an attempt was made to exploit the combined steady-state and time-resolved photophysical experiments for 3α -, 3β -, and 7α -Dns-ChA in order to build the speciation diagram. Thus, the percentage of each component ($\%i$) at different concentrations of sodium cholate in 0.2 M aqueous NaCl was determined using eqs 1 and 2.

$$\frac{I}{I_0} = (\%S)\phi_S + (\%I)\phi_I + (\%II)\phi_{II} \quad (1)$$

$$\%i = \frac{\frac{A_i}{\phi_i}}{\frac{A_S}{\phi_S} + \frac{A_I}{\phi_I} + \frac{A_{II}}{\phi_{II}}} \quad (2)$$

where I/I_0 is the emission enhancement at a given NaCh concentration, %S, %I, and %II are the percentages of the different species, ϕ_S , ϕ_I , and ϕ_{II} are their fluorescence quantum yields, and A_S , A_I , and A_{II} are the pre-exponential factors of the decay fittings. The values of ϕ_S are given in Table 1, whereas ϕ_{II} values were estimated to be 0.19 (3α -Dns-ChA), 0.20 (3β -Dns-ChA), and 0.12 (7α -Dns-ChA) by assuming that secondary aggregates are the only existing species at NaCh concentrations above 50 mM. Primary aggregates are expected to predominate in the intermediate NaCh concentration range, and in fact, the I/I_0 (or τ/τ_0) versus [NaCh] curves obtained for the 3α - and 3β -derivatives clearly cross at 15 mM. Therefore, initial ϕ_I values of 0.13 (for 3α - and 3β -Dns-ChA) or 0.09 (7α -Dns-ChA) were selected by assuming the simplification that primary aggregates are the only existing species at this concentration. These values were fed into eqs 1 and 2, and then, they were refined within a narrow range (± 0.02) until a satisfactory matching between the simulated and the experimental steady-state and time-resolved

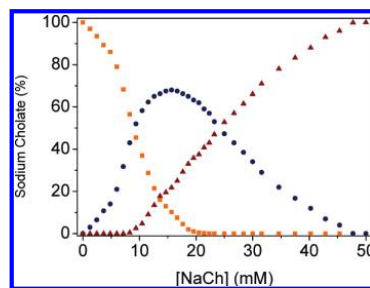


Figure 3. Percentage of sodium cholate in solution (■) and in primary (●) and secondary aggregates (▲).

results was achieved. This led to final ϕ_I values of 0.14, 0.13, and 0.10 for the 3α -, 3β -, and 7α -derivatives, respectively.

The results obtained for 3α -, 3β -, and 7α -Dns-ChA were very similar in the three cases; the average values are shown in Figure 3.

It is interesting to note that some NaCh remains in solution until 20 mM, while the secondary aggregates start to appear already at 10 mM. As regards the primary aggregates, they are present in about all of the concentration ranges, with maximum contribution at ~ 15 mM.

In summary, Dns derivatives of ChA are valuable tools to investigate the aggregation behavior of NaCh. Their strongly medium-dependent photophysical behavior provides key information to build speciation diagrams.

EXPERIMENTAL SECTION

Experimental details for a typical titration experiment are as follows. The concentration of Dns derivatives in 0.2 M NaCl for the steady-state and time-resolved fluorescence experiments was $20 \mu\text{M}$ (obtained from 5 mM DMSO stock solutions to ensure an absorbance of <0.1 at the corresponding excitation wavelength). They were titrated with a 0.15 M aqueous solution of NaCh containing 0.2 M NaCl and $20 \mu\text{M}$ of the corresponding Dns derivative.

To fit the emission decays, the following protocol was employed; when the Dns derivative was in solution, a mono-exponential function was applied. As the ChA concentration increased, primary and secondary aggregates were formed; hence, the three singlet lifetimes and the preexponential factors were obtained from a function containing three monoexponential components.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Absorption spectra and emission decay curves of 3α -Dns-ChA, 3β -Dns-ChA, and 7α -Dns-ChA in the presence of NaCh. Speciation diagrams obtained for NaCh using these fluorescent probes. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marmarin@qim.upv.es (M.L.M.); mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.). Fax: +34963877809. Tel: +34963877807.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the Spanish Government (CTQ2009-13699), Predoctoral FPU fellowship (AP2008-03295), and the Generalitat Valenciana (Prometeo Program) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- (1) Hofmann, A. F. The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease. *Arch. Intern. Med.* **1999**, *159*, 2647–2658.
- (2) Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461–2483.
- (3) Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D. Studies on Simple and Mixed Bile Salt Micelles by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *176*, 178–189.
- (4) Paul, R.; Mathew, M. K.; Narayanan, R.; Balaram, P. Fluorescent-Probe and NMR-Studies of the Aggregation of Bile-Salts in Aqueous-Solution. *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *25*, 345–356.
- (5) Gouin, S.; Zhu, X. X. Fluorescence and NMR Studies of the Effect of a Bile Acid Dimer on the Micellization of Bile Salts. *Langmuir* **1998**, *14*, 4025–4029.
- (6) Singh, T. S.; Mitra, S. Fluorescence Properties of trans-Ethyl-p-(Dimethylamino) Cinnamate in Presence of Bile Acid Host. *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *96*, 193–200.
- (7) Diaz, A. N.; Sanchez, F. G.; Pareja, A. G. Cholic Acid Behavior in Water and Organic Solvent: Study of Normal and Inverted Aggregates. *Colloids Surf., A* **1998**, *142*, 27–34.
- (8) Ju, C.; Bohne, C. Probing Bile Salt Aggregates by Fluorescence Quenching. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 60–67.
- (9) Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C. Probing the Binding Dynamics to Sodium Cholate Aggregates Using Naphthalene Derivatives as Guests. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 1140–1151.
- (10) Jover, A.; Meijide, F.; Nunez, E. R.; Tato, J. V.; Mosquera, M. Aggregation Number for Sodium Deoxycholate from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence. *Langmuir* **1997**, *13*, 161–164.
- (11) Li, R.; Carpentier, E.; Newell, E. D.; Olague, L. M.; Heafey, E.; Yihwa, C.; Bohne, C. Effect of the Structure of Bile Salt Aggregates on the Binding of Aromatic Guests and the Accessibility of Anions. *Langmuir* **2009**, *25*, 13800–13808.
- (12) Ju, C.; Bohne, C. Dynamics of Probe Complexation to Bile Salt Aggregates. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3847–3854.
- (13) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; Diaz, L.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. Fluorescent Benzofurazan–Cholic Acid Conjugates for in Vitro Assessment of Bile Acid Uptake and Its Modulation by Drugs. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 466–472.
- (14) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. Synthesis of New, Uv-Photoactive Dansyl Derivatives for Flow Cytometric Studies on Bile Acid Uptake. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4973–4980.
- (15) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. Complexes between Fluorescent Cholic Acid Derivatives and Human Serum Albumin. A Photophysical Approach to Investigate the Binding Behavior. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 4710–4716.

Supporting Information

Dansyl derivatives of cholic acid as tools to build speciation diagrams for sodium cholate aggregation

M. Gomez-Mendoza, M. Luisa Marin,* Miguel A. Miranda*

Instituto de Tecnología Química-Departamento de Química (UPV-CSIC), Avda de los Naranjos s/n, E-46022, Valencia, Spain

	<u>Page</u>
1. Experimental section	S2
2. Figures S1a-c	S3
3. Figures S2a-h	S4
4. Figures S3a-h	S5
5. Figures S4a-h	S6
6. Figures S5a-b	S7
7. Figures S6a-b	S8
8. Figures S7a-b	S9

Experimental section

Chemicals

Sodium cholate (NaCh), dansylglycine (Dns-Gly), coumarine30 and sodium chloride were purchased from Sigma Aldrich and used without further purification. Absolute ethanol was HPLC grade. Millipore water was used for sample preparation. The dansyl derivatives (3 α -, 3 β - and 7 α -Dns-ChA) were synthesized as described previously.¹

Instrumentation

Absorption spectra were recorded on a Cary 300 UV-Vis spectrophotometer (UV0811M209, Varian). Fluorescence spectra were obtained with a LP S-220B (Photon Technology International) equipped with 75 W Xe lamp and were corrected with baseline control experiments to subtract the solvent Raman emission. Fluorescence quantum yields were determined using coumarine30 in air-saturated CH₃CN ($\Phi_F = 0.67$, $\lambda_{exc} = 370$ nm) as standard.² Fluorescence lifetime measurements were based on a PTI (TM-2/2003) equipped with H₂/N₂ (50/50, 1.5 ns pulse width) lamp and stroboscopic detector. The absorbance of the solutions at the excitation wavelength ($\lambda_{exc} = 327$ nm for static and $\lambda_{exc} = 337$ nm for dynamic experiments, respectively) was kept below 0.1. The photophysical measurements were performed under air at room temperature in a quartz cell of 1.0 cm optical path length.

-
- 1 J. Rohacova, M. L. Marin, A. Martinez-Romero, J. E. O'Connor, M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell and M. A. Miranda, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7, 4973-4980.
 - 2 G. Jones, W. R. Jackson, C. Choi and W. R. Bergmark, *Journal of Physical Chemistry*, 1985, 89, 294-300.

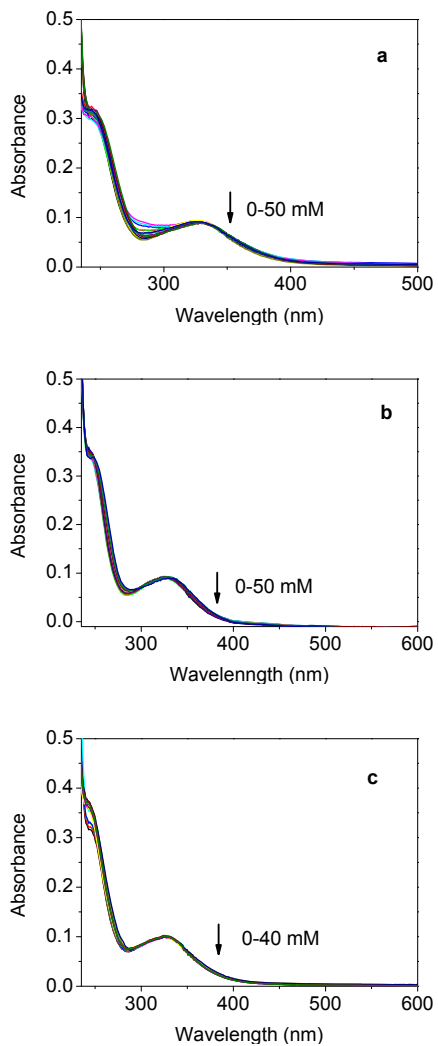


Figure S1. Absorption spectra of 3 α -Dns-ChA (a), 3 β -Dns-ChA (b) and 7 α -Dns-ChA (c) upon addition of increasing concentrations of sodium cholate in 0.2 M aqueous NaCl.

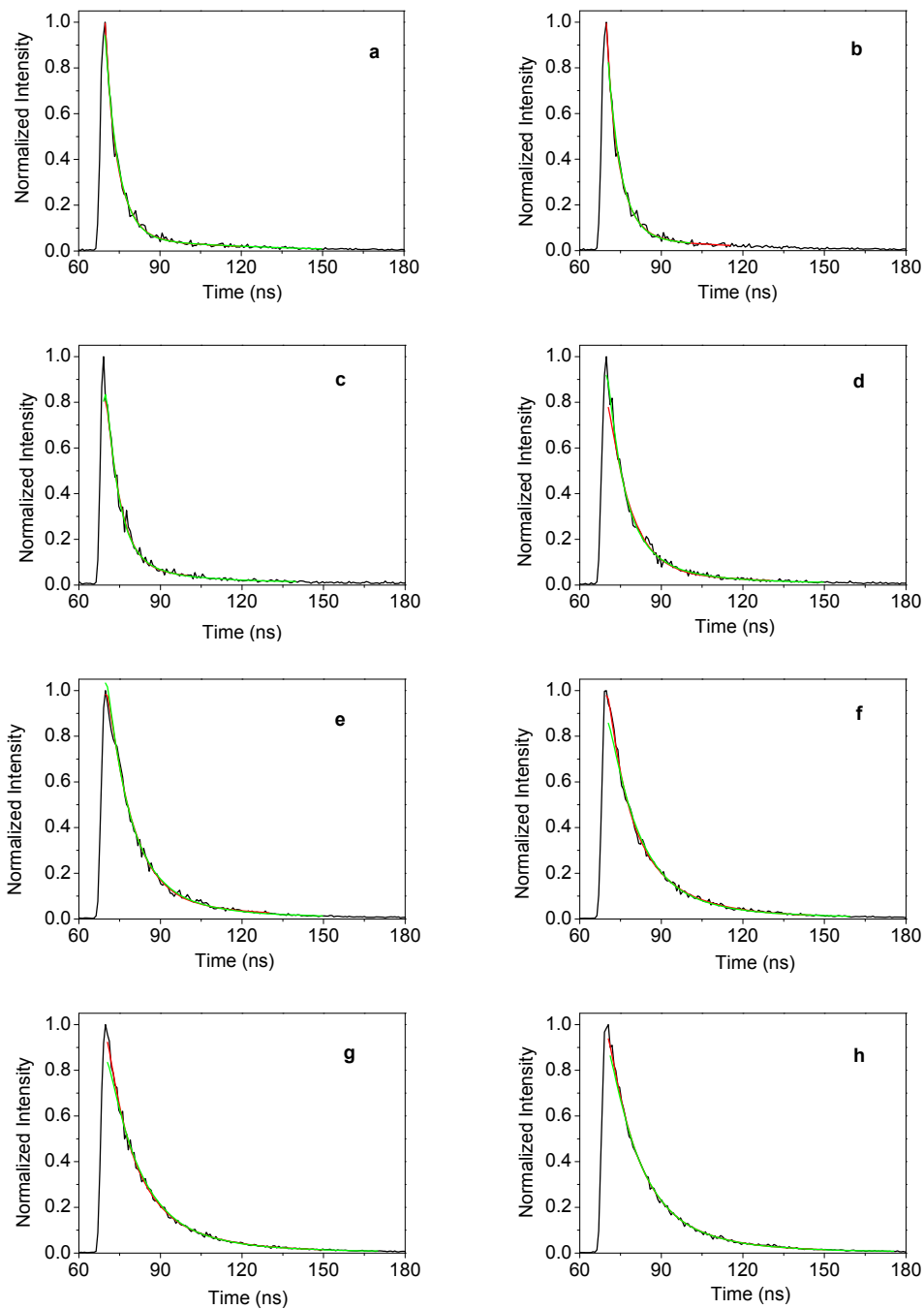


Figure S2. Decay curves of 3α -Dns-ChA with the corresponding monoexponential (red) and multiexponential fitting (green) obtained in the presence of different concentrations of sodium cholate: 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d), 11 (e), 20 (f), 23 (g) and 37 mM (h).

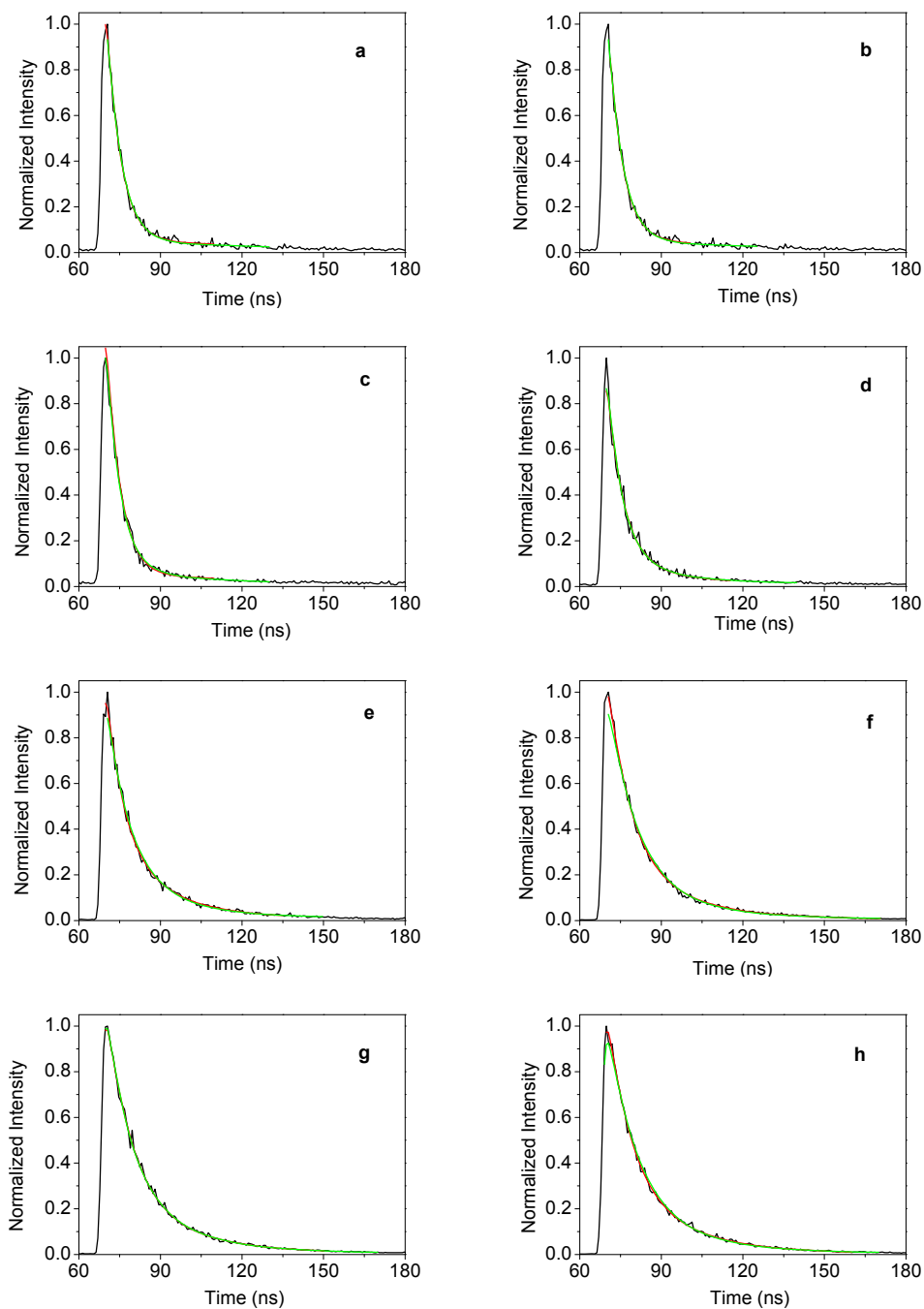


Figure S3. Decay curves of 3 β -Dns-ChA with the corresponding monoexponential (red) and multiexponential fitting (green) obtained in the presence of different concentrations of sodium cholate: 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d), 11 (e), 20 (f), 23 (g) and 37 mM (h).

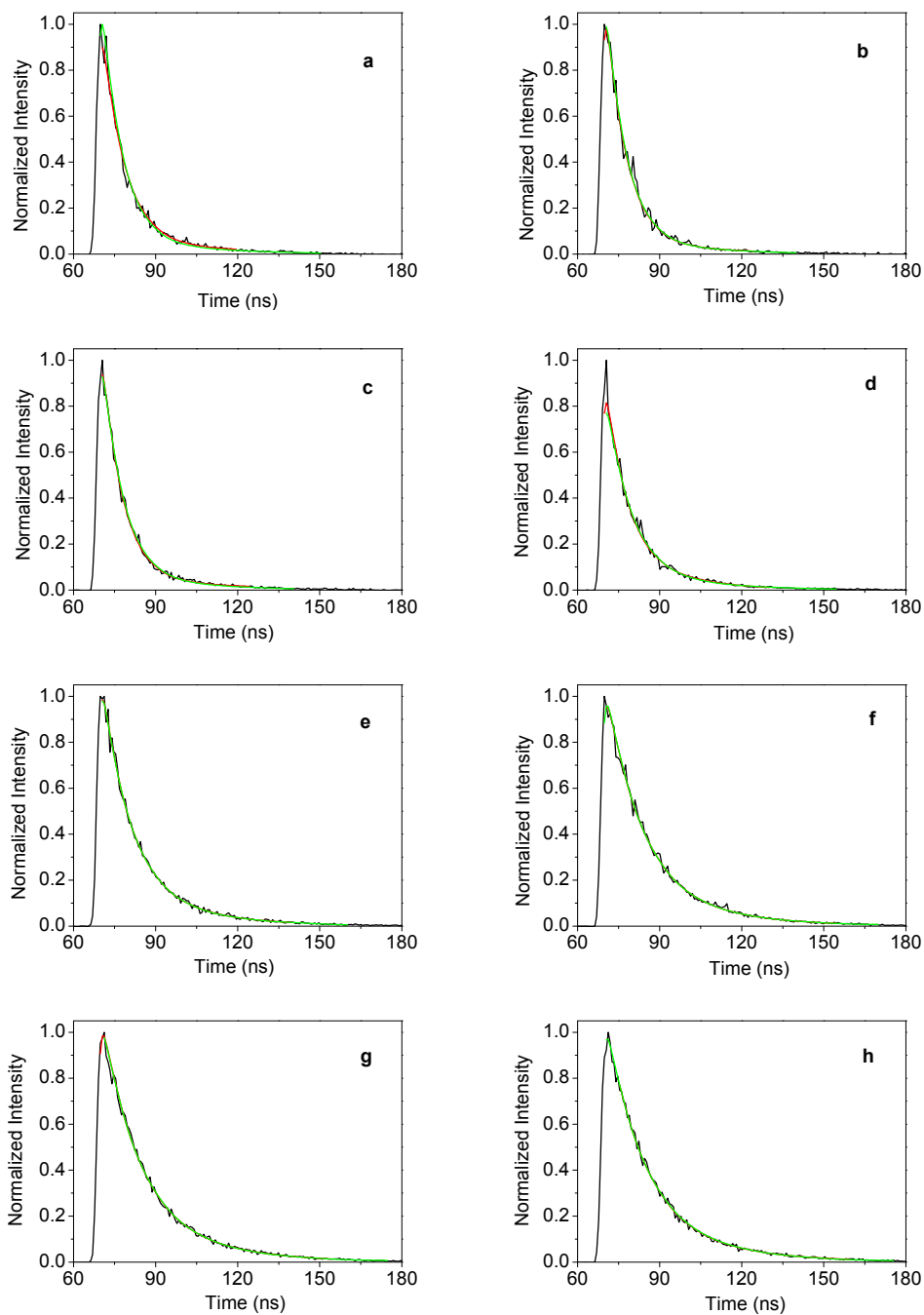


Figure S4. Decay curves of 7α -Dns-ChA with the corresponding monoexponential (red) and multiexponential fitting (green) obtained in the presence of different concentrations of sodium cholate: 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d), 11 (e), 20 (f), 23 (g) and 37 mM (h).

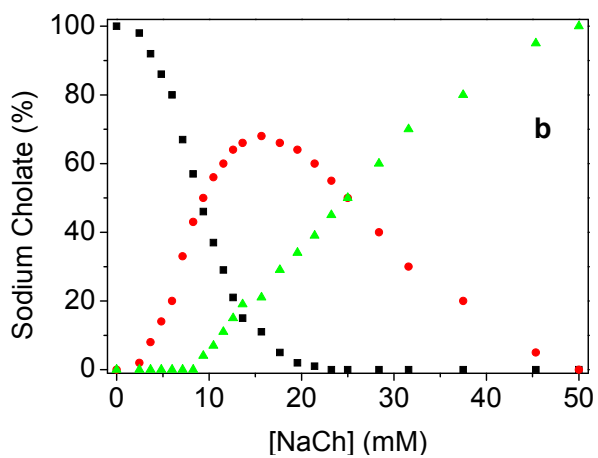
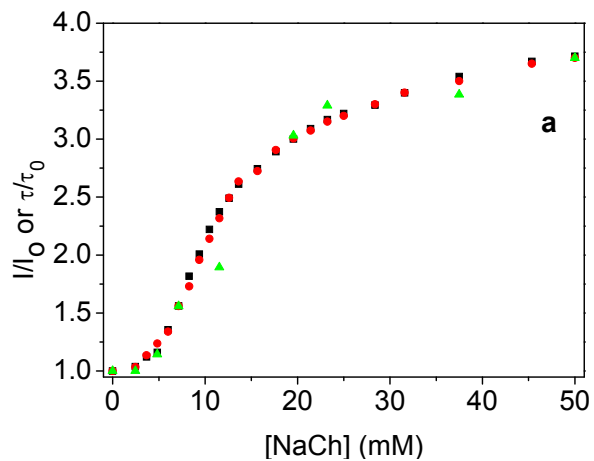


Figure S5. a) Changes in the relative emission intensities (I/I_0) (■) or lifetimes (τ/τ_0) (▲) vs. NaCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl and theoretical data obtained using equations 1 and 2 (●); **b)** Percentage of sodium cholate in solution (■), in primary (●) and secondary aggregates (▲).

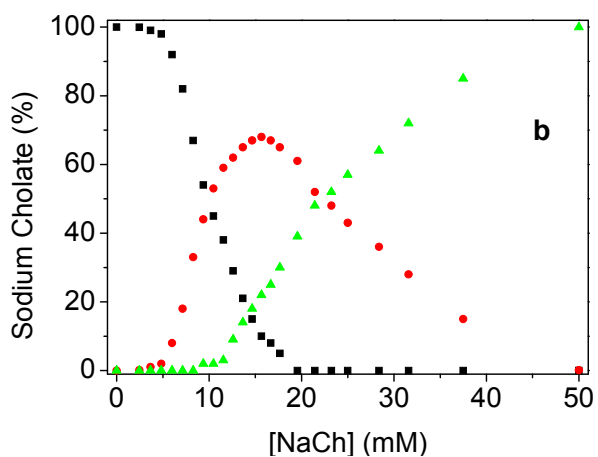
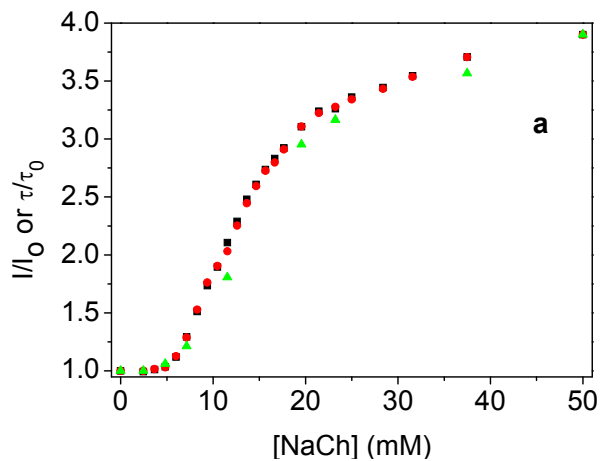


Figure S6. a) Changes in the relative emission intensities (I/I_0) (■) or lifetimes (τ/τ_0) (▲) vs. NaCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl and theoretical data obtained using equations 1 and 2 (●); **b)** Percentage of sodium cholate in solution (■), in primary (●) and secondary aggregates (▲).

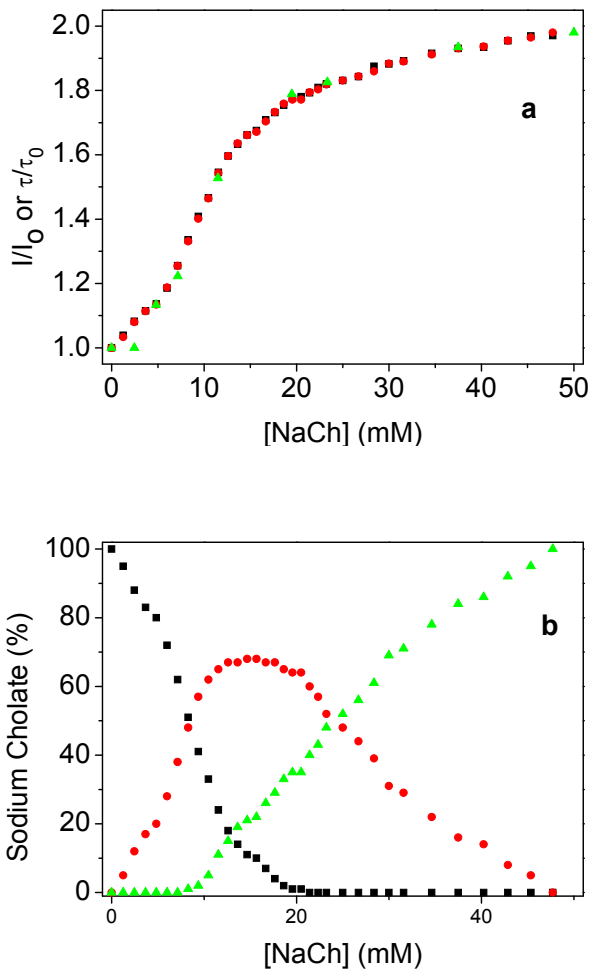


Figure S7. a) Changes in the relative emission intensities (I/I_0) (■) or lifetimes (τ/τ_0) (▲) vs. NaCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl and theoretical data obtained using equations 1 and 2 (●); **b)** Percentage of sodium cholate in solution (■), in primary (●) and secondary aggregates (▲).

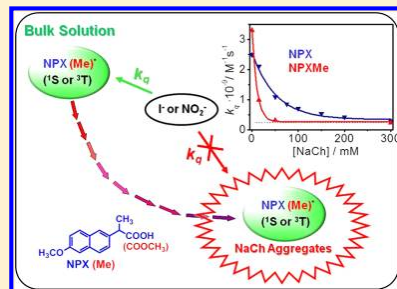
Photophysical Probes To Assess the Potential of Cholic Acid Aggregates as Drug Carriers

Miguel Gomez-Mendoza, Edurne Nuin, Inmaculada Andreu, M. Luisa Marin, and Miguel A. Miranda*

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de València, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The two enantiomers of the nonsteroidal antiinflammatory drug naproxen and of its methyl ester have been selected as representative probes with markedly different hydrophobicity to assess the potential of cholic acid aggregates as drug carriers by means of photophysical techniques. The different distribution of the probes between bulk solution and aggregates has been assessed by quenching of their singlet and triplet excited states by iodide and nitrite anions, respectively. This straightforward photophysical methodology can, in principle, be extended to a variety of drugs containing a photoactive chromophore.



INTRODUCTION

Bile acids are a family of natural amphiphilic steroids biosynthesized in the liver.^{1,2} Their concave α -face shows hydrophilic character, whereas their β -face is more hydrophobic. These properties result in the formation of aggregates in solution. Thus, at low concentrations, the interaction of bile salts by their hydrophobic β -faces leads to formation of primary aggregates, whereas at higher bile salt concentrations, further association between the primary aggregates gives rise to the secondary ones, in which in addition to hydrophobic sites, hydrophilic microenvironments can be found (Chart 1).³ Among their physiological functions, bile acid aggregates play an important role in the solubilization of lipids.¹ For this reason, they could, in principle, be used as carriers in the pharmaceutical application of poorly soluble drugs, extending their transport through the intestinal epithelium; however, very few examples of this concept have been reported: for instance, solubilization of β -blockers,^{4,5} benzodiazepines,^{5,6} or morphine.⁷

The drug-carrier interaction has been studied by different techniques, including microcalorimetry,⁴ spectrophotometry,⁶ ESR,⁵ or saturation transfer difference (STD) NMR experiments.⁷ Some of them are based on indirect measurements that make use of extra probes capable of inducing additional interactions, and others do not inform on the accessibility of the drugs inside the aggregates. Moreover, high drug concentrations may be required because of the low sensitivity of the employed techniques, thus limiting their applicability to highly hydrophilic compounds. Therefore, direct, reliable, and sensitive methodologies are still needed to study the interactions between drugs and bile salt aggregates. In this context, photophysical techniques, such as fluorescence or laser flash photolysis, have proven potential to investigate the

binding of different model guests (e.g., naphthalene derivatives) to cholic acid aggregates⁸ and provide information on the accessibility of guests' excited states to water-soluble quenchers.^{9,10} In addition, we have recently made use of the singlet excited state of probe molecules as a reporter to build up speciation diagrams for the different types of cholic acid aggregates (the most abundant bile acid in humans)¹¹ or as a sensitive tool to investigate stereodifferentiation in the quenching of different tryptophan derivatives inside the aggregates.¹²

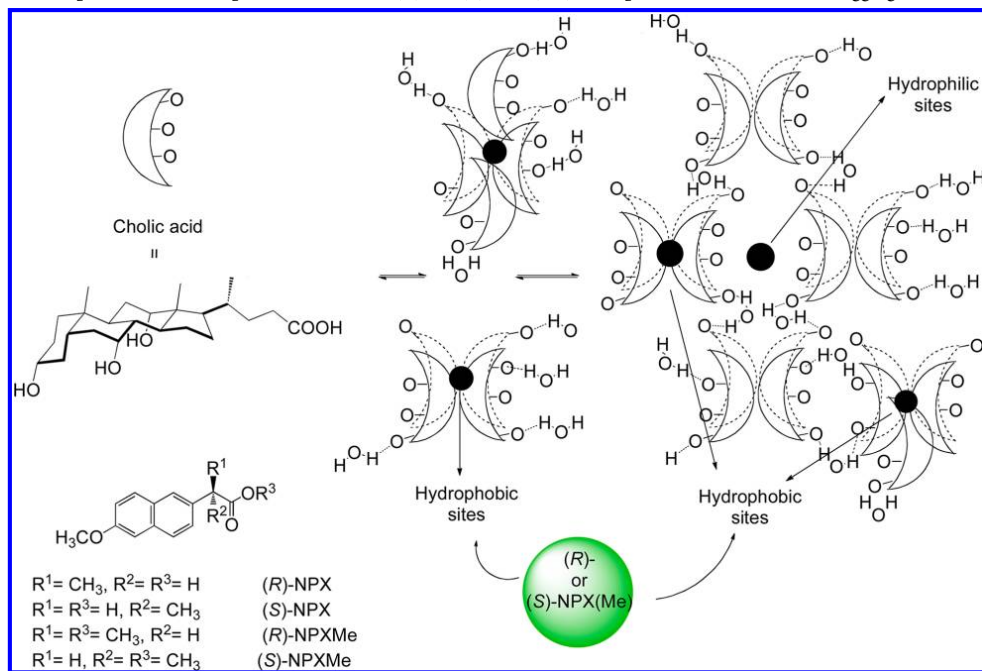
Naproxen (NPX) is widely used as a safe, tolerable, and highly effective nonsteroidal antiinflammatory drug. Because it contains a naphthalene chromophore, this drug is, in principle, a suitable probe that can be studied by means of photophysical techniques.^{13–18}

With this background, the goal of the present work is to use the free carboxylic acid and the methyl ester derivatives of naproxen in their two enantiomeric forms, (R)- or (S)-NPX and (R)- or (S)-NPXMe, as probes with markedly different hydrophilicity to assess the potential of sodium cholate (NaCh) aggregates as drug carriers by means of photophysical techniques (Chart 1). Quenching of the singlet and triplet excited states of NPX(Me) by I⁻ and NaNO₂, acting from the aqueous phase, has been investigated by means of steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy and also by laser flash photolysis. The obtained quenching constant values provide evidence for the extensive incorporation of the drugs

Received: May 15, 2012

Revised: August 9, 2012

Published: August 11, 2012

Chart 1. Representation of Naproxen Derivatives (*R*)- or (*S*)-NPX(Me) Incorporated into Cholic Acid Aggregates

into the hydrophobic binding sites of the aggregates if the appropriate concentration of bile acid is chosen.

EXPERIMENTAL METHODS

Chemicals. Sodium cholate (NaCh), (*R*)- and (*S*)-NPX, dimethylsulfoxide (DMSO), and NaCl with purity higher than 99% were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and were used without further purification. The methyl esters (*R*)- and (*S*)-NPXMe were synthesized as previously reported.¹⁹

Instrumentation. Absorption spectra were recorded on a Cary 300 UV–vis spectrophotometer (UV0811M209, Varian). Fluorescence spectra were obtained with a LP S-220B (Photon Technology International) equipped with a 75 W Xe lamp and were corrected with baseline control experiments to subtract the solvent Raman emission. Fluorescence lifetime measurements were based on a PTI (TM-2/2003) equipped with a H_2/N_2 (50/50, 1.5 ns pulse width) lamp and a stroboscopic detector. The laser flash photolysis (LFP) studies were carried out with a pulsed Nd:YAG LS2137 V LOTIS TII at the excitation wavelength of 266 nm. The single pulses were ~10 ns in duration, and the energy was lower than 20 mJ/pulse. The laser flash photolysis system consisted of the pulsed laser, a 77250 Oriol monochromator, and an oscilloscope DP04054 Tektronix. All the output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer.

Preparation of Sodium Cholate Aggregates. Solutions of NaCh at different concentrations were freshly obtained by dissolving the appropriate amount of the salt in 0.2 M NaCl. The concentration of NPX(Me) in the presence of NaCh was 60 μM , obtained from 5 mM DMSO stock solutions.

Quenching Experiments. The absorbance of the solutions for the fluorescence experiments was kept below 0.1 at the excitation wavelength ($\lambda_{\text{exc}} = 316$ nm). In a typical quenching experiment, the appropriate volumes of a freshly prepared NaI solution (2 M) were added to the NPX(Me) aerated solutions with the corresponding concentration of NaCh. For the LFP quenching experiments, the absorbance of the solutions was kept at ~0.3 at $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm. In a typical quenching experiment, the appropriate volumes of a freshly prepared NaNO_2 solution (250 mM) were added to the purged NPX(Me) solutions with the corresponding NaCh concentration. All the photophysical measurements were performed at room temperature in a quartz cell of 1.0 cm optical path length.

RESULTS AND DISCUSSION

The UV–vis spectra of (*R*)- or (*S*)-NPX and (*R*)- or (*S*)-NPXMe were recorded in 0.2 M aqueous NaCl in the presence of different concentrations of NaCh (up to 300 mM). The shape and position of the absorption bands were all coincident, with maxima at 262, 271, 316, and 332 nm. The emission spectra, both in solution and in the presence of the aggregates, showed a maximum at ~355 nm at $\lambda_{\text{exc}} = 316$ nm (Figures S1 and S2 of the Supporting Information). Fluorescence quantum yields (ϕ_{F}) were determined in air-equilibrated solutions, in the presence and in the absence of the aggregates, using (*S*)-NPX in deaerated acetonitrile as standard ($\phi_{\text{F}} = 0.47$).²⁰ Only a small increase in the ϕ_{F} values was observed upon incorporation into the aggregates (from 0.39 to 0.41). Likewise, the lifetimes of the singlet excited states (τ_{S}) increased from 10 ns in aqueous solution to 12 or 15 ns for NPX or NPXMe, respectively, within the aggregates. Therefore, these differences were not

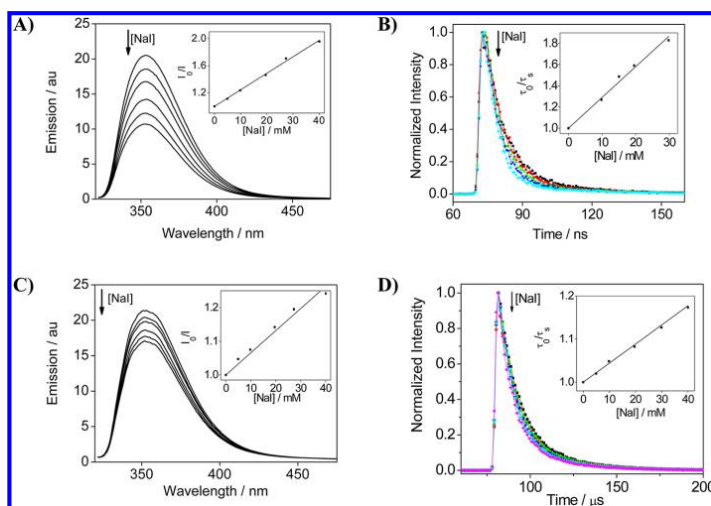


Figure 1. Changes in the emission spectra or emission decay traces of (*R*)-NPX upon addition of increasing concentrations of NaI recorded in 0.2 M aqueous NaCl at different NaCh concentrations: (A and B) 0 mM and (C and D) 200 mM. Insets: corresponding Stern–Volmer plots.

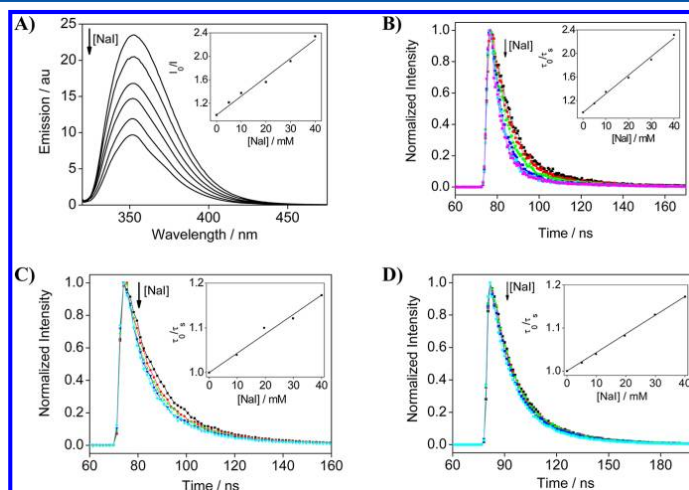


Figure 2. Changes in the emission spectra or emission decay traces of (*R*)-NPXMe upon addition of increasing concentrations of NaI recorded in 0.2 M aqueous NaCl at different NaCh concentrations: (A and B) 2 mM, (C) 50 mM, and (D) 200 mM. Insets: corresponding Stern–Volmer plots.

large enough to evaluate the incorporation of NPX(Me) into the hydrophobic sites of the primary/secondary aggregates in a reliable way.

To investigate the extent of binding (at NaCh concentrations up to 300 mM), quenching experiments using an ionic salt (NaI) that mainly remains in water were performed by means of steady-state and time-resolved emission spectroscopy. The dynamic quenching efficiency can be interpreted as a measure of the probe accessibility to the quencher.

In fact, the emission of NPX was quenched by increasing concentrations of iodide with no changes in the position of the maxima. Figure 1A and C shows the fluorescence spectra for the case of (*R*)-NPX, as a representative example, upon

addition of increasing concentrations of NaI and recorded in 0.2 M aqueous solution of NaCl and in the presence of 200 mM NaCh, respectively. The corresponding changes in the emission decay traces are shown in Figure 1B and D, indicating that the quenching is, indeed, dynamic. A gradual decrease in the quenching rate constants was observed from solution to 300 mM NaCh for both enantiomers. Parallel experiments were performed on the corresponding methyl esters (Figures 2A–D); again, dynamic quenching by iodide was observed (see Figures S3–S10 and Table 1, Supporting Information).

Overall, the extent of emission quenching by iodide decreased with increasing affinity of the drug to the hydrophobic sites of the aggregates. Interestingly, when the

apparent quenching rate constants (k_q^s) were plotted against NaCh concentration, a sharp decrease was found for the methyl esters NPXMe, whereas a much more gradual decrease was observed for the free carboxylic acids NPX (Figure 3). Thus, a

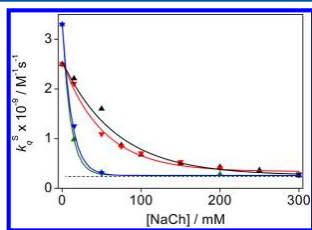


Figure 3. Plot of the fluorescence quenching rate constants (k_q^s , $M^{-1} s^{-1}$) by iodide for (R)-NPX (\blacktriangle), (S)-NPX (red inverted triangle), (R)-NPXMe (green triangle), and (S)-NPXMe (blue inverted triangle) versus concentration of NaCh in aerated 0.2 M aqueous NaCl solutions.

very efficient quenching occurred for NPX(Me) at 2 mM NaCh ($3.3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$), whereas in the presence of 50 mM NaCh, this value dropped to $2.9\text{--}3.2 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$, indicating that NPXMe is mainly incorporated into the hydrophobic sites of the aggregates at this concentration. In the case of (R)- or (S)-NPX, the quenching constant values varied from $2.4 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ in solution to $2.6\text{--}2.9 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ at 300 mM NaCh. A decrease in the quenching constant of 1 order of magnitude has already been observed in the literature for fluorescent probes such as naphthalene or pyrene.⁹ Taking into account that at $[NaCh] \geq 50$ mM, more than 95% of cholic acid is forming secondary aggregates,¹¹ the observed trends for the acids and their methyl esters can be interpreted on the basis of their different partition between the bulk solution and the hydrophobic sites of the hosts provided by the primary/secondary aggregates.

In a different, yet complementary approach, laser flash photolysis experiments were performed on NPX(Me) in solution and at different NaCh concentrations, up to 200 mM (see Figure 4 for the case of (S)-NPX as a representative example). The transient absorption spectra within the aggregates displayed the main band at 440 nm, characteristic of the triplet–triplet absorption in solution (Figure 4A).²¹ Interestingly, a significant increase in the triplet lifetime was observed at high NaCh concentration, which was associated with the incorporation of the drug into the aggregates (Figure

4B). In all cases, the decays of the triplet guests in the presence and the absence of bile salts were fitted to a monoexponential function.

When the triplet lifetimes were measured in the presence of $NaNO_2$, a clear quenching was observed, in agreement with the results obtained with time-resolved fluorescence. Again, the apparent rate constants for triplet quenching (k_q^T) by nitrite reflected not only the actual quenching constant but also the percentage of NPX(Me) remaining in solution. They were strongly dependent on the concentration of NaCh, ranging from $1.5 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ for (R)- or (S)-NPX in solution and $2.3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ for (R)- or (S)-NPXMe at 2 mM NaCh to $\sim 2.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ for the corresponding values within the hydrophobic sites of the aggregates (Figure 5). In general, quenching plots were linear; however, at 15 mM NaCh concentration, Stern–Volmer plots for (R)- or (S)-NPXMe were curved. This can be attributed to the mobility of the triplet excited state of the guest between the host and the bulk aqueous phase, and therefore, data were analyzed by means of the previously reported model.^{8,22} Thus, the k_q^T values obtained by applying this model were slightly lower ($2.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ and $1.9 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ for (S)-NPXMe and (R)-NPXMe, respectively) than those determined directly by the Stern–Volmer relationships (Table 2, Supporting Information). Interestingly, the curved plots were found only for the more hydrophobic guest at intermediate NaCh concentrations, where comparable amounts of free and bound guest coexist.

In accordance with the results obtained for quenching of the singlet excited state, a sharper decrease in the k_q^T values was observed for the more hydrophobic NPXMe with increasing NaCh concentration until reaching a plateau ($[NaCh] \sim 50$ mM) (Figure 6). This indicates a high affinity to the protected hydrophobic environments provided by the aggregates. Conversely, the k_q^T decrease for NPX was more gradual, as anticipated from the higher hydrophilic character of the free acid, which results in a less efficient protection by the aggregates.

CONCLUSIONS

In conclusion, photophysical techniques have been demonstrated to be direct, sensitive, and straightforward methodologies to assess the potential of bile acid aggregates as drug carriers. This concept has been proven using (R)- or (S)-NPX and (R)- or (S)-NPXMe as representative probes with different hydrophobicities and can, in principle, be extended to other drugs containing photoactive chromophores. Quenching of singlet and triplet excited states using ionic salts mainly residing

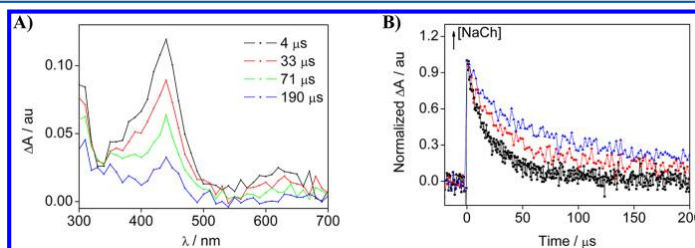


Figure 4. (A) Transient absorption spectra for (S)-NPX after laser flash excitation ($\lambda_{exc} = 266$ nm), obtained in deaerated aqueous 0.2 M NaCl solution of 200 mM NaCh. (B) Normalized decay traces monitored at 420 nm in the presence of different NaCh concentrations: (\blacksquare) 0, (red dot) 100, (blue triangle) 200 mM.

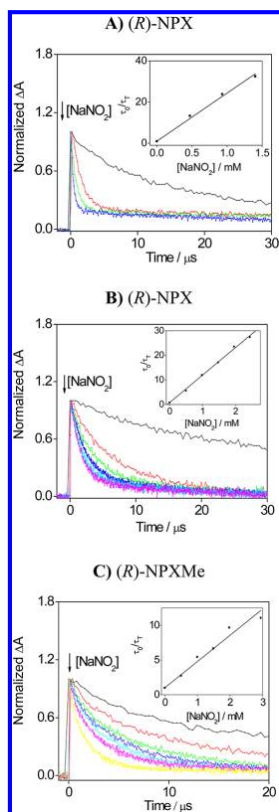


Figure 5. Changes in the triplet lifetime of (R)-NPX(Me) in deaerated 0.2 M aqueous NaCl, recorded at 440 nm, upon addition of increasing amounts of NaNO₂ at different NaCh concentrations: (A) 0 mM and (B and C) 200 mM. Insets: corresponding Stern–Volmer plots. In all cases, the triplet decays were fitted to a monoexponential function, with R² values higher than 0.98.

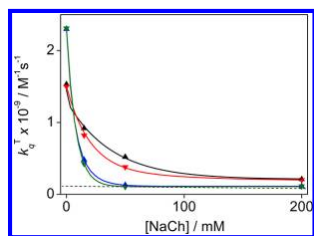


Figure 6. Plot of the triplet quenching rate constants (k_q^T , M⁻¹ s⁻¹) by sodium nitrite for (R)-NPX (▲), (S)-NPX (red inverted triangle), (R)-NPXMe (blue triangle), and (S)-NPXMe (green inverted triangle) versus increasing concentrations of NaCh in deaerated 0.2 M aqueous NaCl solutions.

in the aqueous phase has provided evidence for the different distribution of the free carboxylic acids and their esters between the bulk solution and the aggregates. Interestingly, it has been demonstrated that even hydrophilic drugs can be substantially

incorporated into the aggregates if the appropriate concentrations of bile salts are chosen. Current work is directed at investigating whether the NaCh based systems, in addition to being appropriate as drug carriers, may be developed into drug delivery systems, which requires controlled release of the active compounds at the specific targets responsible for the pharmacological action.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Figure S1: absorption spectra. Figures S2–S10: emission spectra and results of quenching experiments. Figures S11–S14: results of triplet quenching experiments. Tables 1 and 2: rate constants for singlet and triplet quenching by iodide and nitrite, respectively. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax: (+34)963879444. E-mail: mmiranda@qim.upv.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge financial support from the Generalitat Valenciana (GV/2009/104 and Prometeo Program 2008/090), the Spanish Government (Red RETICS de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF)), CTQ2009-13699 and Predoctoral FPU fellowship AP2008-03295 for M. G.-M.).

■ REFERENCES

- Hofmann, A. F. *Arch. Intern. Med.* **1999**, *159*, 2647–2658.
- Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461–2483.
- Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *176*, 178–189.
- Grosvenor, M. P.; Lofroth, J. E. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 682–686.
- Reis, S.; Moutinho, C. G.; Pereira, E.; de Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 62–69.
- de Castro, B.; Gameiro, P.; Guimaraes, C.; Lima, J.; Reis, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 595–602.
- Posa, M.; Csanadi, J.; Kover, K. E.; Guzsvany, V.; Batta, G. *Colloids Surf. B* **2012**, *94*, 317–323.
- Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 1140–1151.
- Ju, C.; Bohne, C. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 60–67.
- Ju, C.; Bohne, C. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3847–3854.
- Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 782–785.
- Cuquerella, M. C.; Rohacova, J.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4965–4967.
- Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *104*, 119–121.
- Perez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4460–4468.
- Vaya, I.; Perez-Ruiz, R.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *486*, 147–153.
- Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158–1164.
- Costanzo, L. L.; De Guidi, G.; Condorelli, G.; Cambria, A.; Fama, M. *J. Photochem. Photobiol., B* **1989**, *3*, 223–235.
- Partyka, M.; Au, B. H.; Evans, C. H. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *140*, 67–74.

(19) Tsai, S. W.; Huang, C. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 682–688.

(20) Murov, S. L. C., I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.

(21) Bosca, F.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 637–655.

(22) Pace, T. C. S.; Bohne, C. Application of Photophysics to the Study of Supramolecular Dynamics. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 3rd ed.; Griesbeck, A., Oelgemöller, M., Ghetti, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2012; Vol. 2, pp 981–1001.

Supporting Information

Photophysical Probes to Assess the Potential of Cholic Acid Aggregates as Drug Carriers

Miguel Gomez-Mendoza, Edurne Nuin, Inmaculada Andreu, M. Luisa Marin and Miguel A. Miranda*

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia. Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. Spain

	<u>Page</u>
1. Figures S1 a-b	S2
2. Figures S2 a-b	S3
3. Figures S3 a-i	S4, S5
4. Figures S4 a-d	S5
5. Figures S5 a-h	S6
6. Figures S6 a-d	S7
7. Figures S7 a-e	S8
8. Figures S8 a-d	S9
9. Figures S9 a-d	S10
10. Figures S10 a-d	S11
11. Figures S11 a-d	S12
12. Figures S12 a-c	S13
13. Figures S13 a-d	S14
14. Figures S14 a-c	S15
15. Photograph of fluorescence quenching by iodide	S16
16. Table of rate constants for fluorescence quenching by iodide	S17
17. Table of rate constants for triplet quenching by nitrite	S18

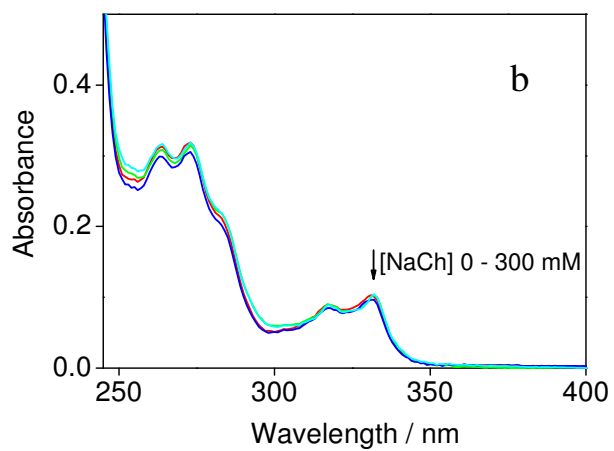
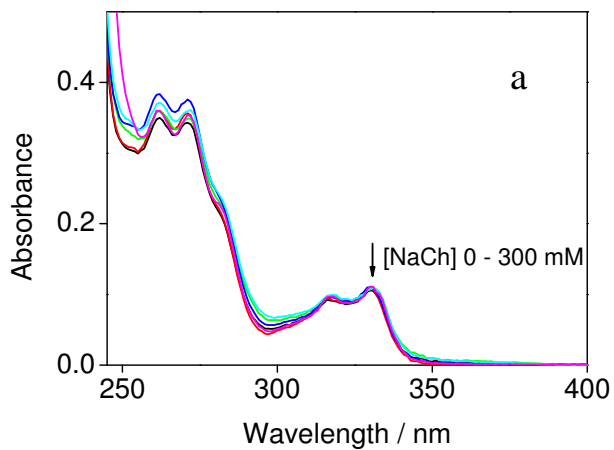


Figure S1. Absorption spectra of 60 μM solutions of (a) (R)- or (S)-NPX and (b) (R)- or (S)-NPXMe upon addition of increasing concentrations of sodium cholate in 0.2 M aqueous NaCl.

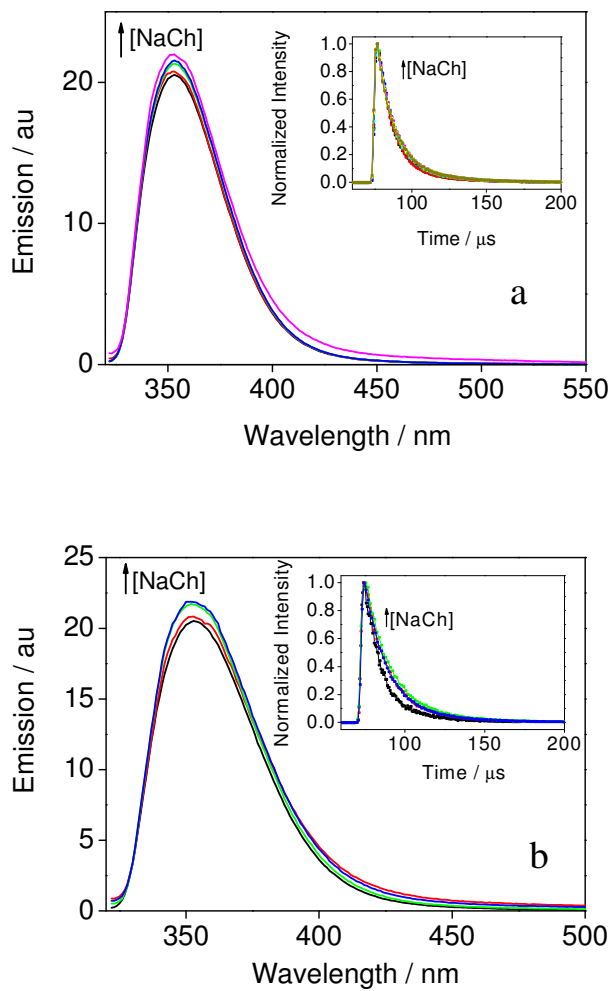
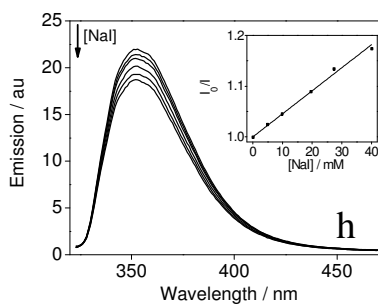
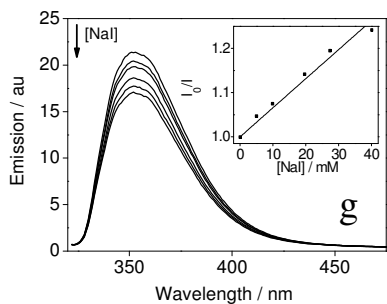
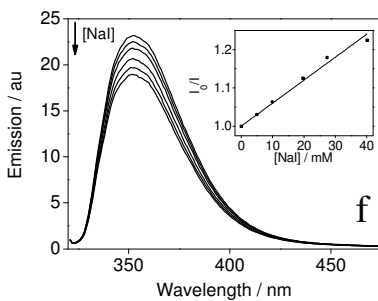
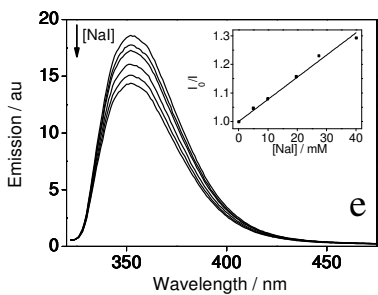
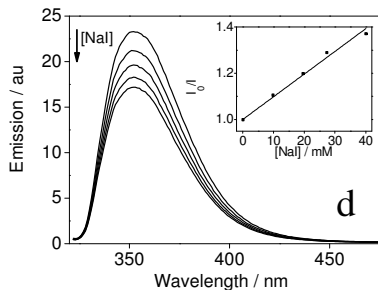
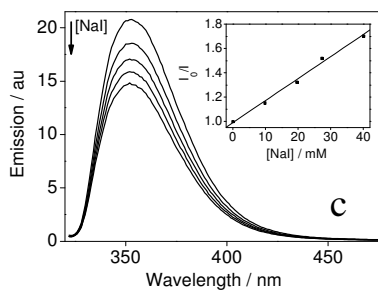
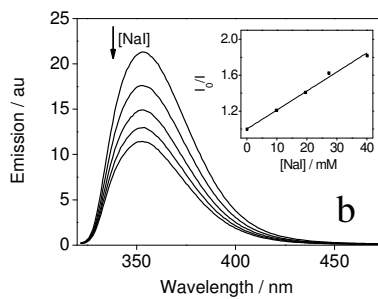
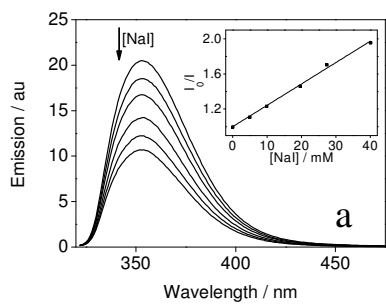


Figure S2. Emission spectra of (a) (R)- or (S)-NPX and (b) (R)- or (S)-NPX-Me vs. NaCh concentration up to 300 mM in 0.2 M aqueous NaCl. Insets: changes in the corresponding emission decay traces.



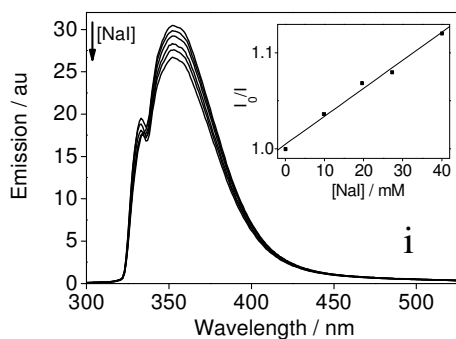


Figure S3. Emission spectra of (*R*)-NPX upon addition of increasing concentrations of NaI recorded in 0.2 M aqueous NaCl at different NaCh concentrations: (a) 0 mM; (b) 15 mM; (c) 50 mM; (d) 75 mM; (e) 100 mM; (f) 150 mM; (g) 200 mM; (h) 250 mM and (i) 300 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

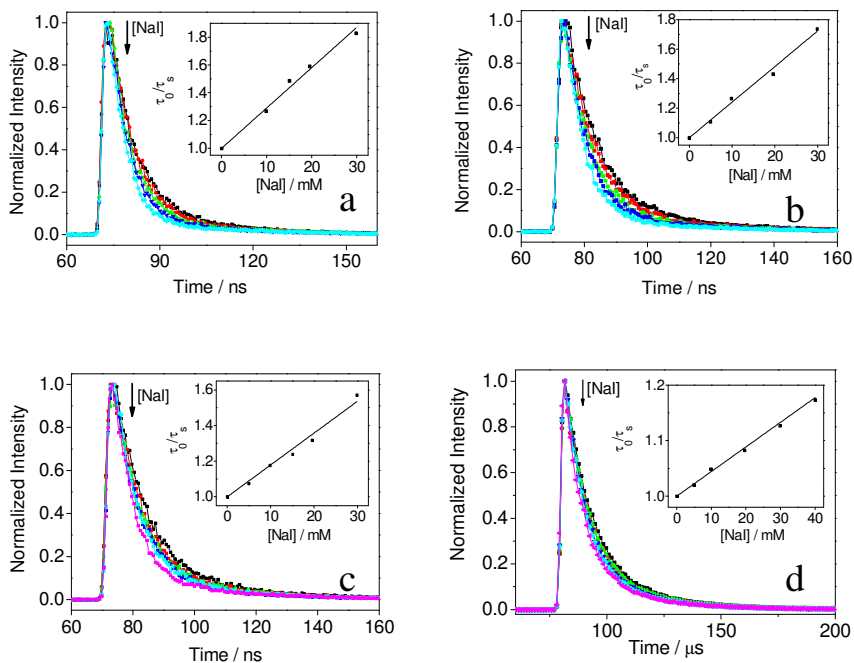


Figure S4. Changes in the emission decay traces of (*R*)-NPX in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCh concentrations: (a) 0 mM; (b) 15 mM; (c) 50 mM and (d) 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

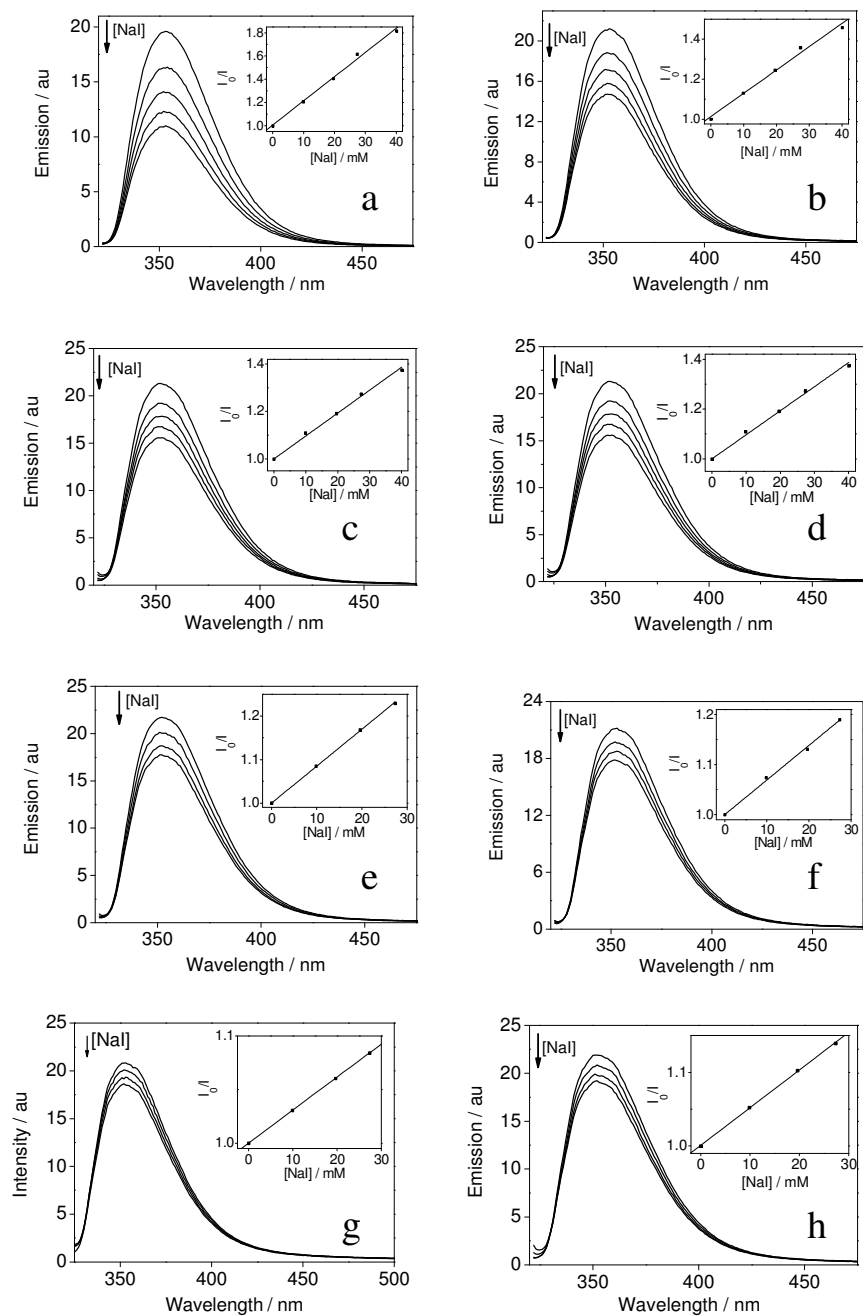


Figure S5. Emission spectra of (*S*)-NPX upon addition of increasing concentrations of NaI recorded in 0.2 M aqueous NaCl at different NaCh concentrations: **(a)** 0 mM; **(b)** 15 mM; **(c)** 50 mM; **(d)** 75 mM; **(e)** 100 mM; **(f)** 150 mM; **(g)** 200 mM and **(h)** 300 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

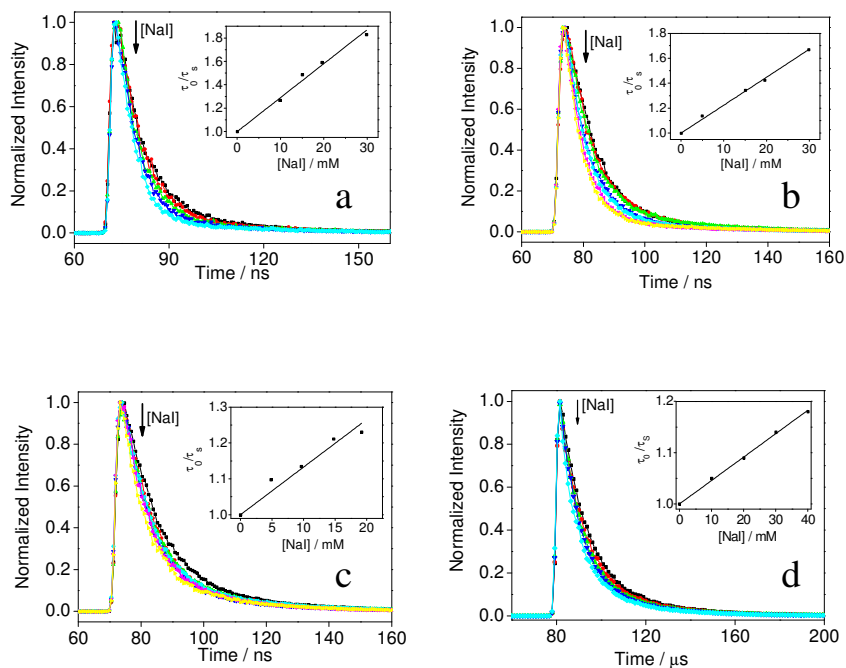


Figure S6. Changes in the emission decay traces of (*S*)-NPX in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCh concentrations: **(a)** 0 mM; **(b)** 15 mM; **(c)** 50 mM and **(d)** 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

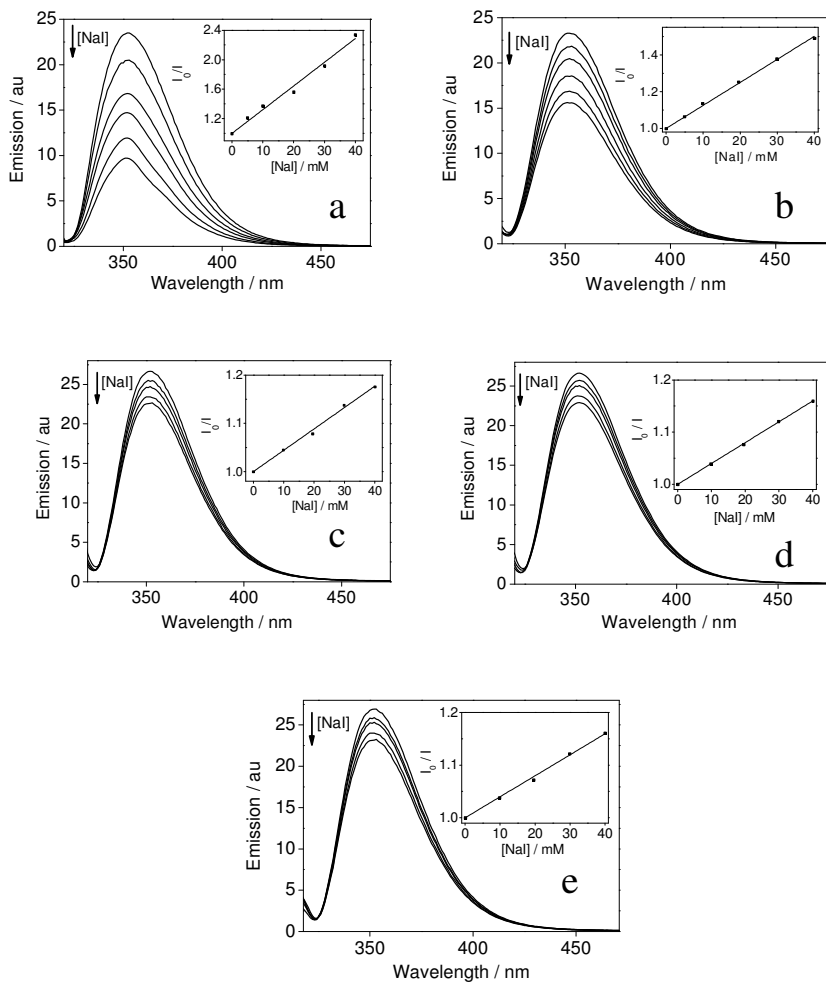


Figure S7. Emission spectra of (*R*)-NPXMe in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCh concentrations: (a) 2 mM; (b) 15 mM and (c) 50 mM; (d) 200 mM and (e) 300 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

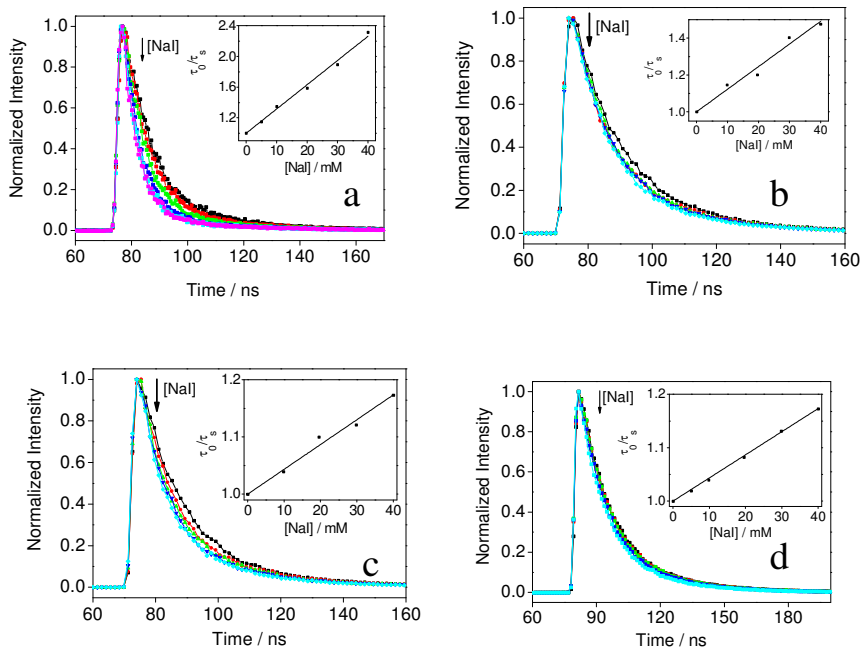


Figure S8. Changes in the emission decay traces of (*R*)-NPXMe in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCh concentrations: **(a)** 2 mM; **(b)** 15 mM; **(c)** 50 mM and **(d)** 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

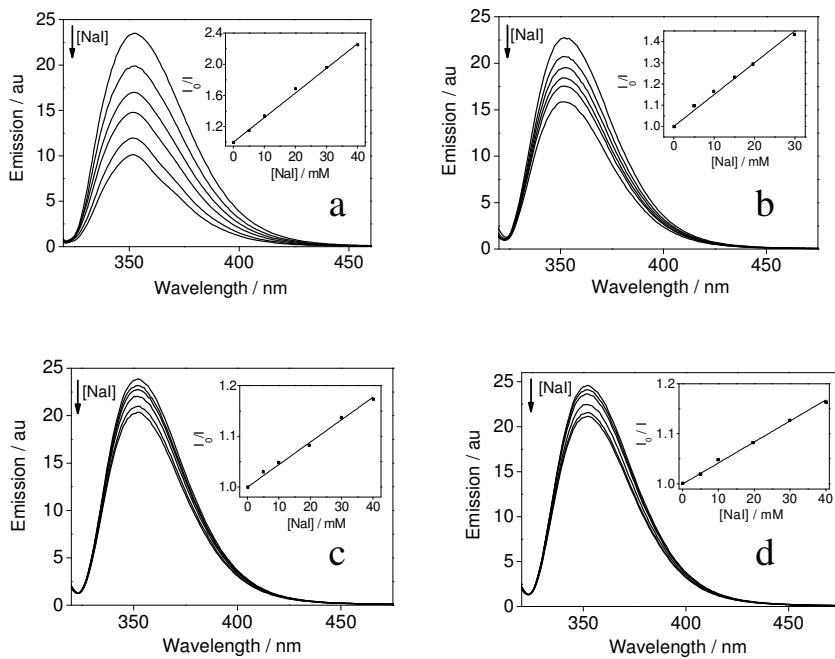


Figure S9. Emission spectra of (S)-NPXMe in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCh concentrations: **(a)** 2 mM; **(b)** 15 mM; **(c)** 50 mM and **(d)** 300 mM . Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

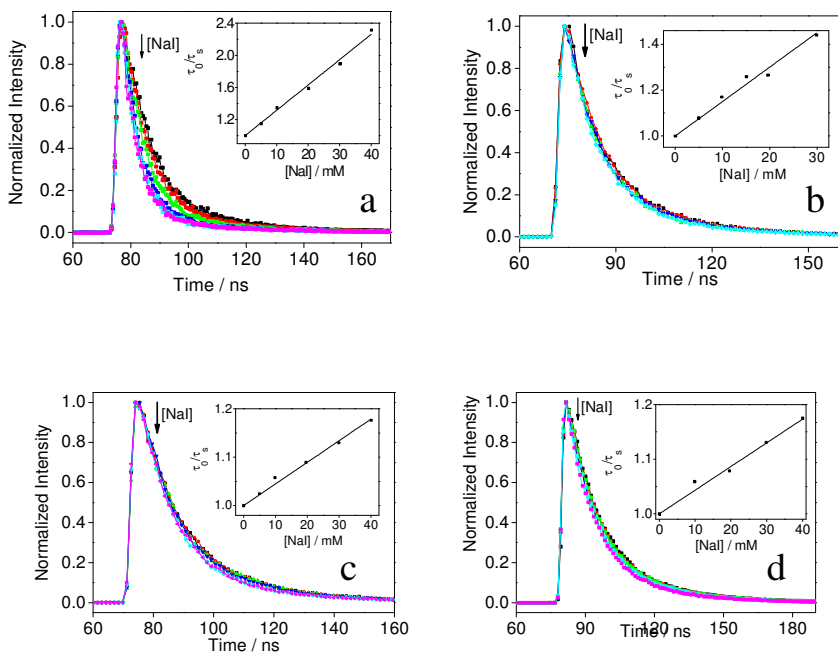


Figure S10. Changes in the emission decay traces of (S)-NPXMe in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaI at different NaCl concentrations: (a) 2 mM; (b) 15 mM; (c) 50 mM and (d) 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots.

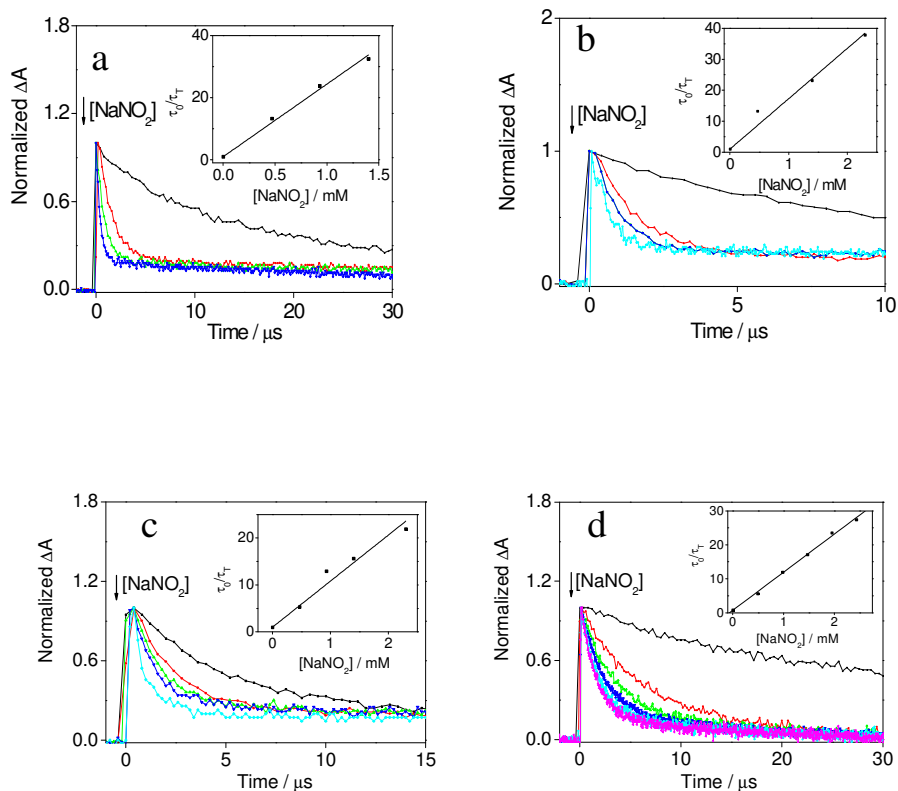


Figure S11. Changes in the triplet lifetime of (*R*)-NPX in deaerated 0.2 M aqueous NaCl, recorded at 440 nm upon addition of increasing volumes of NaNO_2 at different NaCh concentrations: (a) 0 mM; (b) 15 mM; (c) 50 mM and (d) 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots. In all cases, the triplet decays were fitted to a mono-exponential function, with R^2 values higher than 0.98.

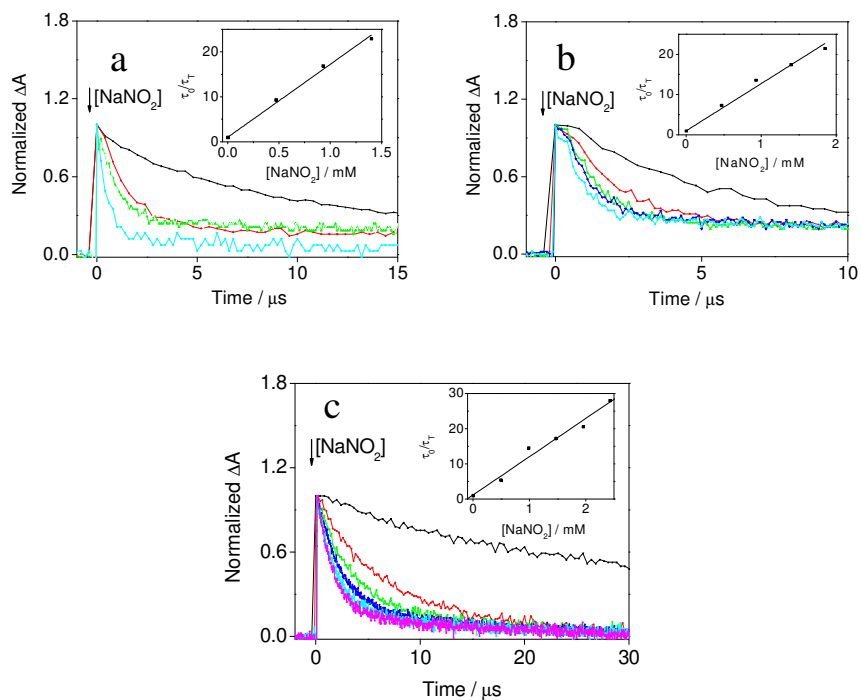


Figure S12. Changes in the triplet lifetime of (S)-NPX in deaerated 0.2 M aqueous NaCl, recorded at 440 nm upon addition of increasing volumes of NaNO_2 at different NaCh concentrations: **(a)** 15 mM; **(b)** 50 mM and **(c)** 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots. In all cases, the triplet decays were fitted to a mono-exponential function, with R^2 values higher than 0.98.

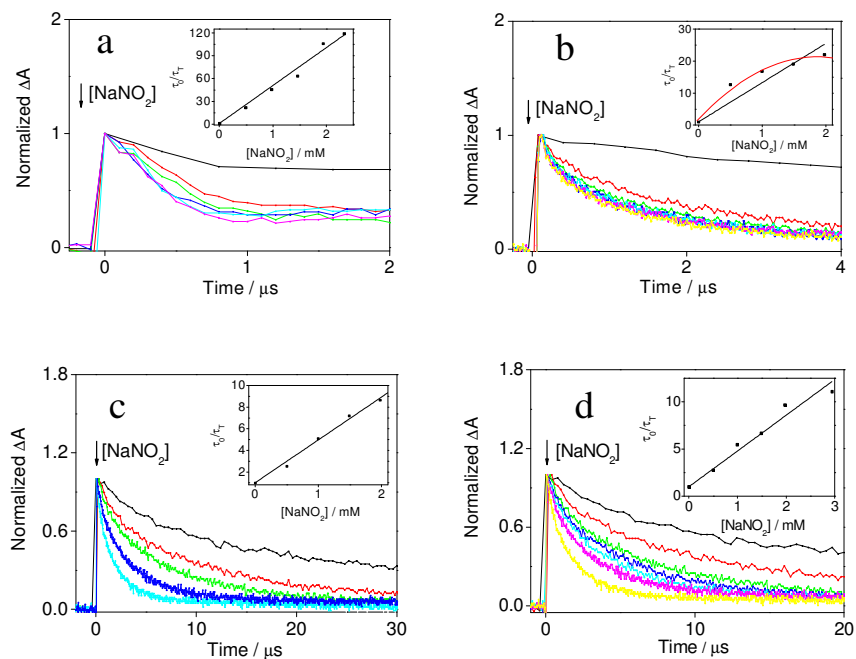


Figure S13. Changes in the triplet decay traces of (R) -NPXMe in deaerated 0.2 M aqueous NaCl, recorded at 440 nm upon addition of increasing concentrations of NaNO_2 at different NaCh concentrations: **(a)** 2 mM; **(b)** 15 mM; **(c)** 50 mM and **(d)** 200 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots; in the case of **(b)**, in addition to the linear fitting (black), the curved plot was fitted to eqn. (2) of page S18 (red). In all cases, the triplet decays were fitted to a mono-exponential function, with R^2 values higher than 0.98.

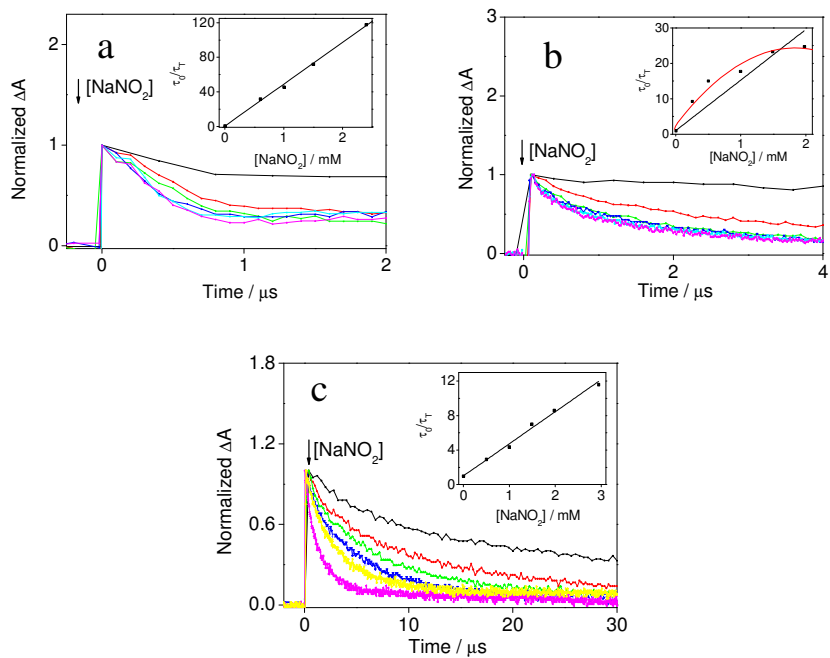


Figure S14. Changes in the triplet decay traces of (*S*)-NPXMe in deaerated 0.2 M aqueous NaCl, recorded at 440 nm upon addition of increasing concentrations of NaNO₂ at different NaCh concentrations: **(a)** 2 mM, **(b)** 15 mM and **(c)** 50 mM. Insets: corresponding Stern-Volmer plots; in the case of **(b)**, in addition to the linear fitting (black), the curved plot was fitted to eqn. (2) of page S18 (red). In all cases, the triplet decays were fitted to a mono-exponential function, with R² values higher than 0.98.

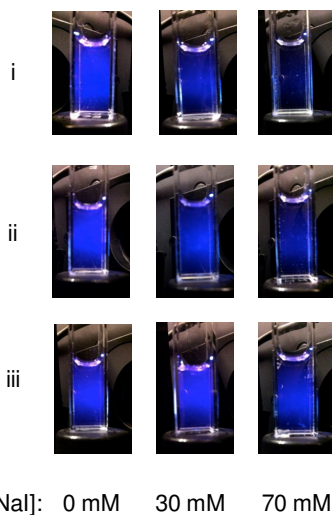


Figure S15. Fluorescence quenching by iodide for (i) (*S*)-NPX in 0.2 M aqueous NaCl solution; (ii) same as (i) in the presence of 50 mM NaCh and (iii) (*S*)-NPXMe in 0.2 M aqueous NaCl solution and in the presence of 50 mM NaCh.

Table 1. Rate constants for fluorescence quenching by iodide.

$k_q^S / 10^9 (M^{-1}s^{-1})^a$												
[NaCh] / mM	(S)-NPX			(R)-NPX			(S)-NPXMe			(R)-NPXMe		
	Steady-State	Time-Resolved	% Bound ^b	Steady-State	Time-Resolved	% Bound ^b	Steady-State	Time-Resolved	% Bound ^b	Steady-State	Time-Resolved	% Bound ^b
0	2.40 ± 0.04	2.90 ± 0.09	0	2.40 ± 0.04	2.90 ± 0.09	0	4.43 ^c	--	0	4.43 ^c	--	0
2	--	--	--	--	--	--	3.30 ± 0.11	3.30 ± 0.08	27	3.30 ± 0.11	3.30 ± 0.08	27
15	2.10 ± 0.05	2.00 ± 0.04	14	2.20 ± 0.05	2.40 ± 0.07	9	1.25 ± 0.03	1.20 ± 0.04	77	0.98 ± 0.01	0.97 ± 0.04	83
50	1.09 ± 0.03	1.10 ± 0.07	62	1.60 ± 0.04	1.60 ± 0.06	37	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.04	99	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	99
75	0.87 ± 0.02	--	73	0.87 ± 0.03	--	71	--	--	--	--	--	--
100	0.71 ± 0.01	--	80	0.67 ± 0.02	--	81	--	--	--	--	--	--
150	0.53 ± 0.01	--	89	0.50 ± 0.02	--	89	--	--	--	--	--	--
200	0.41 ± 0.01	0.38 ± 0.01	94	0.43 ± 0.03	0.38 ± 0.01	92	--	0.32 ± 0.01	--	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.04	100
250	--	--	--	0.37 ± 0.01	--	95	--	--	--	--	--	--
300	0.29 ± 0.01	--	100	0.26 ± 0.01	--	100	0.27 ± 0.01	--	100	0.27 ± 0.01	--	100

^a The experiments were performed twice and the errors correspond to average deviations.

^b Percentage of bound drug (100X) estimated as:

$$k_q^S = X \cdot k_q^S(\text{at } 300 \text{ mM NaCh}) + (1 - X) \cdot k_q^S(\text{at } 0 \text{ mM NaCh}) \quad (1)$$

^c Extrapolated.

Table 2. Rate constants for triplet quenching by nitrite.

$k_q^T / 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$				
[NaCh] / mM	(S)-NPX	(R)-NPX	(S)-NPXMe	(R)-NPXMe
0	1.50 ± 0.03	1.50 ± 0.03	--	--
2	--	--	2.30 ± 0.10	2.30 ± 0.08
15	0.82 ± 0.02	0.92 ± 0.04	0.42 ± 0.05 *	0.48 ± 0.05 *
50	0.38 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
200	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	--	0.21 ± 0.01

^aThe experiments were performed twice and the errors correspond to average deviations.

* At this NaCh concentration, quenching plots were curved. Hence, the data were also analyzed using the model previously described in the literature⁸, using eqn. 2:

$$k_{obs} = k_0^{BSa} + k_{dis} + k_q^{BSa}[Q] - \frac{k_{dis}k_{as} \frac{[NaCh]}{N}}{k_{as} \frac{[NaCh]}{N} + k_0 + k_q[Q]} \quad (2)$$

where k_0 and k_0^{BSa} are the decay rate constants in the absence of quencher of the guest in solution and in the presence of bile salt aggregate, respectively, k_q and k_q^{BSa} are the quenching rate constants for the triplet excited state in solution and when bound to the bile salt aggregate, respectively, k_{as} and k_{dis} are the association and dissociation rate constants of the triplet guest with the host, and $[NaCh]/N$ corresponds to the concentration of binding sites in the aggregate, being $[NaCh]$ the bile salt monomer concentration and N the aggregation number.

Applying the above model in the cases where quenching plots are curved, the rate constants determined for triplet quenching by nitrite were 0.20 ± 0.02 and $0.19 \pm 0.01 \times 10^9 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1})$ for (S)-NPXMe and (R)-NPXMe, respectively.

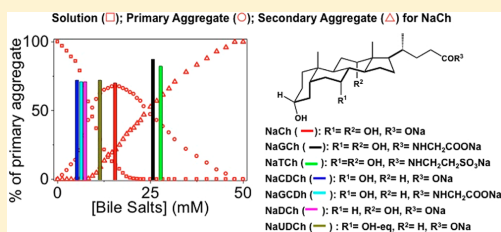
Dansyl-Labeled Cholic Acid as a Tool To Build Speciation Diagrams for the Aggregation of Bile Acids

Miguel Gomez-Mendoza, M. Luisa Marin,* and Miguel A. Miranda*

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de València, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Bile acids (BAs) are a family of natural steroids biosynthesized from cholesterol in the liver that tend to form aggregates in solution. A fluorescent derivative of cholic acid, namely 3 α -Dns-ChA, was employed as a reporter to establish the speciation diagrams of the most abundant BAs that can be found mainly in three microenvironments, solution, and primary and secondary aggregates. The developed methodology is based on the analysis of the combined steady-state and time-resolved experiments performed on 3 α -Dns-ChA whose emission behavior was found to be strongly medium dependent. In particular, speciation diagrams of sodium glycocholate (NaGCh), sodium taurocholate (NaTCh), sodium chenodeoxycholate (NaCDCh), sodium glycochenodeoxycholate (NaGCDCh), sodium deoxycholate (NaDCh), and sodium ursodeoxycholate (NaUDCh) were successfully built up.



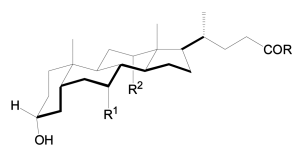
INTRODUCTION

Bile acids (BAs) are a family of natural steroids biosynthesized from cholesterol in the liver,¹ which play a key role in a number of physiological functions and are the major final products of cholesterol metabolism. Remarkably, they help lipid solubilization by forming mixed micelles and stimulate the biliary phospholipid secretion.^{2,3}

The chemical structure of BAs includes an unusual cis fusion between rings A and B, a different number of hydroxyl groups on the α -face and a short chain ending in a carboxylic moiety. All these characteristics make them amphiphilic entities, with a hydrophilic α -face and a hydrophobic β -face, which results in a tendency to aggregate in solution. Natural BAs are divided into primary (cholic and chenodeoxycholic acid) directly biosynthesized from cholesterol and frequently found conjugated to glycine and taurine, and secondary (deoxycholic and lithocholic acids) obtained from the corresponding primary BAs after deconjugation of the amino acid and dehydroxylation at position C-7. Ursodeoxycholic acid is the C-7 epimer of chenodeoxycholic acid; it is found as a natural product in humans, at low concentrations, but it is used as an effective anticholestatic drug.^{1,4–7} The structures of the corresponding bile salts (BSs) are shown in Chart 1.

The most widely accepted aggregation model postulates the formation of primary aggregates by interaction of the β -faces of few monomers (up to 10) at low BA concentrations, which agglomerate as the concentration increases, giving rise to secondary aggregates.⁸ However, how the number of hydroxyl groups or the conjugation to glycine or taurine influences the aggregation behavior of the different BAs is not yet fully investigated. Moreover, the distribution of primary/secondary

Chart 1. Chemical Structures of Primary and Secondary Bile Salts



- Sodium Cholate (NaCh): R¹= R²= OH, R³= ONa
Sodium Glycocholate (NaGCh): R¹= R²= OH, R³= NHCH₂COONa
Sodium Taurocholate (NaTCh): R¹= R²= OH, R³= NHCH₂CH₂SO₃Na
Sodium Chenodeoxycholate (NaCDCh): R¹= OH, R²= H, R³= ONa
Sodium Glycochenodeoxycholate (NaGCDCh): R¹= OH, R²= H, R³= NHCH₂COONa
Sodium Taurochenodeoxycholate (NaTCDCCh): R¹= OH, R²= H, R³= NHCH₂CH₂SO₃Na
Sodium Deoxycholate (NaDCh): R¹= H, R²= OH, R³= ONa
Sodium Lithocholate (NaLCh): R¹= R²= H, R³= ONa
Sodium Ursodeoxycholate (NaUDCh): R¹= OH-eq, R²= H, R³= ONa

aggregates over a broad concentration range, needed to build the speciation diagram for every BA, has still to be addressed.

Several techniques have been employed to shed light on the aggregation behavior of BAs, including NMR^{8,9} and photophysical techniques.^{10–13} Specifically, pyrene has been used as a fluorescence probe to investigate the association of BSs in aqueous solution.^{14–16} The ratio of the fluorescence intensities of the vibronic bands of pyrene is strongly dependent on solvent polarity, a property that has been exploited to

Received: August 30, 2012

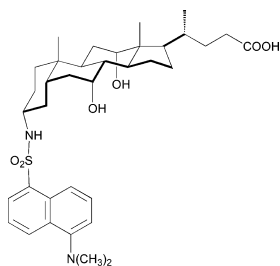
Revised: October 21, 2012

Published: December 3, 2012

determine the critical micelle concentrations (cmcs).^{17,18} Due to the fact that BS aggregates grow in size with increasing concentration, the cmc range of BSs is broader than that of other surfactants and hence difficult to be determined. Even more complex is the problem of estimating the relative amounts of BSs that can be found in the different aggregation stages. In a preliminary communication,¹⁹ we have recently demonstrated that derivatization of cholic acid by incorporating a dansyl (Dns) fluorophore covalently attached to different positions of the skeleton (3α , 3β , or 7α)²⁰ gives rise to an appropriate medium-dependent fluorescent reporter on the aggregation behavior of sodium cholate, which can be successfully employed to build the speciation diagram of this bile salt. The concept is based on the enhancement of the emission quantum yields and lifetimes, upon incorporation into the aggregates. The unique properties of these ChA derivatives are associated with their close structural similarity to BSs, which allow them to occupy equivalent positions in the aggregates and results in a nearly negligible influence on micellization.

With this background, we wish now to report on the extension of this straightforward methodology to build speciation diagrams for sodium glycocholate (NaGCh), sodium taurocholate (NaTCh), sodium chenodeoxycholate (NaCDCh), sodium glycochenodeoxycholate (NaGCDCh), sodium ursodeoxycholate (NaDCh), and sodium ursodeoxycholate (NaUDCh). For this purpose, the probe with a Dns unit bound to C- 3α of cholic acid, namely 3α -Dns-ChA (Chart 2), has been selected as the fluorescent reporter.

Chart 2. Chemical Structure of 3α -Dns-ChA



EXPERIMENTAL METHODS

Chemicals. The BA salts NaCh, NaGCh, NaTCh, NaCDCh, NaGCDCh, and NaDCh as well as lithocholic acid (LChA), ursodeoxycholic acid (UDChA), sodium chloride, sodium hydrogen carbonate, and dimethyl sulfoxide (DMSO), were purchased from Sigma Aldrich and used without further purification. The free acids LChA and UDChA were basified with the stoichiometric amount of NaHCO_3 to obtain the corresponding salts NaLCh and NaUDCh. Millipore water was used for sample preparation. The fluorescent reporter 3α -Dns-ChA was synthesized as previously described.²⁰

Instrumentation. Absorption spectra were registered on a Cary 300 UV-vis spectrophotometer (UV0811M209, Varian). Fluorescence spectra were recorded with a LP S-220B (Photon Technology International) equipped with a 75 W Xe lamp. All the spectra were corrected with baseline control experiments to subtract the solvent Raman emission. Fluorescence lifetime measurements were obtained on a PTI (TM-2/2003) equipped

with H_2/N_2 lamp (50/50, 1.5 ns pulse width) and a stroboscopic detector. The concentration of 3α -Dns-ChA ($20 \mu\text{M}$) ensured that the absorbance of all solutions was below 0.1 at the isobestic point used in each case as the excitation wavelength ($\lambda_{\text{exc}} = 327\text{--}360 \text{ nm}$ for steady-state and $\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$ for time-resolved experiments, respectively). All the photophysical measurements were performed under air, at room temperature, in a quartz cell of 1.0 cm optical path length.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to check the applicability of the methodology, the UV-vis spectrum of 3α -Dns-ChA ($20 \mu\text{M}$) was recorded in the presence of increasing concentrations of bile salts; this produced no noticeable effect on the long-wavelength absorption band (see Figure 1a for the case of NaGCh).

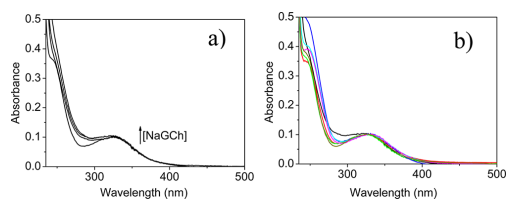


Figure 1. Absorption spectra of 3α -Dns-ChA ($20 \mu\text{M}$) (a) upon addition of increasing concentrations of NaGCh (0–100 mM), and (b) in the presence of 30 mM NaCh (red), NaGCh (black), NaTCh (green), NaCDCh (blue), NaGCDCh (turquoise), NaDCh (pink), and NaUDCh (brown), in 0.2 M aqueous NaCl.

Likewise, addition of 30 mM NaCh, NaGCh, NaTCh, NaCDCh, and NaUDCh did not have any influence on the absorption spectrum of the probe in the 325–360 nm region (see Figure 1b). Therefore, the excitation wavelength for the subsequent emission experiments was selected in this region. In the case of NaGCDCh and NaDCh, slight changes in the absorption spectra were noticed; this made steady-state emission measurements less reliable, but did not influence the time-resolved results, which allowed us to build the speciation diagrams. Unfortunately, the very scarce solubility of NaLCh in aqueous medium prevented the performance of photophysical experiments, and thus no further studies were carried out on this BS.

Then, 3α -Dns-ChA was subjected to steady-state emission measurements in the presence of increasing concentrations of NaCh, NaGCh, NaTCh, NaCDCh, and NaUDCh (see Figure 2a for the case of NaGCh). In general, addition of the BSs resulted in a marked enhancement of the emission intensities (Figure 2b), accompanied by a significant hypsochromic shift of the maximum (Figure 2c), as a result of the progressive incorporation of the fluorophore to the hydrophobic micro-environment provided by the BSs.

Furthermore, time-resolved measurements were performed for NaCh, NaGCh, NaTCh, NaCDCh, and UDCh, as well as for NaGCDCh and NaDCh. Thus, the lifetime of 3α -Dns-ChA was determined upon addition of increasing concentrations of BS. The fluorescence decays of 3α -Dns-ChA in the presence of NaGCh are shown in Figure 3a as an example.

In all cases, a significant increase of the average lifetime was observed as the concentration of BS increased (Figure 3b). It was also found that, at moderate BS concentrations, in addition to the known lifetime in aqueous solution (4.8 ns),²⁰ a second

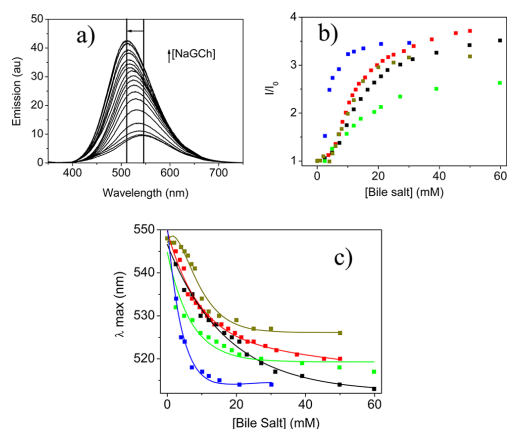


Figure 2. (a) Emission spectra of 3α -Dns-ChA ($20 \mu\text{M}$) in 0.2 M NaCl upon addition of increasing concentrations of NaGCh ($\lambda_{\text{exc}} = 327 \text{ nm}$) in the range 0 – 100 mM . (b) Changes in the relative emission intensities (I/I_0). (c) Changes in the emission λ_{max} vs BS concentration for NaCh (red), NaGCh (black), NaTCh (green), NaCDCh (blue), and NaUDCh (brown) in 0.2 M aqueous NaCl.

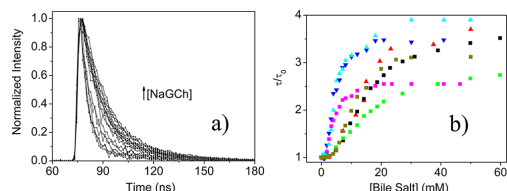


Figure 3. (a) Time-resolved fluorescence of 3α -Dns-ChA ($20 \mu\text{M}$) in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of increasing concentrations of NaGCh ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$). (b) Changes in the relative lifetime (τ/τ_0) vs BA concentration for NaCh (red), NaGCh (black), NaTCh (green), NaCDCh (blue), NaGCDCh (turquoise), NaDCh (pink), and NaUDCh (brown) in 0.2 M aqueous NaCl.

lifetime value (τ_1) had to be introduced to get a good fitting, which was taken as an indication of the formation of the primary aggregates. Moreover, at higher BS concentrations, a third lifetime (τ_{II}) was needed for a satisfactory fitting, in agreement with formation of the secondary aggregates. Table 1 shows the values found for the lifetimes of 3α -Dns-ChA (τ_1 and τ_{II}) when incorporated into every studied BS. According to these data, incorporation of the probe into the primary aggregates provokes an increase of its fluorescence lifetime

Table 1. Fluorescence Lifetimes of 3α -Dns-ChA in Primary (I) and Secondary (II) Aggregates

	τ_1 (ns)	τ_{II} (ns)
NaCh	10.6	12.8
NaGCh	12.1	16.5
NaTCh	11.6	13.2
NaCDCh	8.5	15.5
NaGCDCh	9.5	17.2
NaDCh	9.5	12.3
NaUDCh	9.0	14.9

that is more than twice the value found in solution. Formation of the secondary aggregates is also associated with a lifetime enhancement, which is especially remarkable in the case of NaCDCh and its conjugate derivative NaGCDCh.

Interestingly, when the changes in the relative fluorescence intensities (I/I_0) or in the average lifetimes (τ/τ_0) of 3α -Dns-ChA versus BS concentration were plotted together (see Figure 4 for NaGCh), it became evident that the two methodologies reveal exactly the same trend, which can be taken as a proof for the dynamic nature of the observed emission changes.

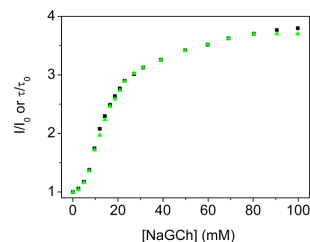


Figure 4. Changes in the relative emission intensities (I/I_0) (black squares) or lifetimes (τ/τ_0) (green triangles) vs NaGCh concentration in 0.2 M aqueous NaCl.

After the emission behavior of 3α -Dns-ChA as a function of added BS concentration was examined, a further effort was made to build the speciation diagrams for all BAs. For this purpose, the percentage of each component in 0.2 M aqueous NaCl (% i) within the different microenvironments, i.e., solution (% S), primary aggregates (% I), and secondary aggregates (% II), was determined using eqs 1 and 2.

$$\frac{I}{I_0} = \frac{(\%S)\phi_S + (\%I)\phi_I + (\%II)\phi_{II}}{100\phi_S} \quad (1)$$

$$\%i = \frac{100 \frac{A_i}{\phi_i}}{A_S + A_I + A_{II}} \quad (2)$$

where I/I_0 is the emission enhancement at a given BS concentration, ϕ_S , ϕ_I , and ϕ_{II} are the corresponding fluorescence quantum yields, and A_S , A_I , and A_{II} are the pre-exponential factors of the decay fittings in the time-resolved experiments.

The value of ϕ_S determined for 3α -Dns-ChA was 0.05 ; the values of ϕ_{II} were initially estimated assuming that, when the plateau is reached, at high BS concentration, secondary aggregates are the overwhelmingly predominating species. Primary aggregates are expected to predominate in the intermediate BA concentration range. Therefore, initial ϕ_I values were selected by assuming the simplification that primary aggregates are the only existing species at intermediate concentration. In the case of NaGCDCh and NaDCh, for which the steady-state experiments were less reliable, the values of ϕ_I and ϕ_{II} were taken from the plot of the relative lifetimes versus BS concentration. This is based on the parallelism between the steady-state and the time-resolved behaviors, which was already demonstrated for the other BAs (see Figure 4). The first estimated quantum yield values were fed into eqs 1 and 2 and subsequently refined within ± 0.02 until the

simulated results were superimposable to the experimental ones. The final quantum yield values are shown in Table 2.

Table 2. Fluorescence Quantum Yields of 3 α -Dns-ChA in Primary (I) and Secondary (II) Aggregates Determined by Applying Eqs 1 and 2

	ϕ_{I}^a	ϕ_{II}^a
NaCh	0.14	0.19
NaGCh	0.13	0.19
NaTCh	0.12	0.14
NaCDCh	0.13	0.18
NaGCDCh	0.13	0.20
NaDCh	0.11	0.18
NaUDCh	0.10	0.16

^aErrors were lower than 5% of the stated values.

With the determined percentage of each species (% *i*) it was possible to build the speciation diagrams of each BA as shown in Figure 5. Significant differences can be found among the seven studied analogues. For instance, in the case of NaCh and the corresponding glycine and taurine derivatives (Figure 5a–c), it is clear that conjugation results in more hydrophilic BAs that extend their presence in solution until 40 mM. In accordance with this increased solubility, the maximum

concentration for the primary aggregates is reached at 25–30 mM while for NaCh it is reached at ca. 15 mM (see Figure 6).

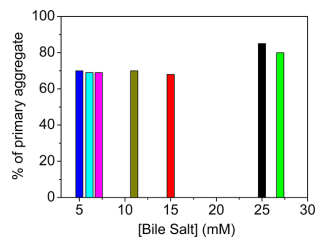


Figure 6. Composition between the BA concentrations where the percentage of primary aggregates is maximized for NaCh (red), NaGCh (black), NaTCh (green), NaCDCh (blue), NaGCDCh (turquoise), NaDCh (pink), and NaUDCh (brown) in 0.2 M aqueous NaCl.

In addition, the lack of a hydroxyl group at position C-12 has also a marked influence on the distribution of the three species, as shown for NaCDCh and NaGCDCh (Figure 5d,e). Their presence in the bulk solution is scarce above 8 mM, and the primary aggregates are predominating at around 5 mM (Figure 6). Again, the increased solubility due to conjugation with the

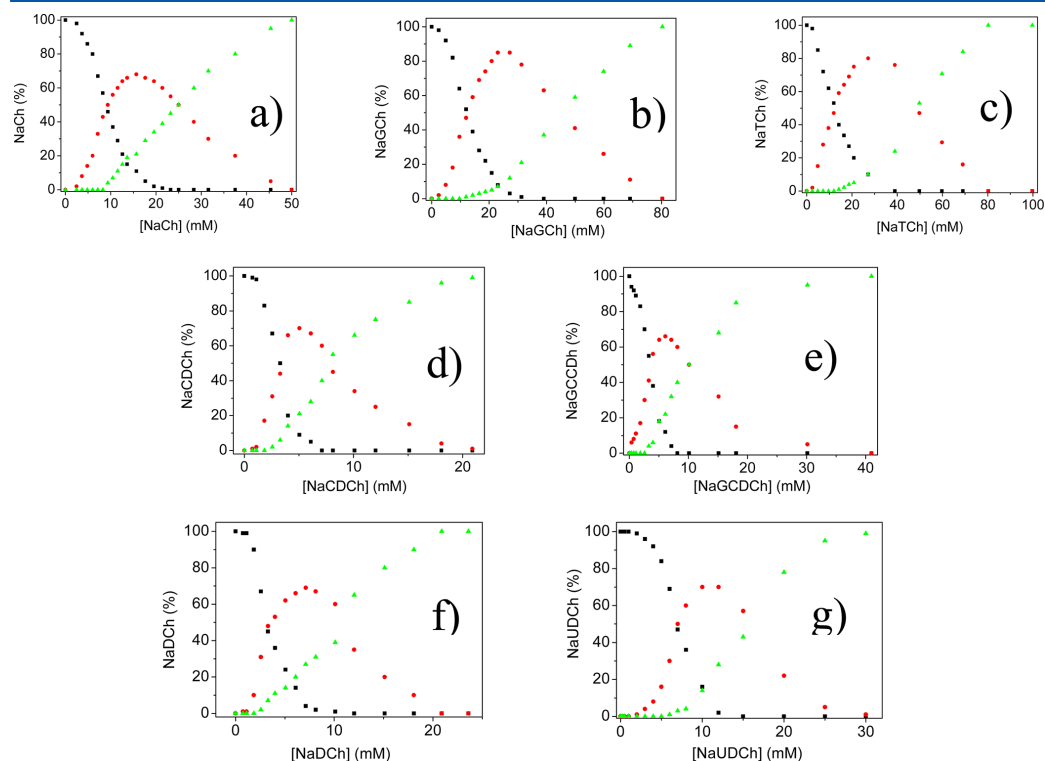


Figure 5. Percentage of BA in solution (black squares), in primary (red circles) and secondary aggregates (green triangles) for (a) NaCh; (b) NaGCh; (c) NaTCh; (d) NaCDCh; (e) NaGCDCh; (f) NaDCh; and (g) NaUDCh.

amino acid moves the three curves to higher concentrations, although in this case the effect is less remarkable than in the NaCh/NaGCh pair. As expected, very similar speciation diagrams were found for NaCDCh (Figure 5d) and NaDCh (Figure 5f), since both contain two hydroxyl groups in the α -face; changing the hydroxyl group at C-7 to the β -face of the skeleton as in NaUDCh results in a higher solubility (Figure 5g), and therefore the maximum percentages of primary aggregates appear at higher concentration (Figure 6). This is interesting in connection with the pharmacological activity of NaUDCh, which has been attributed in part to the fact that its administration to patients renders the BA composition of bile less hydrophobic, reducing the concentration of NaCDCh/NaGCDCh and NaDCh/NaGDCh and hence the toxic potential.^{21,22} Overall, the observed trends are in reasonable agreement with the cmc values determined by independent methods, such as that based on the relative intensities of the vibronic bands in the pyrene fluorescence spectrum.¹⁶ However, speciation diagrams are much more informative than just cmcs, and the fact that a single Dns-labeled BA can be used to probe aggregation in a full series of analogues constitutes a general validation of the methodology.

CONCLUSIONS

In summary, the usefulness of 3 α -Dns-ChA as a fluorescent reporter to establish the distribution of the most abundant bile acids in the main three microenvironments, solution, and primary and secondary aggregates, has been demonstrated. The developed methodology is based on the combined analysis of steady-state and time-resolved experiments, which reveal a strongly medium-dependent emission behavior. The obtained information can be advantageously used to build the speciation diagrams, where clear differences associated with the degree of hydroxylation and/or conjugation have been found.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Absorption spectra, steady-state spectra, time-resolved decays, and comparison of experiments of the bile acids. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marmarin@qim.upv.es (M.L.M.); mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.). Fax: +34963879444. Tel: +34963877807.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge financial support from the Generalitat Valenciana (GV/2009/104 and Prometeo 2008/090), the Spanish Government (Red RETICS de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF), CTQ2009-13699, and Predoctoral FPU fellowship AP2008-03295 for M.G.-M.).

REFERENCES

- (1) Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids Surf.* **1988**, *30*, 145–173.
- (2) Hofmann, A. F. *Arch. Intern. Med.* **1999**, *159*, 2647–2658.
- (3) Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461–2483.
- (4) Armstrong, M. J.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **1982**, *23*, 70–80.
- (5) Hofmann, A. F. *Am. J. Surg.* **1989**, *158*, 198–204.
- (6) Crosignani, A.; Battezzati, P. M.; Setchell, K. D. R.; Invernizzi, P.; Covini, G.; Zuin, M.; Podda, M. *Dig. Dis. Sci.* **1996**, *41*, 809–815.
- (7) Crosignani, A.; Setchell, K. D. R.; Invernizzi, P.; Larghi, A.; Rodrigues, C. M. P.; Podda, M. *Clin. Pharmacokinet.* **1996**, *30*, 333–358.
- (8) Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *176*, 178–189.
- (9) Paul, R.; Mathew, M. K.; Narayanan, R.; Balaram, P. *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *25*, 345–356.
- (10) Ju, C.; Bohne, C. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 60–67.
- (11) Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 1140–1151.
- (12) Li, R.; Carpentier, E.; Newell, E. D.; Olague, L. M.; Heafey, E.; Yihwa, C.; Bohne, C. *Langmuir* **2009**, *25*, 13800–13808.
- (13) Diaz, A. N.; Sanchez, F. G.; Pareja, A. G. *Colloids Surf. A—Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *142*, 27–34.
- (14) Zana, R.; Guveli, D. J. *Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1687–1690.
- (15) Matsuoka, K.; Maeda, M.; Moroi, Y. *Colloids Surf. B—Biointerfaces* **2003**, *32*, 87–95.
- (16) Ninomiya, R.; Matsuoka, K.; Moroi, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1634*, 116–125.
- (17) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039–2044.
- (18) López-Díaz, D.; Velázquez, M. M. *Chem. Educ.* **2007**, *12*, 327–330.
- (19) Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 782–785.
- (20) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4973–4980.
- (21) Paumgartner, G.; Beuers, U. *Clin. Liver Dis.* **2004**, *8*, 67–81.
- (22) Moroi, Y.; Okabe, M. *Colloids Surf. A—Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *169*, 75–84.

Dansyl-labeled Cholic Acid as a Tool to Build Speciation Diagrams for the Aggregation of Bile Acids

Miguel Gomez-Mendoza, M. Luisa Marin, Miguel A. Miranda**

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de
València. Avda de los Naranjos s/n, E-46022, Valencia, Spain

	<u>Page</u>
Figure S1. Absorption spectra of bile acids (a-g)	S2
Figure S2. Steady-State spectra of bile acids (a-e)	S3
Figure S3. Time-Resolved decays of bile acids (a-g)	S4
Figure S4. Comparison of experiments (a-g)	S5

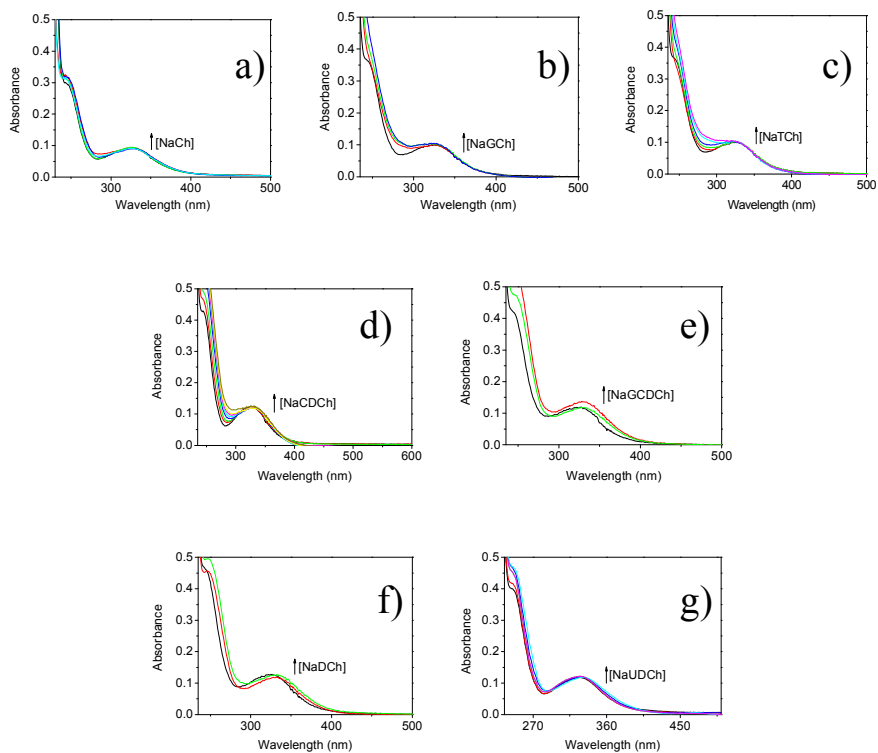


Figure S1. Absorption spectra of 3 α -Dns-ChA (20 μ M) upon addition of increasing concentrations of bile salts **a)** 0-50 mM; **b)** 0-100 mM; **c)** 0-100 mM; **d)** 0-40 mM; **e)** 0-30 mM; **f)** 0-30 mM; **g)** 0-50 mM in 0.2 M aqueous NaCl.

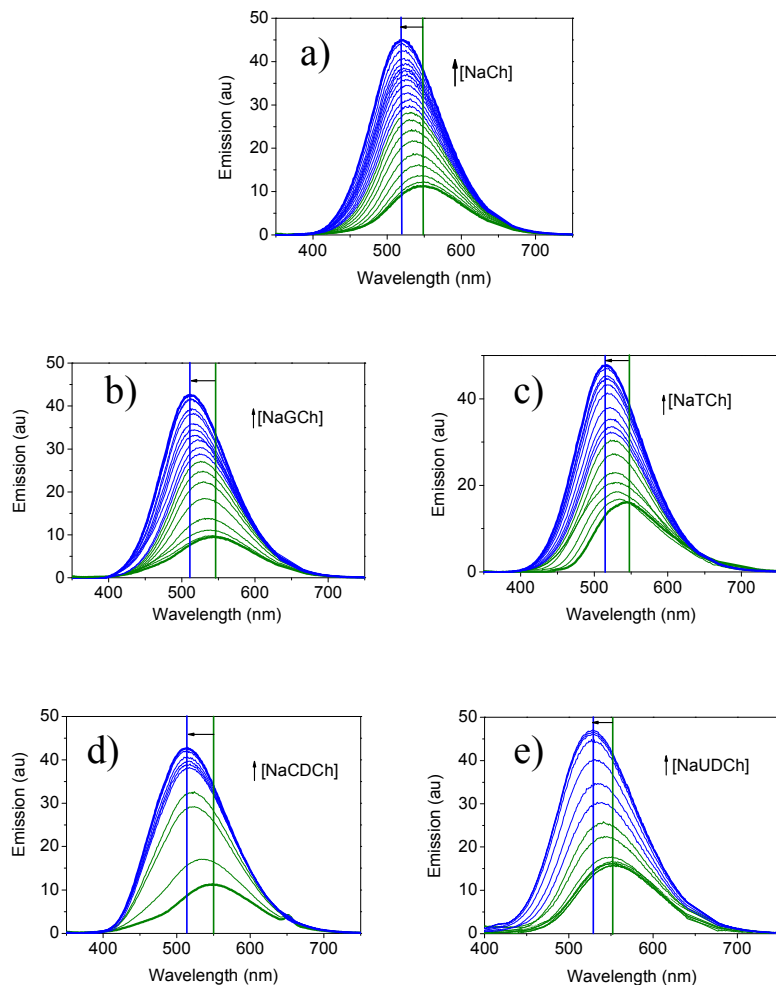


Figure S2. Emission spectra of 3α -Dns-ChA ($20\ \mu\text{M}$) in $0.2\ \text{M}$ NaCl upon addition of increasing amounts of bile salts **a)** 0-50 mM; **b)** 0-100 mM; **c)** 0-100 mM; **d)** 0-40 mM and **e)** 0-50 mM.

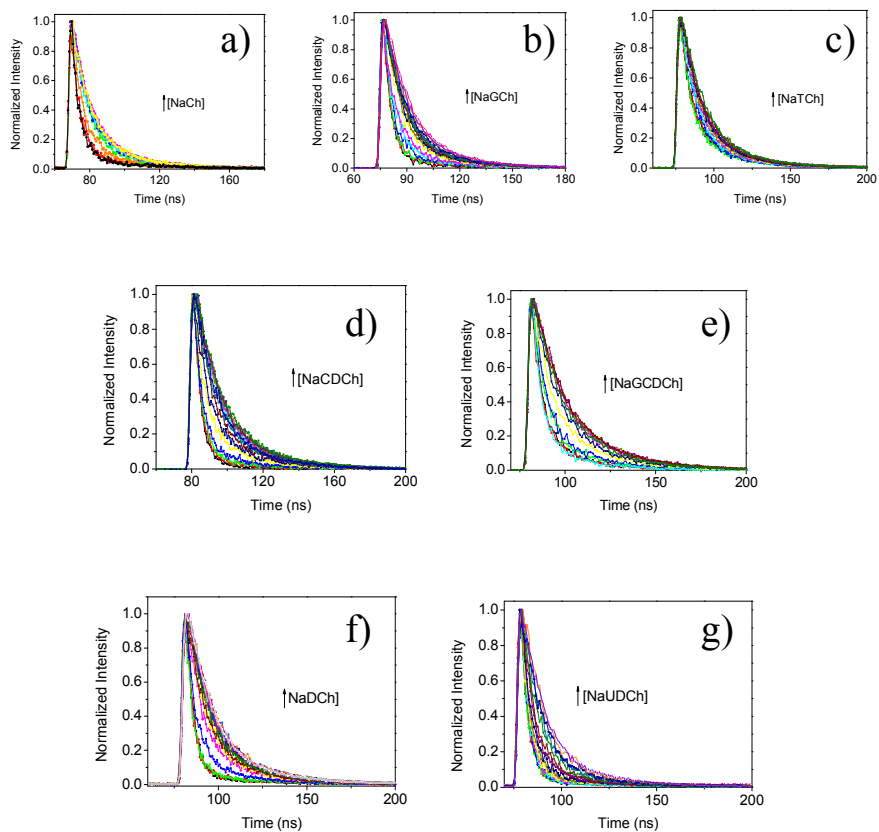


Figure S3. Fluorescence decay traces of 3 α -Dns-ChA (20 μ M) in 0.2 M aqueous NaCl upon addition of bile salts **a)** 0-50 mM; **b)** 0-100 mM; **c)** 0-100 mM; **d)** 0-40 mM; **e)** 0-50 mM; **f)** 0-50 mM and **g)** 0-50 mM.

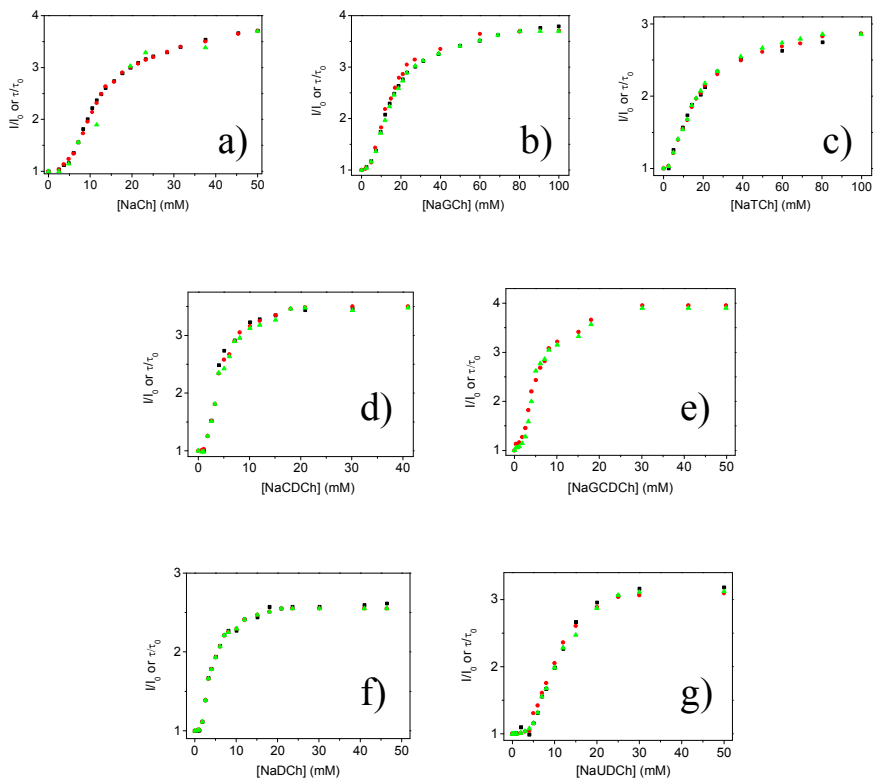


Figure S4. Changes in the relative emission intensities (I/I_0) (■) or lifetimes (τ/τ_0) (▲) vs. bile salt concentration in 0.2 M aqueous NaCl, together with theoretical data obtained using equations 1 and 2 (●) for **a)** NaCh; **b)** NaGCh; **c)** NaTCh; **d)** NaCDCh; **e)** NaGCDCh; **f)** NaDCh and **g)** NaUDCh.

New Photoactive Compounds To Probe Cholic Acid and Cholesterol inside Mixed Micelles

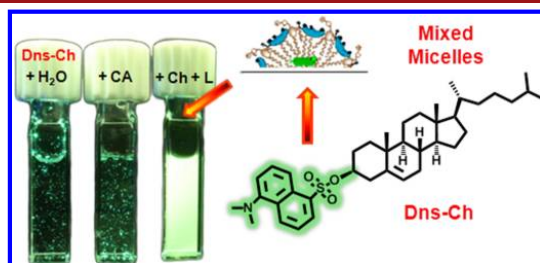
Edurne Nuin,[†] Miguel Gómez-Mendoza,[†] Inmaculada Andreu,[‡] M. Luisa Marin,[†] and Miguel A. Miranda^{*†}

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de València, Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia, Spain, and Unidad Mixta de Investigación IIS La Fe–UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

mimiranda@qim.upv.es

Received November 20, 2012

ABSTRACT



New photoactive dyads have been synthesized by derivatization of cholic acid (CA) or cholesterol (Ch). These compounds have proven to be efficient tools to monitor incorporation of CA and Ch to mixed micelles (MM) and to probe the microenvironment experienced inside these entities. The outstanding capability of MM to solubilize Ch has been demonstrated.

Bile salts (BS), phospholipids (e.g., lecithin (L)), and cholesterol (Ch) are the major components of bile.^{1,2} It is believed that Ch and L are cosecreted by hepatocytes as vesicles, which are then partially solubilized by BS,^{3–6} forming mixed micelles (MM).^{1,2,7,8}

[†] Universitat Politècnica de València.

[‡] Hospital La Fe.

(1) Porter, C. J. H.; Trevasakis, N. L.; Charman, W. N. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6* (3), 231–248.

(2) Wang, D. Q. H.; Cohen, D. E.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **2009**, *S406–S411*.

(3) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, *87* (12), 1666–1683.

(4) Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids Surf.* **1988**, *30* (1–2), 145–173.

(5) Hofmann, A. F. *Archives of Internal Medicine* **1999**, *159* (22), 2647–2658.

(6) Hofmann, A. F. *Am. J. Surgery* **1989**, *158* (3), 198–204.

(7) Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, *36* (19), 5633–5644.

(8) Nagadome, S.; Numata, O.; Sugihara, G.; Sasaki, Y.; Igimi, H. *Colloid Polym. Sci.* **1995**, *273* (7), 675–680.

(9) Yuet, P. K.; Blankschtein, D.; Donovan, J. M. *Hepatology* **1996**, *23* (4), 896–903.

Both species, which exist in a dynamic equilibrium,^{9,10} play an important role in the digestion and in the intestinal absorption of dietary lipids, as well as in the formation of Ch gallstones¹⁰ and in the maintenance of the appropriate Ch levels in humans.

Under fasting conditions vesicles formation prevails; however, in the presence of exogenous lipids (from food, medication, etc.) the total BS concentration increases, which results in the predominance of MM and therefore in a higher solubilization capability.¹

Despite the considerable effort devoted to understand the association properties of BS,^{11,12} the precise mechanisms of lipid vesicle solubilization by surfactants and some interesting properties of MM deserve further attention.

(10) Lichtenberg, D.; Ragimova, S.; Bor, A.; Almog, S.; Vinkler, C.; Kalina, M.; Peled, Y.; Halpern, Z. *Biophys. J.* **1988**, *54* (6), 1013–1025.

(11) Small, D. M.; Penkett, S. A.; Chapman, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *176* (1), 178–189.

(12) Gomez-Mendoza, M.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (7), 782–785.

These issues have been addressed using different techniques including calorimetry,¹³ dynamic light scattering (DLS),^{14,15} transmission electron microscopy (TEM),¹⁶ small-angle X-ray scattering,¹⁷ ultracentrifugation,⁹ or NMR,¹⁸ however, direct and sensitive methodologies to provide reliable information on the architecture of MM are still needed.

In this context, photophysical properties are very sensitive to the environment, and thus excited states can be used as probes for microheterogeneous systems, provided that an appropriate photoactive chromophore is available.^{19–27} Specifically, we have recently reported on the enhancement of the fluorescence quantum yield of the dansyl (Dns) chromophore covalently linked to cholic acid (CA), together with an increase of the singlet lifetime. This has allowed us to build up the speciation diagrams of a variety of BS.¹² Moreover, quenching of the singlet and triplet excited states of naproxen (NPX) derivatives by using salts that mainly remain in water has revealed the distribution of the chromophore between the bulk solution and the lipophilic environments provided by CA aggregates.²⁸ With this background, the present work nicely illustrates the use of new photoactive compounds (**1a–c** and **2a–c**, Figure 1) to probe incorporation of CA and Ch to MM. The unique properties of these new probes are associated with their close structural similarity to CA and Ch, which are among the main components of MM. Hence, all the probes are expected to occupy equivalent positions in the aggregates to the parent compounds, resulting in a nearly negligible influence on micellization.

Here, the singlet excited state of the Dns fluorophore and the triplet excited state of NPX have been used as reporters. These chromophores have been covalently attached to the 3- β -position of the CA and Ch skeleton, to give a series of dyads: Dns-CA (**1a**), (R)-NPX-CA (**1b**),

(S)-NPX-CA (**1c**), Dns-Ch (**2a**), (R)-NPX-Ch (**2b**), and (S)-NPX-Ch (**2c**). They were prepared from CA or Ch and NPX or Dns, following standard procedures (see details in Supporting Information).

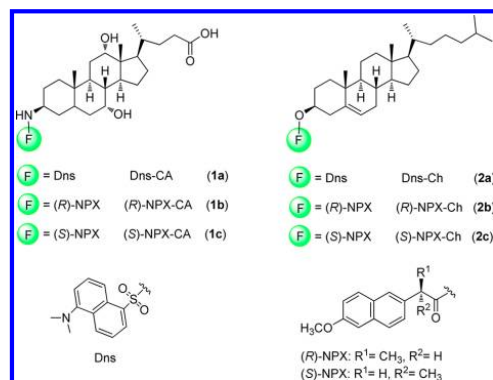


Figure 1. Chemical structures of dyads **1a–c** and **2a–c**.

The MM were prepared from L (13 mM), Ch (4 mM), and CA (28 mM) according to a described procedure.²⁹ To monitor incorporation inside MM, 0.7 or 5% of CA or Ch, respectively, was replaced by the corresponding dyad (**1a–c** or **2a–c**); thus, the concentration of the chromophore (2×10^{-4} M) was appropriate for the photophysical measurements without introducing significant changes in the structure of MM.

The obtained MM were characterized by DLS and by TEM; the combined results revealed the presence of real MM as a major component, together with a lower amount of vesicles (Figure 2A). The structure of MM with and without the photoactive units is represented as a cartoon in Figure 2B.

For a better characterization, the photoactive MM were submitted to photophysical studies. Thus, identical emission and excitation spectra (maxima at 510 and 358 nm, respectively) were obtained with either Dns-CA (**1a**) or Dns-Ch (**2a**) inside MM (Figure 3A). For comparison, analogous experiments were also performed in solution. Interestingly, in the case of **1a** a blue-shifted emission spectrum, accompanied by the corresponding red-shifted excitation spectrum, was observed in MM; in the case of **2a** identical emission and excitation maxima were recorded in the MM system and in CH_2Cl_2 . This indicates that the nature of the environment experienced by the labeled dyads inside the MM is markedly lipophilic and similar to that provided by the nonpolar organic solvent. In aqueous media, the emission quantum yield of **1a** increased from 0.05 (0.2 M NaCl) to 0.12 (MM). In the case of **2a**, the corresponding values were < 0.01 (0.2 M NaCl) and

(13) Hildebrand, A.; Neubert, R.; Garidel, P.; Blume, A. *Langmuir* **2002**, *18* (7), 2836–2847.

(14) Cohen, D. E.; Thurston, G. M.; Chamberlin, R. A.; Benedek, G. B.; Carey, M. C. *Biochemistry* **1998**, *37* (42), 14798–14814.

(15) Sun, C. Q.; Sano, Y.; Kashiwagi, H.; Ueno, M. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280* (10), 900–907.

(16) delaMaza, A.; Manich, A. M.; Parra, J. L. *J. Microscopy-Oxford* **1997**, *186*, 75–83.

(17) Mueller, K. *Biochemistry* **1981**, *20*, 404–14.

(18) Stark, R. E.; Roberts, M. F. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1984**, *770*, 115–21.

(19) Perez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (15), 4460–4468.

(20) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; Diaz, L.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2009**, *4* (3), 466–472.

(21) Ariola, F. S.; Mudaliar, D. J.; Walvicka, R. P.; Heikal, A. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (39), 4517–4529.

(22) Barnadas-Rodriguez, R.; Estelrich, J. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (7), 1972–1982.

(23) Mandal, S.; Rao, V. G.; Ghatak, C.; Pramanik, R.; Sarkar, S.; Sarkar, N. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (42), 12108–12119.

(24) Moyano, F.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J.; Correa, N. M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (24), 11838–11846.

(25) Pandey, S.; Baker, G. A.; Kane, M. A.; Bonzagni, N. J.; Bright, F. V. *Chem. Mater.* **2000**, *12* (12), 3547–3551.

(26) Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 16224–16230.

(27) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2039–2044.

(28) Gomez-Mendoza, M.; Nuin, E.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10213–10218.

(29) Wacker, M.; Schubert, R. *Int. J. Pharm.* **1998**, *162* (1–2), 171–175.

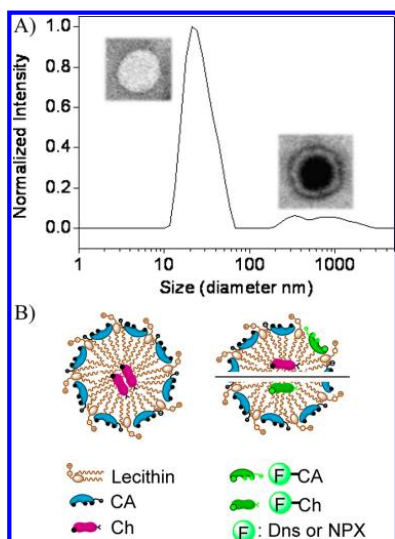


Figure 2. Bile salts/lecithin/cholesterol MM. (A) Size distribution curves for mixed micelles and vesicles in 0.2 M aqueous NaCl, obtained by DLS and TEM image. (B) Cartoon representation of MM.

0.12 (MM). Accordingly, when time-resolved emission was recorded in solution, a singlet lifetime of 4.8 ns was obtained for **1a** in an aqueous medium, while a value of 15 ns was obtained for **2a** in CH_2Cl_2 . An intermediate lifetime of ca. 10 ns was measured upon incorporation of either **1a** or **2a** in MM, which indicates that both probes are integrated in the architecture created by the supramolecular entities.

An eye-catching demonstration that clearly proves how the labeled derivatives of CA and Ch are incorporated into the MM was achieved by photographing **1a** and **2a** under a UV lamp, in three different environments (Figure 4): aqueous solution (a, d), 28 mM CA aggregates (b, e), and MM (c, f). As the pictures illustrate, in the case of **1a** an efficient incorporation into both the supramolecular CA aggregates and MM was assessed by the observed fluorescence (Figure 4a–c). More interestingly, in agreement with the fact that the solubility of Ch in aqueous media is extremely limited, the pictures revealed that the fluorescent Ch derivative (**2a**) is hardly solubilized in water or in CA aggregates (Figure 4d and e, respectively). By contrast, a highly emissive solution was observed in the presence of MM (Figure 4f), in agreement with the paramount importance of these micelles in the solubilization of Ch in biological systems.¹

A complementary approach to investigate incorporation of the CA- or Ch-derived probes was based on laser flash photolysis (LFP) experiments. When NPX was chosen as the labeling chromophore and the resulting dyads **1b,c** and **2b,c** were incorporated into MM and submitted to

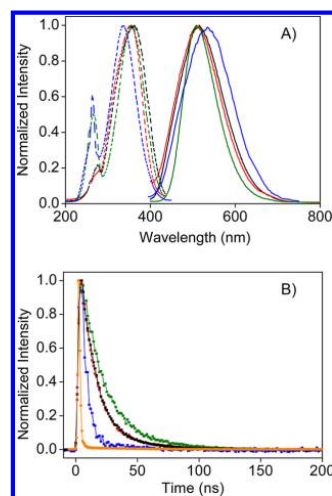


Figure 3. (A) Normalized emission (solid line) and excitation spectra (dashed line) of **1a** into MM in aqueous 0.2 M NaCl (red); **2a** into MM in aqueous 0.2 M NaCl (black); **1a** in aqueous 0.2 M NaCl (blue) and **2a** in CH_2Cl_2 (green). (B) Decay traces of **1a** and **2a** solutions under identical conditions; the color codes remain as above. The lamp response time is included (orange). Concentration of the samples were fixed at the value of 2×10^{-4} M, under an aerobic atmosphere.

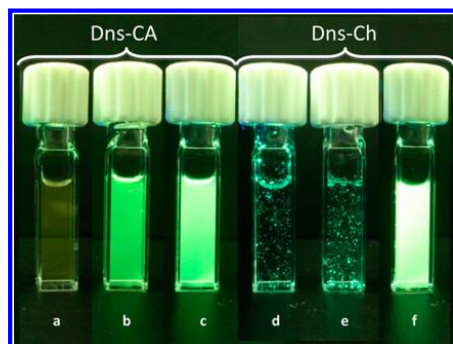


Figure 4. Photograph of real-color emission ($\lambda_{\text{exc}} = 254$ nm) of Dns-CA and Dns-Ch in aqueous solution (a, d), in the presence of 28 mM CA (b, e), and incorporated in MM (c, f). The concentration of the samples was fixed at 2×10^{-5} M.

LFP, transient absorption spectra exhibiting a main band at 440 nm, characteristic of the NPX triplet–triplet absorption in solution, were recorded (see Figure 5A for **2c** as an example). The fact that the spectra of **2b** and **2c** could be measured at 2×10^{-4} M with a good signal-to-noise ratio shows again that solubilization of Ch in an aqueous

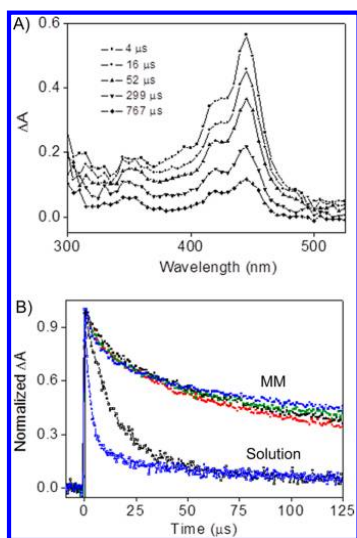


Figure 5. (A) Transient absorption spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) obtained at different delay times after the laser pulse for **2b** within mixed micelles in aqueous 0.2 M NaCl, under nitrogen. (B) Decay traces monitored at 440 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) for **1b** (red), **1c** (black), **2b** (green), and **2c** (blue) incorporated in MM and for comparison **1c** and **2c** in solution (aqueous 0.2 M NaCl or CH_2Cl_2 , respectively). All measurements were made under anaerobic conditions, and the concentration of samples was fixed at 2×10^{-4} M.

medium can only be achieved in the presence of MM. Interestingly, a remarkable enhancement of the triplet lifetime (to hundreds of microseconds) was noticed by comparison with the values found for **1c** in an aqueous solution (*ca.* 18 μs) or for **2c** in CH_2Cl_2 (*ca.* 3.2 μs), without any

significant stereodifferentiation (Figure 5B). This huge increase in the triplet lifetime can also be exploited as a sensitive parameter to monitor the photoactive probes inside the supramolecular entities provided by MM.

In summary, the incorporation of CA and Ch to the supramolecular architecture provided by MM and the capability of these entities to solubilize Ch have been demonstrated by means of DLS and TEM, combined with photophysical techniques. For this purpose, new tools have been developed by converting CA and Ch into photoactive reporters in which highly sensitive Dns or NPX chromophores are covalently linked to the steroidal skeleton. Replacement of less than 5% of the original components of the MM by any of the photoactive units results in an impressive enhancement of the fluorescence intensity (by 1 order of magnitude in the case of Dns-Ch) accompanied by a corresponding change in the singlet lifetime. Moreover, a remarkable enhancement of the triplet lifetime of NPX-marked CA and Ch has been found by transient absorption spectroscopy. Overall, this is a direct, sensitive, and straightforward methodology to probe incorporation of CA and Ch into MM, which can in principle be extended to other microenvironments experienced by BS or Ch in biological systems.

Acknowledgment. We gratefully acknowledge financial support from the Generalitat Valenciana (Prometeo Program), the Spanish Government (Red RETICS de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF), Servet Contract CP11/00154 for I.A.; CTQ2009-13699 CTQ2010-14882 and Predoctoral FPU fellowship AP2008-03295 for M.G.-M.).

Supporting Information Available. Experimental details, spectroscopic characterization of **1a–c** and **2a–c**, and additional figures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

The authors declare no competing financial interest.

Supporting Information

New photoactive compounds to probe cholic acid and cholesterol inside mixed micelles

Edurne Nuin,^a Miguel Gómez-Mendoza,^a Inmaculada Andreu,^b M. Luisa Marin^a and

Miguel A. Miranda^{a*}

^aInstituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de València. Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. Spain

^bUnidad Mixta de Investigación IIS La Fe –UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

Table of contents

1. Experimental Section	S2 - S3
2. Synthesis and Characterization of Dyads 1a-c and 2a-c	S4
I. Synthesis of 1b and 1c	S5
II. ¹ H and ¹³ C NMR spectra of 1b	S6
III. ¹ H and ¹³ C NMR spectra of 1c	S7
IV. Synthesis of 2a	S8
V. ¹ H and ¹³ C NMR spectra of 2a	S9
VI. Synthesis of 2b and 2c	S10
VII. ¹ H and ¹³ C NMR spectra of 2b	S11
VIII. ¹ H and ¹³ C NMR spectra of 2c	S12
3. Fluorescence spectra of 1a in different solvents	S13
4. Laser Flash Photolysis of 1b , 1c and 2c	S14

1. Experimental Section

Materials and Solvents. Dansyl chloride (Dns-Cl), (*R*)- and (*S*)-naproxen (NPX), cholesterol (Ch), egg lecithin (from fresh egg yolk), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylamine (DIEA), 4-pyrrolidylpyridine (4-Pr-Py), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), dimethylformamide (DMF), triethylamine (Et₃N) and NaCl were purchased from Sigma–Aldrich; sodium cholate (NaCA) was provided from Acros Organics. Milli-Q® water was used for sample preparation. Dichloromethane and acetonitrile (HPLC grade) were from Scharlab.

Preparation of Mixed Micelles. Cholesterol (5.4 μmol) was dissolved in 100 μL of CH₂Cl₂ and added to a solution of lecithin (17.8 μmol) and NaCA (38.8 μmol) in 400 μL of methanol. Then, a solution of 0.27 μmol of Dns-CA (**1a**), (*R*)-NPX-CA (**1b**) or (*S*)-NPX-CA (**1c**) in 100 μL of methanol or Dns-Ch (**2a**), (*R*)-NPX-Ch (**2b**) or (*S*)-NPX-Ch (**2c**) in 100 μL of dichloromethane was added. The combined solutions were diluted with methanol to reach a total volume of 10 mL and then concentrated 30 min at 50 °C using a rotary evaporator and 30 min at room temperature with an oil pump to obtain a thin clear film. Then the dried film was rehydrated with 1.37 mL of aqueous 0.2 M NaCl to form a clear mixed micelle (MM) preparation.

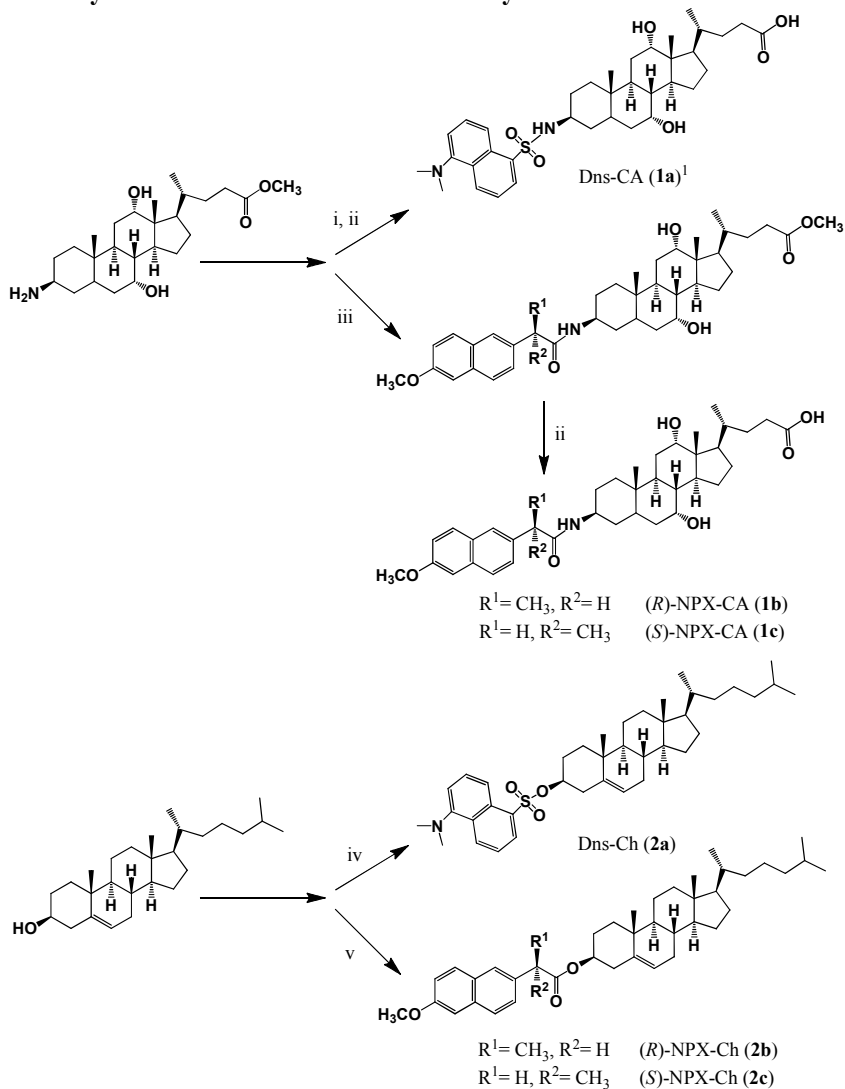
Transmission Electron Microscopy. TEM micrographs were collected with a Phillips CM-10 microscope operating at 100 kV. A drop of the preparation was sucked on a copper coated carbon grid, and after 1 min the excess was removed with filter paper. Then it was treated with a negative staining using a drop of a 1% solution of ammonium molybdate, and using again filter paper to remove the excess. The resulting stained film was dried in a dust-free place.

Dynamic light scattering (DLS). MM size measurements were conducted using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). The MM prepared were diluted with deionized water and DLS measurements were performed at 25 °C and 173 ° scattering angle. The mean hydrodynamic diameter was determined by cumulant analysis.

Absorption and Fluorescence Measurements. UV spectra were recorded on a Cary 300 (Varian) spectrophotometer. Steady-state fluorescence experiments were carried out using a Photon Technology International (PTI, Germany) LPS-220B spectrofluorometer, equipped with a monochromator in the range of 200-700 nm. Time-resolved fluorescence measurements were performed with a Time Master fluorescence lifetime spectrometer TM 2/2003 from PTI, using a hydrogen/nitrogen flash lamp as the excitation source. The kinetic traces were fitted by one or two monoexponential decay functions, using a deconvolution procedure to separate them from the lamp pulse profile. For the fluorescence measurements, the concentration of the chromophore was 2 x 10⁻⁴ M. Emission measurements were performed in the region of 330-600 nm with excitation in the range of 200-340 nm. All measurements were performed at room temperature using 10 x 10 mm² quartz cells of 4 mL capacity, under aerobic conditions.

Laser Flash Photolysis (LFP). A pulsed Nd: YAG L52137 V LOTIS TII was used at the excitation wavelength of 266 nm. The single pulses were *ca.* 10 ns duration, and the energy was lower than 20 mJ/pulse. The laser flash photolysis system consisted of the pulsed laser, a 77250 Oriel monochromator and an oscilloscope DP04054 Tektronix. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. Concentrations of the samples were adjusted at 2×10^{-4} M. All transient spectra were recorded at room temperature using $10 \times 10 \text{ mm}^2$ quartz cells with 4 mL capacity and were bubbled for 15 min with N_2 before acquisition. The triplet lifetimes of dyads were measured in aqueous 0.2 M NaCl solution (**1b** or **1c**) or in dichloromethane (**2b** or **2c**) or in MM, from the monoexponential fitting of the decay traces registered at 440 nm.

2. Synthesis and Characterization of Dyads 1a-c and 2a-c



Scheme 1. Synthesis of dyads **1a-c** and **2a-c**: (i) Dns-Cl, Et₃N, DMF, N₂, rt.; (ii) KOH, CH₃OH, rt.; (iii) (*R*)- or (*S*)-NPX, EDC, DIEA, 4-Pr-Py, CH₂Cl₂, N₂, rt.; (iv) Dns-Cl, Pyridine, N₂, rt.; (v) (*R*)- or (*S*)-NPX, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, N₂, 0 °C.

(1) Rohacova, J.; Marin, M. L.; Martinez-Romero, A.; O'Connor, J. E.; Gomez-Lechon, M. J.; Donato, M. T.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4973.

I. Synthesis of (*R*)-NPX-CA (**1b**) and (*S*)-NPX-CA (**1c**)

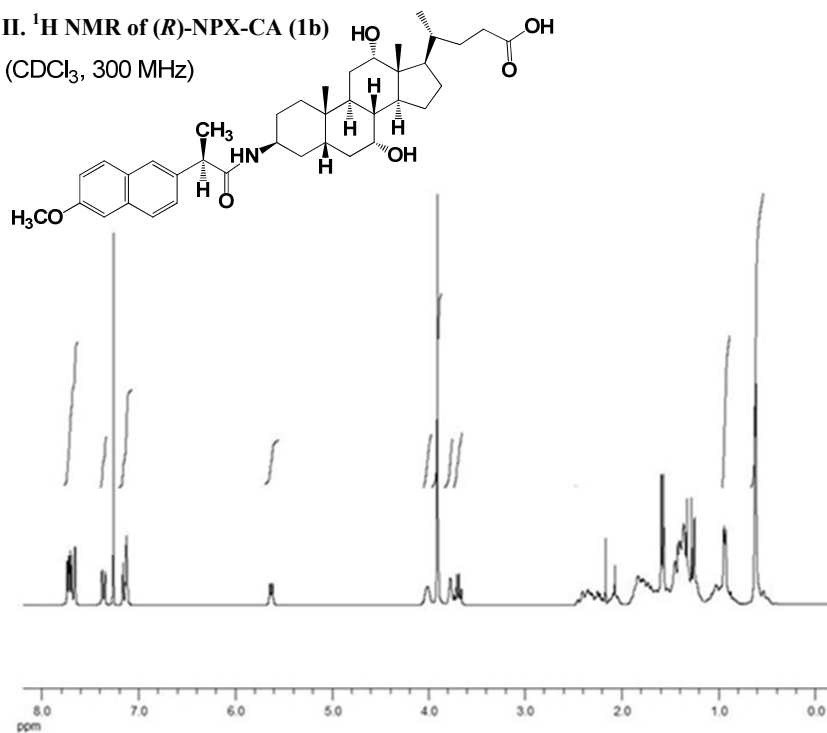
To a solution of (*S*)- or (*R*)-NPX (123 mg, 0.54 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL), EDC (156 μL, 0.57 mmol) was added, and the reaction mixture was cooled to 0 °C. Then, a solution of the methyl ester of 3-aminocholic acid¹ (150 mg, 0.36 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL), containing DIEA (155 μL, 0.89 mmol) and 4-Pr-Py (27 mg, 0.18 mmol) was added dropwise under inert atmosphere, and the reaction mixture was stirred overnight at rt. Afterwards, the mixture was poured into 10 mL of water and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. After purification by column chromatography (ethyl acetate / n-hexane, 70 : 30), the product was dissolved in 2 mL of MeOH, and treated with a solution of KOH in MeOH (1 M, 1.2 mL). The resulting mixture was stirred overnight at rt. The solvent was evaporated, and the mixture redissolved in H₂O (2 mL), acidified with 1 M HCl, extracted twice with AcOEt and purified by preparative thick layer chromatography on silica gel (AcOEt / n-hexane / AcOH, 90 : 10 : 1) to give **1b** (25 mg, 46%) or **1c** (32 mg, 53%).

(*R*)-NPX-CA (1b**).** ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.57 (s, 6H, CH₃), 0.87 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH₃), 1.52 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 0.90-2.40 (complex signal, 27 H), 3.62 (m, 1H, CH), 3.70 (br s, 1H, CH), 3.85 (s, 4H, OCH₃ + CH), 3.97 (br s, 1H, CH), 5.55 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.05-7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.3 (dd, *J* = 8.4 and 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.59-7.68 (m, 3H, Ar-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.4 (CH₃), 17.2 (CH₃), 18.2 (CH₃), 22.9 (CH₃), 23.2 (CH₂), 24.3 (CH₂), 25.7 (CH), 27.5 (CH₂), 28.3 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.7 (CH₂), 30.9 (CH₂), 33.2 (CH₂), 34.2 (CH₂), 35.0 (C), 35.4 (CH), 37.3 (CH), 39.3 (CH), 41.7 (CH), 45.5 (CH), 46.4 (C), 46.9 (CH), 47.2 (CH), 55.3 (CH₃), 68.3 (CH), 73.0 (CH), 105.7 (CH), 119.6 (CH), 126.1 (CH), 126.3 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (C), 129.2 (CH), 133.7 (C), 136.6 (C), 157.7 (C), 173.9 (CO), 178.3 (CO). Exact mass: *m/z* found 620.3966, calculated for C₃₈H₅₄NO₆ (MH⁺) 620.3951.

(*S*)-NPX-CA (1c**).** ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.57 (s, 6H, CH₃), 0.87 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH₃), 1.52 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 0.90-2.40 (complex signal, 27 H), 3.62 (m, 1H, CH), 3.70 (br s, 1H, CH), 3.85 (s, 4H, OCH₃ + CH), 3.90 (br s, 1H, CH), 5.50 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, NH), 7.05-7.10 (m, 2H, Ar-H), 7.30 (dd, *J* = 8.5 and 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.59-7.67 (m, 3H, Ar-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 11.4 (CH₃), 16.2 (CH₃), 17.3 (CH₃), 21.9 (CH₃), 22.3 (CH₂), 23.4 (CH₂), 24.8 (CH), 26.5 (CH₂), 27.4 (CH₂), 28.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 32.2 (CH₂), 33.3 (CH₂), 33.9 (CH), 34.2 (C), 36.2 (CH), 38.3 (CH), 40.8 (CH), 44.4 (CH), 45.4 (C), 45.9 (CH), 46.3 (CH), 54.3 (CH₃), 67.2 (CH), 71.9 (CH), 104.6 (CH), 118.1 (CH), 125.0 (CH), 125.3 (CH), 126.5 (CH), 128.0 (C), 128.2 (CH), 132.7 (C), 135.7 (C), 156.7 (C), 172.7 (CO), 177.1 (CO). Exact mass: *m/z* found 620.3930, calculated for C₃₈H₅₄NO₆ (MH⁺) 620.3951.

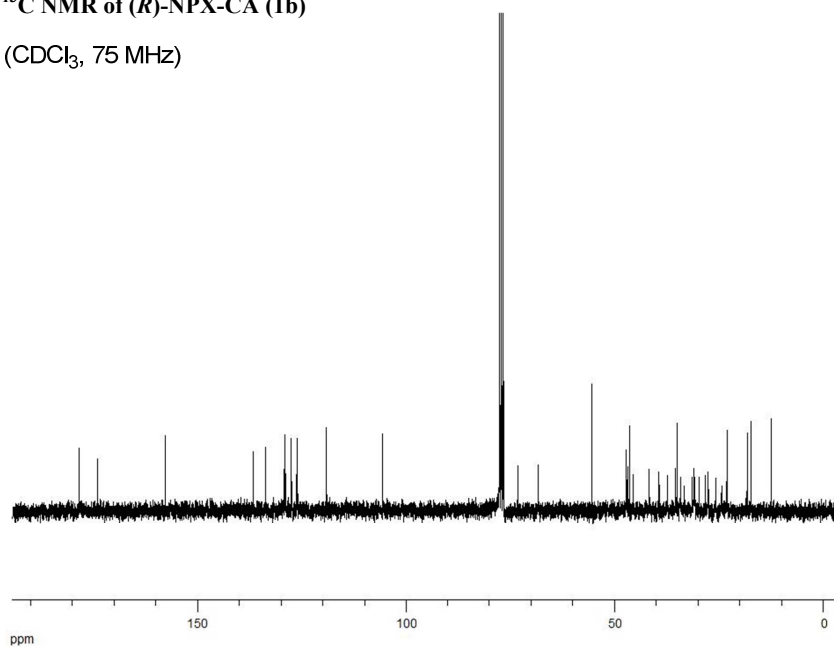
II. ^1H NMR of (*R*)-NPX-CA (1b)

(CDCl_3 , 300 MHz)



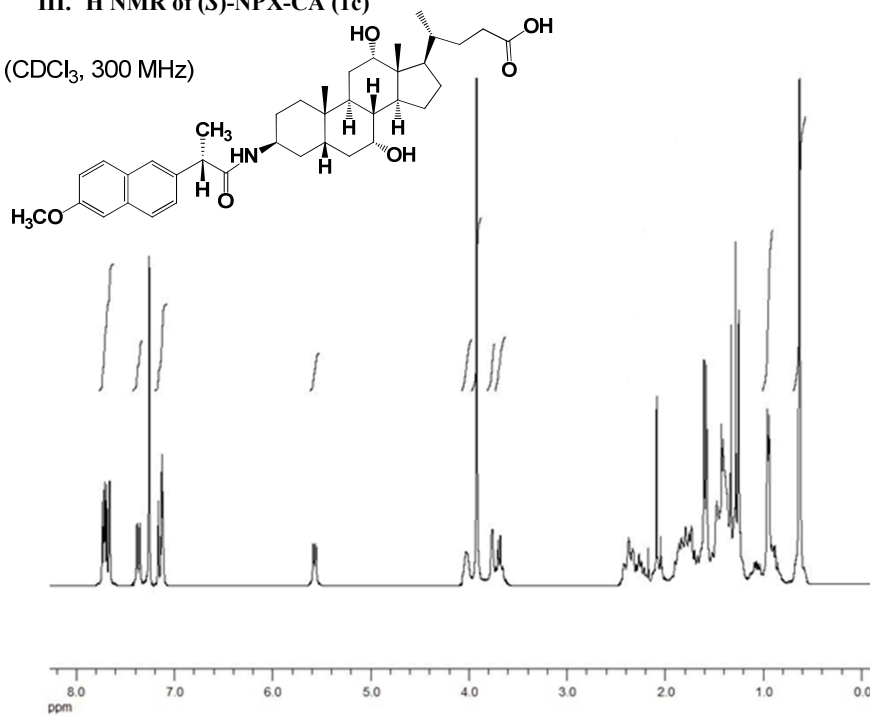
^{13}C NMR of (*R*)-NPX-CA (1b)

(CDCl_3 , 75 MHz)



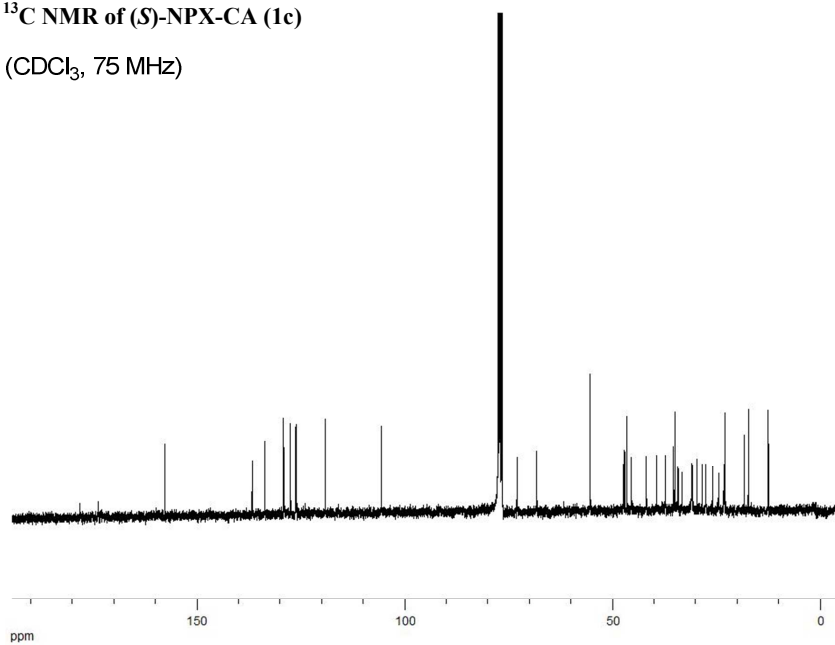
III. ^1H NMR of (*S*)-NPX-CA (1c)

(CDCl_3 , 300 MHz)



^{13}C NMR of (*S*)-NPX-CA (1c)

(CDCl_3 , 75 MHz)

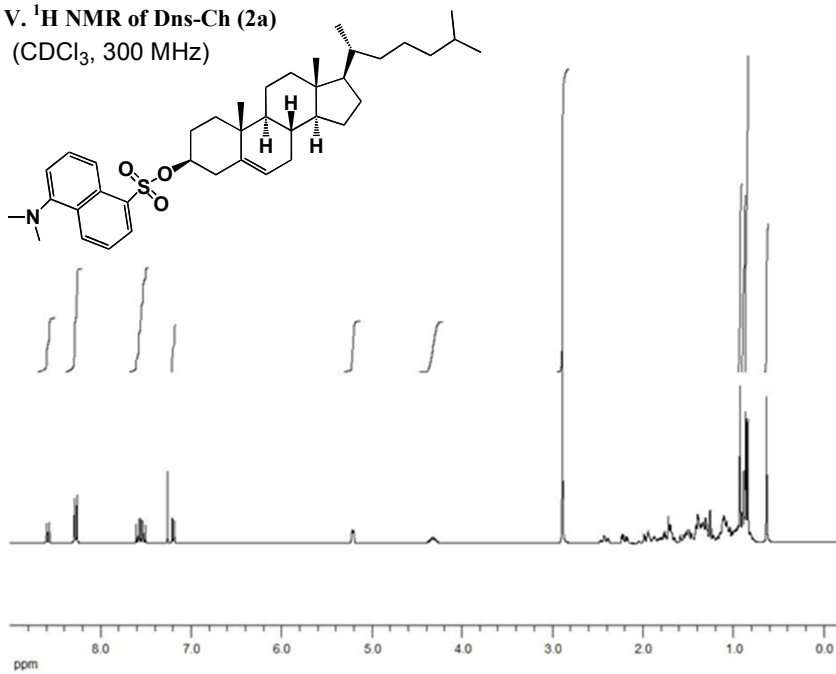


IV. Synthesis of Dns-Ch (2a)

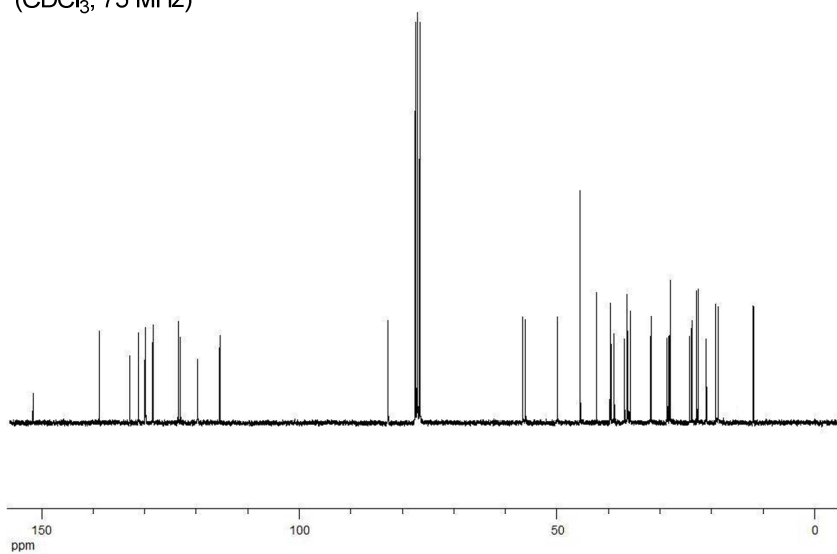
Dansyl chloride (Dns-Cl, 14 mg, 0.5 mmol) was added dropwise to a cooled (0° C) solution of Ch (100 mg, 0.25 mmol) in anhydrous pyridine (3 mL), and the reaction mixture was stirred at rt. under N₂ atmosphere for 20 h. Afterwards, it was poured into 25 mL of HCl (6 M) saturated with NaCl and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 20 mL) and water (2 x 20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (ethyl acetate / n-hexane, 10 : 90) to afford **2a** (84 mg, 53%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.63 (s, 3H, CH₃), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.80-2.00 (complex signal, 26 H), 2.20 (m, 1H, CH), 2.43 (m, 1H, CH), 2.90 (s, 6H, CH₃), 4.33 (m, 1H, CH), 5.21 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.20 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.50-7.67 (m, 2H, Ar-H), 8.28 (dd, *J* = 7.5 Hz and 1.2 Hz, 2H, Ar-H), 8.60 (dt, *J* = 8.7 Hz and 1.1 Hz, 1H, Ar-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 11.8 (CH₃), 18.7 (CH₃), 19.1 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.5 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.8 (CH₂), 24.2 (CH₂), 28.0 (CH), 28.2 (CH₂), 28.5 (CH₂), 31.7 (CH), 31.8 (CH₂), 35.7 (CH), 36.1 (CH₂), 36.3 (C), 36.8 (CH₂), 38.8 (CH₂), 39.5 (CH₂), 39.6 (CH₂), 42.2 (C), 45.4 (CH₃), 49.9 (CH₃), 56.1 (CH), 56.6 (CH), 82.7 (CH), 115.4 (CH), 119.7 (CH), 123.0 (CH), 123.5 (CH), 128.4 (CH), 129.8 (C), 129.8 (CH), 129.9 (C), 131.2 (CH), 132.9 (C), 138.8 (C), 151.6 (C). Exact mass: *m/z* found 620.4152, calculated for C₃₉H₅₈NO₃S (MH⁺) 620.4132.

V. ^1H NMR of Dns-Ch (2a)
(CDCl_3 , 300 MHz)



^{13}C NMR of Dns-Ch (2a)
(CDCl_3 , 75 MHz)



VI. Synthesis of (*R*)-NPX-Ch (**2b**) and (*S*)-NPX-Ch (**2c**)

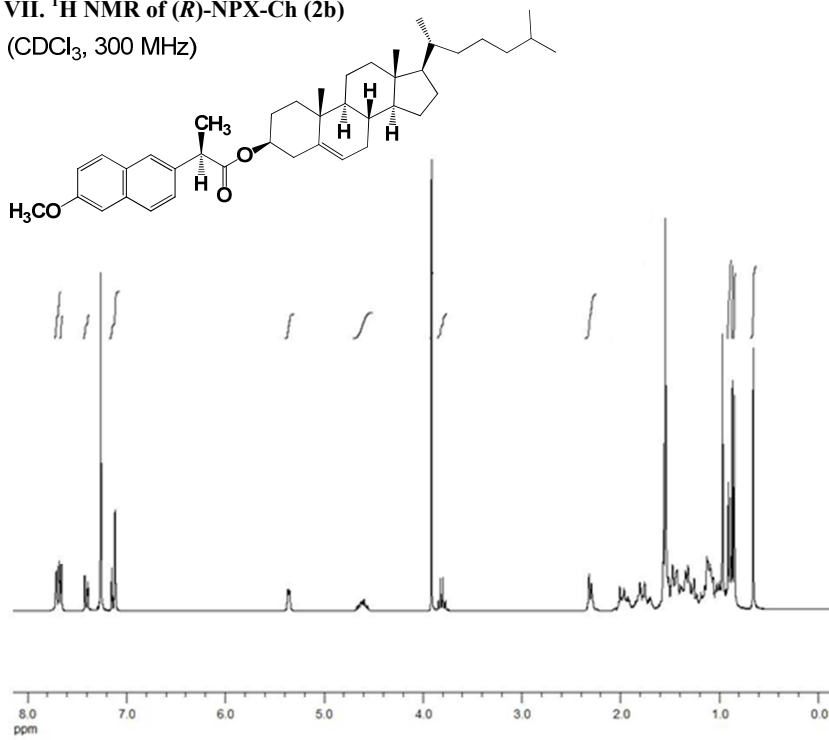
To a cold solution of (*S*)- or (*R*)-NPX (100 mg, 0.43 mmol) in CH₂Cl₂ (1.50 mL), DCC (136 mg, 0.66 mmol) was added portionwise, and the mixture was stirred at 0 °C for 30 min. Then, a solution of Ch (131 mg, 0.34 mmol) and DMAP (4 mg, 0.03 mmol) in CH₂Cl₂ (1.20 mL) was added, and the mixture stirred for further 8 h at the same temperature. Afterwards, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite®. The filtrate was poured into brine and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (15 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude was purified by column chromatography (hexane/dichloromethane/ethyl acetate, 90 : 5 : 5) to give **2b** (184 mg, 90%) or **2c** (203 mg, 99%).

(*R*)-NPX-Ch (2b**)**. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.66 (s, 3H, CH₃), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 1.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 0.80-2.00 (complex signal, 26 H), 2.31 (m, 2H, CH), 3.81 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 4.62 (m, 1H, CH), 5.36 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH), 7.13 (m, 2H, Ar-H), 7.41 (dd, *J* = 8.4 Hz and 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.68 (dd, *J* = 8.4 Hz and 2.7 Hz, 2H, Ar-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 11.8 (CH₃), 18.6 (CH₃), 18.7 (CH₃), 19.3 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.6 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.8 (CH₂), 24.3 (CH₂), 27.5 (CH₂), 28.0 (CH), 28.2 (CH₂), 31.8 (CH), 31.9 (CH₂), 35.8 (CH), 36.2 (CH₂), 36.6 (C), 36.9 (CH₂), 38.0 (CH₂), 39.5 (CH₂), 39.7 (CH₂), 42.3 (C), 45.7 (CH), 50.0 (CH), 55.3 (CH₃), 56.1 (CH), 56.7 (CH), 74.2 (CH), 105.6 (CH), 118.9 (CH), 122.6 (C), 125.8 (CH), 126.3 (CH), 127.0 (CH), 128.9 (C), 129.3 (CH), 133.6 (C), 136.0 (C), 139.7 (C), 157.6 (C), 174.1 (CO). Exact mass: *m/z* found 599.4457, calculated for C₄₁H₅₈O₃ (MH⁺) 599.4459.

(*S*)-NPX-Ch (2c**)**. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.66 (s, 3H, CH₃), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.85 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.90 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃), 0.96 (s, 3H, CH₃), 1.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 0.80-1.95 (complex signal, 26 H), 2.18 (m, 2H, CH), 3.80 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 4.61 (m, 1H, CH), 5.28 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH), 7.12 (m, 2H, Ar-H), 7.40 (dd, *J* = 8.4 Hz and 1.8 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.4 Hz and 2.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 11.9 (CH₃), 18.6 (CH₃), 18.7 (CH₃), 19.3 (CH₃), 21.0 (CH₂), 22.6 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.9 (CH₂), 24.3 (CH₂), 27.7 (CH₂), 28.0 (CH), 28.2 (CH₂), 31.8 (CH), 31.9 (CH₂), 35.8 (CH), 36.2 (CH₂), 36.6 (C), 37.0 (CH₂), 37.8 (CH₂), 39.5 (CH₂), 39.7 (CH₂), 42.3 (C), 45.7 (CH), 50.0 (CH), 55.3 (CH₃), 56.1 (CH), 56.7 (CH), 74.2 (CH), 105.6 (CH), 118.9 (CH), 122.6 (C), 125.9 (CH), 126.3 (CH), 127.0 (CH), 129.0 (C), 129.3 (CH), 133.6 (C), 136.0 (C), 139.6 (C), 157.6 (C), 174.1 (CO). Exact mass: *m/z* found 599.4456, calculated for C₄₁H₅₈O₃ (MH⁺) 599.4459.

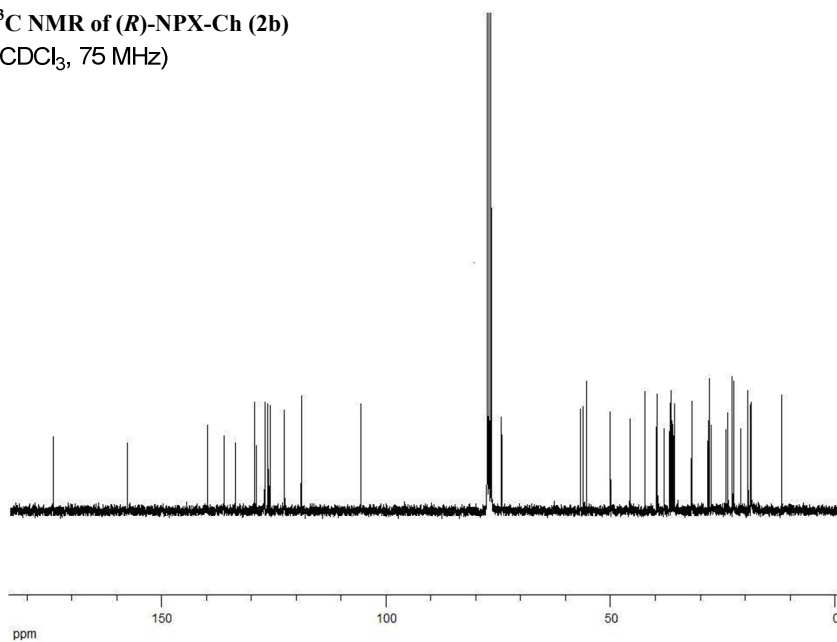
VII. ^1H NMR of (*R*)-NPX-Ch (2b)

(CDCl_3 , 300 MHz)



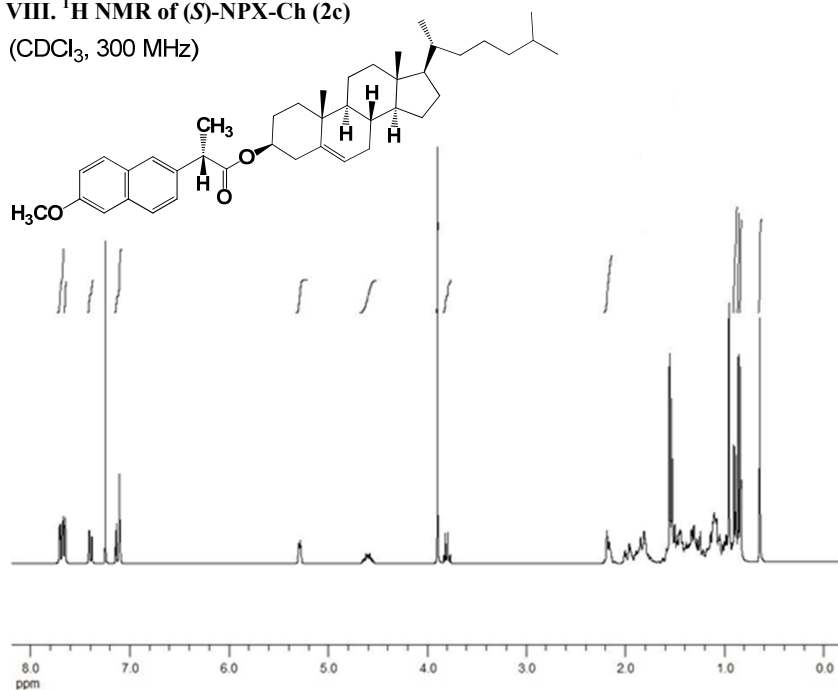
^{13}C NMR of (*R*)-NPX-Ch (2b)

(CDCl_3 , 75 MHz)



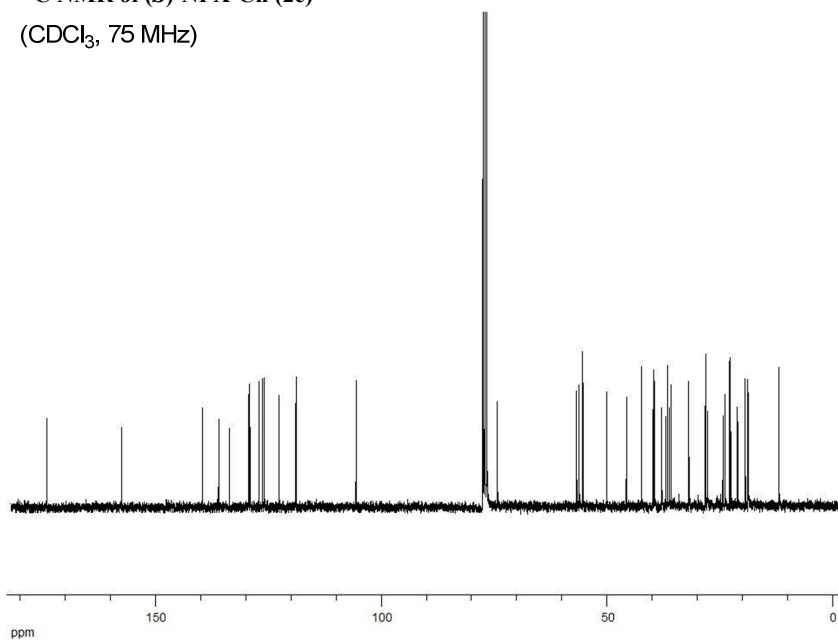
VIII. ^1H NMR of (*S*)-NPX-Ch (2c)

(CDCl_3 , 300 MHz)

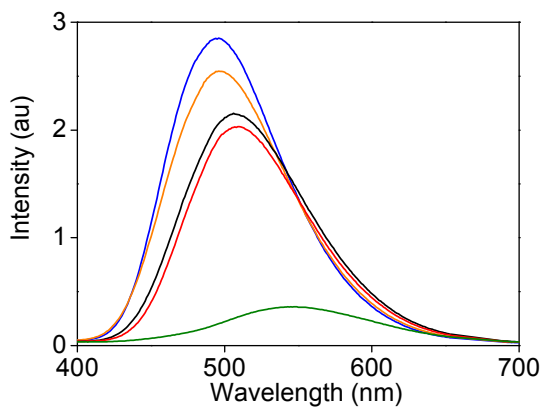


^{13}C NMR of (*S*)-NPX-Ch (2c)

(CDCl_3 , 75 MHz)

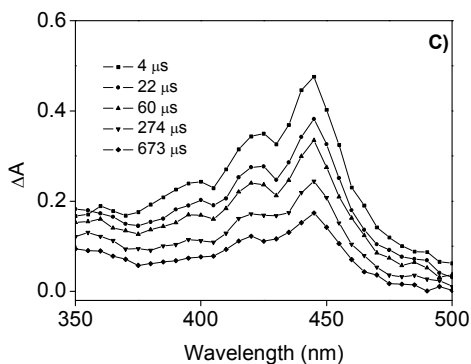
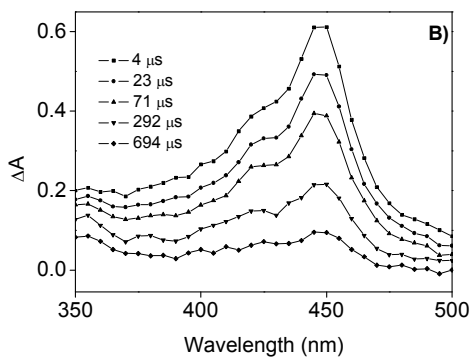
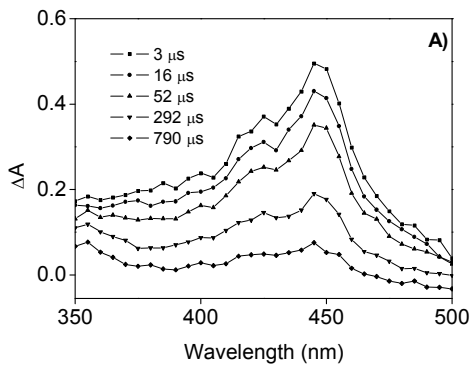


3. Fluorescence spectra of **1a** in different solvents.



Emission spectra of **1a** in dichloromethane (blue); tetrahydrofuran (orange); ethanol (black); acetonitrile (red) and aqueous 0.2 M NaCl (green). Concentration of the samples were fixed at the value of 2×10^{-5} M, under aerobic atmosphere.

4. Laser Flash Photolysis of 1b, 1c and 2c.



Transient absorption spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) obtained at different delay times after the laser pulse for A) (R)-NPX-CA, B) (S)-NPX-CA and C) (S)-NPX-Ch incorporated in mixed micelles in 0.2 M aqueous NaCl. Concentration of the samples were fixed at the value of $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.