



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Determinación de solubilidades de los ácidos
ferúlico, cumárico y cafeico en disolventes
derivados de glicerol

Autora

Andrea Muñiz Romera

Directoras

María Pilar López Ram de Viu

María Elísabet Pires Ezquerro

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias

Universidad de Zaragoza

Año 2020-2021

Abreviaturas

100: 3-Metoxi-1,2-propanodiol

200: 3-Etoxi-1,2-propanodiol

3F00: 3-(2,2,2-Trifluoroetoxi)-1,2-propanodiol

400: 3-Butoxi-1,2-propanodiol

ACN: Acetonitrilo

BmimBF₄: Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazolio

BmimPF₆: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio

BmimTOF: Trifluorometano sulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio

D100: Dímero del 3-Metoxi-1,2-propanodiol

D200: Dímero del 3-Etoxi-1,2-propanodiol

D3F00: Dímero del 3-(2,2,2-Trifluoroetoxi)-1,2-propanodiol

D400: Dímero del 3-Butoxi-1,2-propanodiol

DES: Disolventes eutécticos profundos

Digly: Diglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMF: N, N-Dimetilformamida

EG: Etilenglicol

EtOH: Etanol

Gly: Glicerol

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón

Hy: Factor hidrofílico

IL: líquido iónico

IPA: alcohol isopropílico, isopropanol o propan-2-ol

MeOH: Metanol

NADES: Disolventes eutécticos profundos naturales

PEG: Polietilenglicol

PG: Propilenglicol

R00: Monoéteres

Trigly: Triglicerol

Resumen

Hoy en día, los disolventes son de vital importancia debido a su utilidad en todo tipo de procesos industriales. Dentro de la industria cosmética y farmacéutica encontramos compuestos activos, como los ácidos hidroxicinámicos, que necesitan disolventes para poder suministrarse dentro del organismo, ya que su solubilidad en agua es insignificante. Por esa razón, este trabajo desarrolla la determinación de la solubilidad de los ácidos ferúlico, cumárico y cafeico en diferentes disolventes. El objetivo principal es sustituir disolventes convencionales provenientes de fuentes no renovables por disolventes verdes o sostenibles, en este caso derivados de glicerol. Se usaron tanto monoéteres derivados de glicerol, dímeros de los respectivos monoéteres, como disolventes comerciales: glicerol, diglicerol y triglicerol.

En primer lugar, se puso a punto la determinación de resultados mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), construyéndose rectas de calibrado para la correcta cuantificación de los diferentes hidroxiácidos en los disolventes elegidos.

En segundo lugar, se propuso un protocolo de solubilidades, modificado en el caso de los dímeros debido a problemas de manejo por su alta viscosidad. Tras la comparación de resultados obtenidos, se discuten las diferentes solubilidades en las distintas familias de disolventes relacionándolas con propiedades de los disolventes como $\log P$ y factor hidrofílico.

Por último, se detalla un estudio minucioso de RMN para la determinación de posibles interacciones soluto-disolvente. Pudiendo así dar una explicación del motivo por el que unos disolventes presentan una mayor solubilidad y descartando así estructuras moleculares para dar con el perfecto disolvente de cada ácido hidroxicinámico estudiado.

Abstract

Nowadays, solvents are of vital importance due to their usefulness in all kinds of industrial processes. In the cosmetic and pharmaceutical industry we find active compounds, such as hydroxycinnamic acids, which need solvents in order to be supplied inside the organism, as their solubility in water is negligible. For this reason, this work develops the determination of the solubility of ferulic, coumaric and caffeic acids in different solvents. The main objective is to replace conventional solvents from non-renewable sources with green or sustainable solvents, in this case glycerol derivatives. Both glycerol-derived monoethers, dimers of the respective monoethers, and commercial solvents: glycerol, diglycerol and triglycerol were used.

Firstly, the determination of results was developed using high performance liquid chromatography (HPLC), constructing calibration lines for the correct quantification of the hydroxycinnamic acid in the selected solvents.

Secondly, a solubility protocol was proposed, modified in the case of dimers due to handling problems due to their high viscosity. After the comparison of the results obtained, the differences observed in solubility values are discussed, and related to solvent properties such as log P and hydrophilic factor.

Finally, a detailed NMR study for the determination of possible solute-solvent interactions is detailed. In this way, it is possible to explain why some solvents have a higher solubility and to rule out molecular structures in order to find the perfect solvent for each hydroxycinnamic acid studied.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Objetivos y planteamiento del trabajo.....	9
4. Resultados y discusión	9
4.1. Descripción general del protocolo de solubilidad y cuantificación.....	9
4.2. Estudio de las solubilidades de ácido hidroxicinámicos en monoéteres y dímeros de éteres derivados de glicerol.	10
4.3. Estudios de log P y factor hidrofílico en disolventes.....	15
4.4. Estudios de RMN: Interacciones de los ácidos hidroxicinámicos en los disolventes estudiados.....	17
5. Parte experimental.....	20
5.1. Metodología para la cuantificación de ácidos.....	20
5.1.1. Técnicas generales e instrumentación	20
5.1.2. Calibraciones	21
5.2. Preparación de muestras para el protocolo de solubilidad y elección de disolventes.	21
5.3. Preparación de RMN para el estudio de interacciones de disolventes con los diferentes ácidos estudiados.....	22
6. Conclusiones	23
7. Bibliografía.....	23
8. Anexos.....	26
Anexo I: Tablas de datos de solubilidades expresados en mg/ml.....	26
Anexo II: Rectas de calibrado.....	35
Anexo III: Tablas de datos de los estudios de log P y factor hidrofílico	37
Anexo IV: Porcentaje de etanol en dímeros.	38
Anexo V: RMN de monoéteres de glicerol y mezclas de dímeros (Caracterización)	39
Anexo VI: RMN's de ácido ferúlico en 100, 200, 3F00, 400.....	41
Anexo VII: RMN's de ácido cumárico en 100, 200, 3F00, 400.....	43
Anexo VIII: RMN's de ácido cafeico en 100, 200, 3F00, 400.....	46
Anexo VIII: RMN's de dímeros y etanol (tras tratamiento de muestras).....	48

1. Introducción

Desde los orígenes de la industria química, los disolventes presentan una gran importancia debido a que se usan en la mayoría de las operaciones de producción, extracción y purificación, tanto en planta piloto como a gran escala. Los disolventes convencionales empleados presentan ciertas desventajas como su origen no renovable, su toxicidad y su volatilidad siendo perjudiciales para el medio ambiente. Debido a su impacto sobre la contaminación, la calidad del aire y el cambio climático se buscan disolventes sostenibles que los sustituyan y minimicen sus efectos [1]. Dentro de la industria farmacéutica y cosmética, los disolventes adquieren mayor relevancia al encontrarse compuestos activos difíciles de solubilizar para una correcta incorporación a los sistemas de nuestro organismo convirtiéndose en un desafío para la formulación de fármacos [2]. Con el objetivo de su vehiculización, es esencial el uso de disolventes y en ese contexto, su toxicidad toma todavía más importancia [3].

Los compuestos fenólicos son sustancias bioactivas presentes en una gran variedad de especies dentro del reino vegetal que presentan múltiples beneficios para la salud. Entre ellos están los llamados compuestos fenólicos insolubles, que se encuentran formando parte de las membranas celulares a través de enlaces covalentes presentando propiedades biológicas interesantes[4]. Muchos de ellos son compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, como los ácidos ferúlico, cumárico y cafeico (ver *Figura 1*). Su principal función es la prevención de enfermedades degenerativas asociadas con el daño oxidativo, además de ser antioxidantes, antimutagénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antialérgicos, entre otros. Por ello se consideran materias primas de alto valor añadido para la síntesis de fármacos, medicamentos, antisépticos... [5] Se suministran generalmente por vía dérmica pero su transporte dentro del organismo es un problema debido a su baja solubilidad, permeabilidad y estabilidad. La solubilidad va a ser uno de los parámetros críticos para lograr la concentración deseada del fármaco en la circulación sistémica consiguiendo la respuesta farmacológica requerida. Aquí es donde entran en juego los disolventes a estudiar y el estudio de sus solubilidades [2].

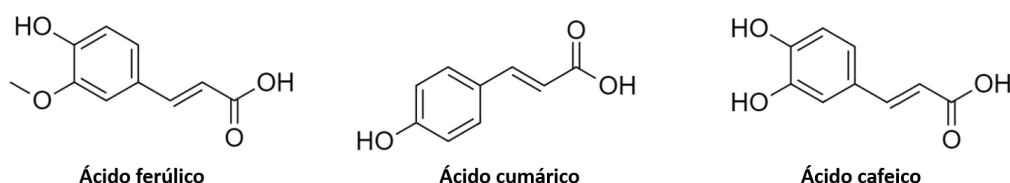


Figura 1. Estructura de los ácidos hidroxicinámicos a estudiar.

Como se comentará en el capítulo de *Antecedentes*, los estudios referentes a la solubilidad de los ácidos fenólicos, y en particular, de los ácidos hidroxicinámicos, han sido realizados principalmente en disolventes convencionales. Sin embargo, el interés por el uso de disolventes sostenibles es cada vez más notorio, de modo que la búsqueda de métodos para su uso como disolventes de compuestos activos es cada vez más relevante. Dentro de los disolventes sostenibles podemos hablar de líquidos iónicos, disolventes eutécticos profundos y disolventes derivados de materias primas renovables [6, 7].

Los líquidos iónicos (LI) son sales que funden a temperatura ambiente o cerca de ella. Entre sus ventajas cabe destacar su baja volatilidad, su estabilidad química y térmica y su elevada capacidad solvatadora [8]. No obstante, los líquidos iónicos tradicionales adolecen de desventajas como es su complicada síntesis y su origen no renovable. Como alternativa surgen los líquidos iónicos biobasados [9], formados por sales de origen renovable como las derivadas de colina y que están ganando relevancia en el campo de la formulación de fármacos.

Otra alternativa a los líquidos iónicos tradicionales son los disolventes eutécticos profundos (DES) [10]. Estos están formados por la mezcla de un compuesto dador de enlaces de hidrógeno (HBD) y un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA). La mezcla de ambos componentes en una proporción determinada muestra un punto de fusión más bajo que los de los componentes individuales. Los DES se pueden obtener a partir de componentes derivados de fuentes renovables como sales de amonio, azúcares y ácidos orgánicos adquiriendo el nombre de disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) [11]. Su producción es más sencilla y económica que los IL además de ser biodegradables y no ecotóxicos por lo general [12-14]. Muchos estudios comparan la citotoxicidad entre IL y NADES siendo menor la de esta última familia de compuestos.

También encontramos como opción sostenible los disolventes de origen renovable como el lactato de etilo, la γ -valerolactona entre otros. Dentro de este apartado podemos encontrar los disolventes derivados de glicerol.

El glicerol se caracteriza por ser un líquido incoloro, denso, viscoso e higroscópico que se encuentra de generalmente de forma natural en aceites y grasas animales y vegetales. El uso del glicerol como tal presenta la desventaja de su elevada viscosidad, por ello se suelen utilizar derivados del mismo como cetales (Solketal), ésteres, éteres, etc [15].

Los éteres derivados de glicerol pueden ser considerados estructuralmente similares a los glicoles; disolventes no renovables, como el PEG-400, propilenglicol (PG) y etilenglicol (EG). Además, la modificación de los grupos éter (número y naturaleza) en la molécula de glicerol puede dar lugar a distintas propiedades debidas a cambios de polaridad, hidrofobicidad o viscosidad de los compuestos.

En la *Figura 2* se recogen diversas estructuras de los diferentes éteres de glicerol descritos que se van a estudiar como disolventes en este trabajo; alguno de ellos comerciales y para el resto se ha puesto a punto su síntesis en el grupo de investigación de Catálisis Heterogénea en Síntesis Orgánicas Selectivas (CHESO) donde se realizó el presente trabajo [16].

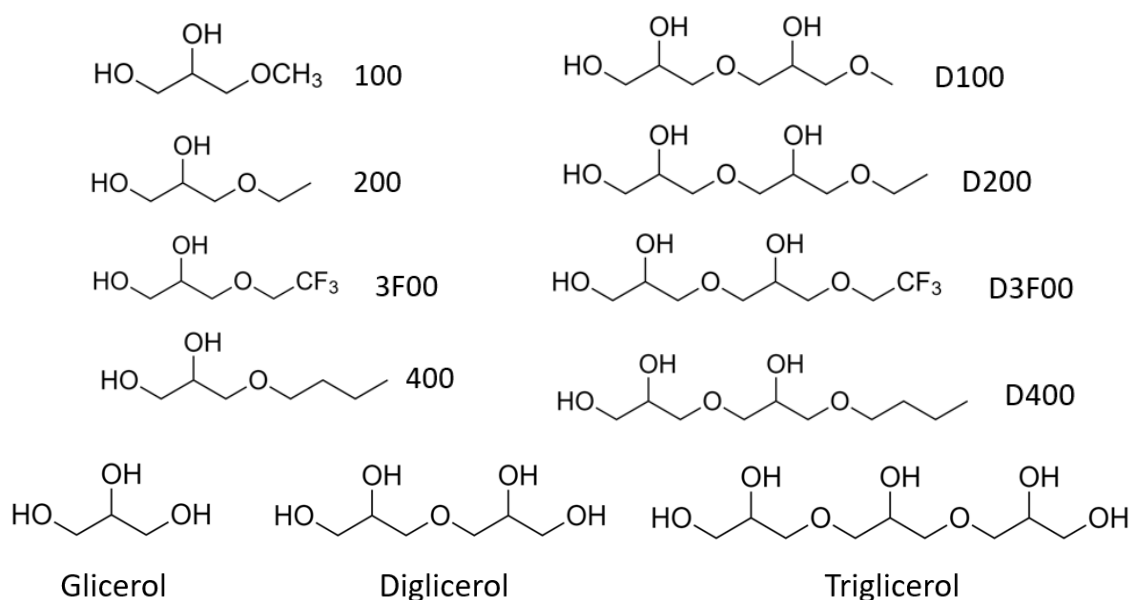


Figura 2. Estructura molecular de disolventes utilizados en este trabajo: monoéteres de glicerol, dímeros de los respectivos monoéteres y disolventes comerciales.

Una de las características más importantes de estos éteres, que permite considerarlos como disolventes verdes, a parte de su origen renovable, es su baja ecotoxicidad. Los estudios de ecotoxicidad, con diversos marcadores, permiten clasificar estos compuestos como no tóxicos según la clasificación de Passino-Smith [17-18].

Todo esto hace que en este trabajo se haya planteado el estudio de la solubilidad de distintos ácidos hidróxicinámicos en estos derivados de glicerol, basándose en resultados previos de estudios de solubilidad en glicoles para este tipo de compuestos y que se pasarán a describir a continuación.

2. Antecedentes

Hasta la fecha, existen publicaciones relacionadas con el uso de disolventes para la vehiculización de ácidos hidroxicinámicos, pero casi todas ellas en disolventes convencionales como PEG-400, DMSO, etanol y metanol entre otros [19]. También se encuentran referencias de estudios en líquidos iónicos clasificados como disolventes sostenibles [20], en cambio, no hay resultados documentados en disolventes renovables derivados de glicerol. A continuación, se describirán con detalle los resultados relevantes prestando especial atención al protocolo de solubilidad aplicado.

Boas et al. [21,22] describen la determinación de solubilidades de ácidos fenólicos diferentes a los de nuestro estudio (ácidos vanílico, verático, sirínico, gálico entre otros) en disolventes tradicionales como agua, MeOH, EtOH, isopropanol (IPA), propanol, butanona, acetato de etilo, ACN, DMF. Para ello, preparan disoluciones saturadas en matraces, sonicán durante 1 hora y agitan en un baño termostatzado. Determinan las condiciones óptimas de agitación tomando muestras cada cierto tiempo y cuantificándolas, siendo diferentes para los distintos grupos de ácidos (24 horas de agitación y 8 horas de asentamiento para los derivados del ácido benzoico con todos los hidroxilos libres, o 30 horas de agitación y 12 horas de asentamiento para los derivados que tienen grupos metoxi sobre el anillo aromático). Transcurrido el tiempo necesario para llegar al equilibrio, las muestras se microfiltran. Para su cuantificación aplican un método gravimétrico con balanza analítica; para aquellos ácidos que no es compatible una cuantificación gravimétrica, la solubilidad se determina por espectroscopía UV-Vis a 258 nm. Los datos se expresan en g de soluto/100 g de disolvente. Respecto a los derivados con grupos metoxi en el anillo, todos muestran una mayor solubilidad en DMF seguida de metanol y la menor solubilidad se presenta con agua. Respecto a los derivados del ácido benzoico con OH libres también alcanzan la solubilidad máxima en DMF, siendo también muy buena en MeOH con valores muy próximos. La solubilidad en ACN es menor que incluso en agua.

Una investigación más reciente [23] incorpora datos de solubilidad del ácido cinámico, ferúlico y cumárico usando el mismo protocolo. En todos los casos la solubilidad es mayor en alcoholes (metanol y etanol) y considerablemente menor en agua como se observaba en los derivados de ácido benzoico. El ácido ferúlico y ácido cumárico presentan solubilidades similares, pero en sistemas que contienen alcoholes el orden de solubilidad es ácido cumárico > ácido ferúlico. En disolventes polares no asociativos

como ACN y acetato de etilo, el ácido ferúlico presenta solubilidades más altas por la presencia de grupo metoxi que parece incrementar las interacciones soluto-disolvente.

Centrándonos ya en los estudios de solubilidad de los ácidos hidroxicinámicos, se ha podido comprobar que el ácido ferúlico posee una mayor documentación respecto a estudios de solubilidad con respecto al ácido cafeico y ácido cumárico. Respecto a la solubilidad del ácido ferúlico, es de destacar el trabajo de Shakeel et al. [19] El protocolo seguido para la determinación de solubilidades comienza por agitar las mezclas de soluto y disolvente en un vórtex antes de pasar a un agitador orbital a 100 rpm durante 72 horas, tiempo en el que se ha alcanzado ya el equilibrio y las muestras no se solubilizan más. El sobrenadante se cuantifica por HPLC-UV a 322 nm. Los resultados expresados en términos de fracción molar indican que la máxima solubilidad alcanzada se consigue con PEG-400 seguida de DMSO. Con disolventes como EG, PG, MeOH y EtOH se obtienen solubilidades con el mismo orden de magnitud siendo la solubilidad en agua es casi nula.

Con respecto al ácido cafeico y cumárico, Ji et al. [24-25] describen protocolos de solubilidad con algunos disolventes comunes como MeOH, EtOH, propanol, IPA, butanol, isobutanol, acetona y acetato de etilo. Para ello, colocan las muestras con los disolventes en erlenmeyers sobre un agitador orbital, asegurando un control de la temperatura. Sus condiciones óptimas para alcanzar el equilibrio de saturación de las muestras fueron en todos los casos 72 horas de agitación y 12 horas de asentamiento. La cuantificación se lleva a cabo a través de un método gravimétrico filtrando el sobrenadante y registrando su diferencia de peso con el disolvente usado para así proceder al cálculo de su fracción molar. Como mejores disolventes encontramos etanol y metanol, aunque cabe destacar que en este estudio no se cuantifica la solubilidad en PEG-400.

Las solubilidades en agua de los ácidos hidroxicinámicos no son buenas en general, por eso es importante el estudio de otros disolventes. Este tipo de compuestos activos muestran sus propiedades en medios biológicos, donde el agua está involucrada como disolvente natural. Por ello, se ha estudiado también su solubilidad en sistemas binarios con agua, que pueden permitir una mejor dosificación de los compuestos activos [26].

Así encontramos estudios de solubilidad del ácido ferúlico en mezclas de PEG-400/agua [27] o IPA/agua [28]. Como método de solubilidad, en ambos casos preparan disoluciones con diferentes mezclas binarias en ácido ferúlico. Las muestras se agitan en un vórtex (5 minutos para las de PEG-400/ agua y 10 minutos para las de IPA/agua) y se llevan a un

agitador orbital durante 72 horas a 100 rpm, tiempo al que se alcanza su máxima solubilidad. Finalmente, el sobrenadante se cuantifica por HPLC-UV a 322 nm. Se llega a la conclusión de que con IPA puro se obtienen los mejores resultados ya que a medida que aumentamos las proporciones de IPA en agua la solubilidad mejora. Del mismo modo, en PEG puro se obtiene la máxima solubilidad disminuyendo cuanto mayor porcentaje en agua contenga la mezcla binaria.

En el caso de los ácidos caféico y cumárico, en los artículos ya mencionados anteriormente [24,25] encontramos descrita la solubilidad en mezclas binarias con agua/EtOH llegando a la misma conclusión que la descrita para el ácido ferúlico con mezclas binarias, que la solubilidad máxima se alcanza cuanto menos porcentaje de agua contenga la mezcla. En ninguno de los estudios señalados se observan efectos de hidrotropía para estas mezclas, siendo esta el fenómeno por el cual la solubilidad en agua de un soluto se incrementa por la adición de un segundo disolvente. Aquí los solutos son, simplemente, más solubles en disolventes orgánicos que en agua.

A continuación, se muestra la tabla en la que se recogen, a modo de resumen, los protocolos seguidos para la determinación de la solubilidad y todos los resultados de solubilidad expresados en fracciones molares de los distintos trabajos consultados y que servirán como referencia para este trabajo.

Bibliografía	Soluto	Disolventes	X	Método de agitación	Determinación de resultados
Vilas Boas et al.	Derivados de ácido benzoico con OH libres	MeOH, EtOH, propanol, IPA, AcEt, ACN, DMF, agua	Datos expresados en g de soluto/100 g de disolvente	Sonicar (1 h) + Agitador orbital (24 h) + Reposo (8 h)	Espectroscopía UV-vis ($\neq \lambda$ según el ácido analizado)
	Derivados con grupos metoxi en el anillo aromático	MeOH, EtOH, propanol, IPA, AcEt, ACN, DMF, agua...		Sonicar (1 h) + Agitador orbital (30 h) + Reposo (12h)	
	Ácido cinámico, Ácido cumárico, Ácido ferúlico	MeOH, EtOH, propanol, IPA, AcEt, ACN, agua		Sonicar (1 h) + Agitador orbital (32 h) + Reposo (15h)	

Bibliografía	Soluto	Disolventes	X	Método de agitación	Determinación de resultados
Shakeel et al.	ácido ferúlico	Agua	0.0000489	Vortex + agitador orbital (72 h a 100 rpm) + Reposo (12 h)	HPLC-UV a 322 nm
		MeOH	0.0249		
		EtOH	0.0241		
		IPA	0.0195		
		EG	0.0207		
		PG	0.0263		
		PEG-400	0.154		
Shakeel et al.	ácido ferúlico	DMSO	0.0526	Vortex + agitador orbital (72 h a 100 rpm) + Reposo (12 h)	HPLC-UV a 322 nm
		butanol	0.0161		
Haq et al.	ácido ferúlico	isobutanol	0.0168	Vortex + agitador orbital (72 h a 100 rpm) + Reposo (12 h)	HPLC-UV a 322 nm
		PEG-400/agua (50:50)	0.00278		
Haq et al.	ácido ferúlico	IPA/agua (50:50)	0.00098	Vortex + agitador orbital (72 h a 100 rpm) + Reposo (12 h)	HPLC-UV a 322 nm
Ji et al 2016	ácido cumárico	MeOH	0.0395	Agitador orbital (72 h) + Reposo (12 h)	Método gravimétrico
		EtOH	0.0456		
		IPA	0.0331		
		butanol	0.0371		
		isobutanol	0.0226		
		EtOH + agua (50:50)	0.0145		
	ácido cafeico	MeOH	0.01778	Agitador orbital (72 h) + Reposo (12 h)	Método gravimétrico
		EtOH	0.01843		
		IPA	0.01308		
		butanol	0.01028		
		isobutanol	0.00569		
		EtOH + agua (50:50)	0.00513		

Tabla 1: Estudios publicados hasta la fecha sobre solubilidades de ácidosfenólicos: protocolo y fracciones molares.

Se puede observar una tendencia respecto a los 3 ácidos en aquellos resultados con los mimos disolventes como etanol, metanol, IPA, butanol e isobutanol viendo que el ácido cumárico es el más soluble, seguido del ácido ferúlico y siendo el cafeico el que presenta una menor solubilidad.

En cuanto a la solubilidad en disolventes verdes, Alevizou y Voutsas [20], junto con la corrección de sus resultados por Xu et al. [29], determinan la solubilidad de cafeico y cumárico en líquidos iónicos entre los cuales se destacan derivados de alquil-3-metilimidazonio como BmimPF₆, BmimBF₄ y BmimTFO. Para la determinación de la

solubilidad usan tubos Eppendorfs agitados a 1400 rpm hasta alcanzar el equilibrio durante 64 a 84 horas, un tiempo bastante más elevado con respecto a otras referencias debido a que la viscosidad de los líquidos iónicos es mayor con respecto a los convencionales. Seguidamente, se centrifugan las muestras para favorecer la separación entre fases (líquido y sólido) y se cuantifican por HPLC-UV a 320 nm. Como resultados se obtienen valores de solubilidad a 30°C donde BmimBF₄ proporciona la mayor solubilidad, superando a disolventes convencionales también estudiados como pentanol y acetato de etilo. Hasta la fecha no se han publicado estudios de solubilidad de ácidos fenólicos en DES, habiendo sido empleados únicamente por Dai et al. [30] como medio de extracción.

Aunque no se ha estudiado la solubilidad de ácidos hidroxicinámicos en éteres derivados de glicerol, sí se ha llevado a cabo un estudio de efectividad de estos disolventes en mezclas binarias con agua [31,32] para los ácidos gálico y siríngico. El protocolo seguido en este caso fue la agitación de las disoluciones en un medio termostatzado durante 72 h o bien en tubos Eppendorfs con agitación en vórtex, o bien en viales con mesa de agitación. Estos estudios muestran la existencia de un efecto hidrotópico, siendo este mayor cuando se usan éteres de glicerol/agua que en las correspondientes mezclas binarias agua/disolventes convencionales (EtOH, MeOH, IPA o ACN). Este estudio revela así mismo la influencia de la naturaleza de los sustituyentes de los éteres derivados de glicerol en el efecto hidrotópico observado.

Como se puede apreciar, no son muchos los estudios referentes a la solubilidad de ácidos hidroxicinámicos en disolventes no convencionales. La experiencia del grupo de investigación en la síntesis, la caracterización y uso de éteres derivados de glicerol y el hecho de que su estructura sea similar a disolventes como el PEG, EG o PG, en los que las solubilidades alcanzadas son de las más altas entre los disolventes convencionales, nos ha hecho plantear este trabajo para estudiar el uso de disolventes derivados de glicerol como una alternativa más sostenible para la vehiculización de los compuestos activos descritos.

Como se ha mencionado en la introducción, los disolventes elegidos van a ser monoéteres de glicerol (R00), es decir, moléculas de glicerol a las que se le ha sustituido el hidrógeno de uno de sus grupos hidroxilos terminal por grupos metilo, etilo, butilo entre otros (*Figura 2*). Se eligen estos compuestos por su accesibilidad, inercia química, baja toxicidad y fácil diseño de una gran variedad de estructuras y propiedades (polaridad,

capacidad de formar enlaces de hidrógeno, hidrofobicidad, etc). Esta modulación de propiedades en función de la estructura nos permitirá sacar conclusiones acerca de la influencia de los distintos factores en la solubilidad de los compuestos objeto de estudio.

Además, se estudiarán como posibles disolventes los dímeros derivados de estos monoéteres. Estos dímeros son corrientes residuales de la síntesis de los monoéteres, y se forman mayoritariamente durante el proceso de purificación de estos por destilación.

3. Objetivos y planteamiento del trabajo

El objetivo principal es el estudio de solubilidad de los ácidos ferúlico, cumárico y cafeico en diferentes compuestos derivados de glicerol. Se tratan de ácidos hidroxicinámicos seleccionados por sus propiedades e importancia en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Los disolventes a estudiar son monoéteres alquílicos de glicerol y sus respectivos dímeros obtenidos como subproducto de sus síntesis y purificación. Se trata de compuestos polares con una parte hidrofóbica y similares estructuralmente al propilenglicol y polietilenglicol por lo que pueden presentar propiedades de solubilidad y comportamientos similares. Para lograr el objetivo principal del trabajo el planteamiento es el siguiente:

1. Puesta a punto de un protocolo de solubilidad junto con la cuantificación de la misma para cada ácido, basándonos en el estudio con PEG-400 realizado en el Trabajo de Fin de Grado [33] que antecede a este presente estudio, con pequeñas modificaciones.
2. Aplicación del protocolo a la solubilidad de los tres ácidos, tanto en los monoéteres de glicerol como en sus respectivos dímeros.
3. Comparación de los datos experimentales obtenidos.
4. Estudio y comparación de los espectros de RMN de los solutos, de los distintos disolventes derivados de glicerol y de las disoluciones.

4. Resultados y discusión

4.1. Descripción general del protocolo de solubilidad y cuantificación.

El protocolo de solubilidad se puso a punto utilizando PEG-400 como disolvente de referencia. Para realizar las medidas de solubilidades es necesario llegar a la saturación de las disoluciones. En el caso de la solubilidad en PEG-400, se calculan las cantidades de soluto requeridas basándonos en referencias de los valores de la literatura y en los

datos obtenidos en el Trabajo de Fin de Grado que antecede al presente trabajo [33], añadiendo siempre algo más de soluto para asegurar que se alcanza su saturación. Estas disoluciones saturadas se preparan por triplicado manteniéndolas en agitación orbital a 25°C durante 72 horas. El protocolo detallado se recoge en la *Parte Experimental*.

La determinación de la solubilidad se lleva a cabo por HPLC, inyectando 10 µL de las muestras diluidas y midiendo la absorción UV de los picos correspondientes. Las muestras se sonicán previamente para evitar la formación de agregados y obtener picos más uniformes. De cada muestra se realizaron cuatro inyecciones diferentes, para asegurar un número de datos suficiente para que los resultados sean más fiables. El protocolo aplicado (dilución de muestras, sonicación, método cromatográfico específico y rectas de calibrado para cada ácido) es una modificación del desarrollado en el Trabajo de Fin de Grado ya comentado. Los datos cromatográficos concretos para cada ácido se recogen en el apartado *Parte experimental*.

Utilizando las rectas de calibrado para cada uno de los ácidos estudiados (ver apartado *Parte Experimental*) se determinan los mg disueltos en cada muestra, y las concentraciones en mg/mL considerando las disoluciones realizadas.

En el caso de los dímeros de éteres de glicerol, diglicerol y triglicerol, cuyas viscosidades son muy elevadas fue necesario modificar ligeramente el protocolo. Se prepararon disoluciones de estos compuestos en etanol. Se eligió el etanol como diluyente por la baja solubilidad de los ácidos ferúlico, cafeico y cumárico en él, como se plasma en la tabla del apartado *Antecedentes*. Así, se intenta que influya de forma mínima en la solubilidad de los ácidos, y, por tanto, en los resultados obtenidos. Una vez preparadas las muestras ternarias soluto/disolvente/EtOH, se evapora el etanol en el rotavapor quedando así la disolución saturada del ácido correspondiente en el disolvente elegido.

4.2. Estudio de las solubilidades de ácido hidroxicinámicos en monoéteres y dímeros de éteres derivados de glicerol.

Una vez puesto a punto el protocolo experimental para la medida de solubilidades de ácidos hidroxicinámicos escogidos (*Figura 1*), se procedió al estudio de las mismas con los disolventes derivados de glicerol seleccionados (*Figura 2*). En la siguiente tabla se recoge la media de las medidas de solubilidad realizadas expresadas en mg/mL. Los datos presentan una DSR menor del 10% en todos los casos excepto en el 200 en ferúlico, esta

desviación puede deberse a fallos en el tratamiento de la muestra ya sea por el control de temperatura o a la hora del microfiltrado de muestras.

Disolvente	ÁCIDO FERÚLICO		ÁCIDO CUMÁRICO		ÁCIDO CAFEICO	
	mg/mL	DSR (%)	mg/mL	DSR (%)	mg/mL	DSR (%)
100	109.97	3.97	142.28	3.82	75.63	5.78
200	85.72	16.44	138.24	3.52	61.00	3.96
3F00	79.48	3.63	22.53	4.03	-	-
400	57.84	8.73	98.04	7.05	31.01	9.09
D100	117.74	5.70	193.24	6.93	94.41	7.44
D200	105.43	6.58	172.58	8.19	83.65	8.61
D3F00	56.02	6.73	96.06	4.55	31.62	5.08
D400	95.85	6.70	163.86	7.17	73.66	4.18
Glicerol	12.01	0.77	25.1	7.16	-	-
Diglicerol	58.95	3.65	95.76	5.10	53.75	5.81
Triglicerol	84.26	7.48	99.19	8.32	60.54	9.40

Tabla 2: Datos de solubilidad (mg/mL) obtenidos en los disolventes estudiados.

De forma general, hay una misma tendencia en el orden de solubilidad de los ácidos fenólicos estudiados que se cumple independientemente del tipo de disolvente utilizado: el ácido cumárico es el más soluble en cualquiera de los disolventes ensayados, seguido del ácido ferúlico y por último el ácido cafeico. Este hecho coincide con los datos reflejados en la bibliografía para disolventes convencionales (*Tabla 1*). Como ya se ha visto en la introducción, los tres ácidos difieren en la sustitución en el anillo aromático: el ácido cumárico solo tiene un OH en posición *para* al enlace etilénico, el ácido ferúlico tiene además un grupo metoxi en posición *meta*, y el ácido cafeico tiene dos grupos OH, uno en posición *para* y otro en *meta*. Es posible que la facilidad del ácido cumárico para formar enlaces de hidrógeno con los disolventes a través de su grupo hidroxilo se vea disminuida tanto en el ácido ferúlico como en el cafeico por la presencia de los grupos metoxi e hidroxilo, respectivamente, en posición *meta*. Estos grupos adicionales pueden dificultar el enlace de hidrógeno entre soluto y disolvente no solo por un efecto estérico, sino también (y posiblemente sea este el efecto más importante) por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular fuerte en el soluto que disminuya la posibilidad de interaccionar con los hidroxilos del disolvente.

Para comparar los datos obtenidos con los de la literatura es necesario calcular las fracciones molares de las disoluciones saturadas a partir de los datos de la *Tabla 2*. El cálculo de la fracción molar se puede llevar a cabo de dos formas. La primera, a partir de

los espectros de RMN de las disoluciones saturadas, se basa en la obtención de la relación molar entre el hidroxiaácido y en disolvente usado en cada caso.

La segunda opción se realiza pesando un volumen conocido de la disolución saturada (10 μ L), ya que junto con el dato de mg de soluto (ácido ferúlico, cumárico o cafeico) obtenido por HPLC se puede calcular la masa del disolvente necesaria para calcular la fracción molar. Los datos obtenidos por ambas vías eran similares, lo que corrobora la validez de los métodos. Para la discusión de resultados usaremos fracciones molares obtenidas de la segunda forma. A continuación, las tablas recogen los resultados obtenidos de *solubilidad de ácido ferúlico* con los disolventes derivados de glicerol junto con referencias de otros disolventes recogidos en la bibliografía.

Disolvente	X	Disolvente	X
Agua	0.0000489	100	0.0618
MeOH	0.0249	200	0.0732
EtOH	0.0241	3F00	0.0168
IPA	0.0195	400	0.0605
EG	0.0207	D100	0.1267
PG	0.0263	D200	0.1423
PEG-400	0.1540	D3F00	0.0172
DMSO	0.0526	D400	0.1234
butanol	0.0161	Glicerol	0.0074
isobutanol	0.0168	Diglicerol	0.0907
PEG-400 + agua (50:50)	0.00278	Triglicerol	0.1406

Tabla 3: Fracciones molares de ferúlico en: disolventes convencionales (a la izquierda) y disolventes estudiados derivados de glicerol (a la derecha).

Debidos a su similitud estructural podemos comparar la familia de los monoéteres derivados de glicerol con etilenglicol y propilenglicol. En este primer caso, podemos afirmar que la solubilidad en monoéteres, exceptuando el monoéter perfluorado, es mucho mejor que para esos compuestos comerciales siendo hasta tres veces mayor.

Por otro lado, podemos comparar los dímeros con PEG-400. Estos dímeros siguen un mismo orden de magnitud en solubilidad, pero no se supera la solubilidad en el disolvente comercial. Al llevar a cabo un estudio por ^1H -RMN de las disoluciones: en el caso de los dímeros, se observa que la eliminación de etanol en el rotavapor no había sido total, como se ve, a modo de ejemplo, en el espectro de RMN de la *Figura 3* (el resto de RMN están recogidos en el *Anexo VIII*).

Ya que la espectroscopía de ^1H -RMN es cuantitativa, se puede calcular la cantidad de etanol presente en el disolvente utilizando la integración de una señal correspondiente a etanol y otras del disolvente, como queda indicado en el ejemplo de la figura 3 (señal 11 de CH_3 del etanol frente a la señal 10 del CH_3 del disolvente).

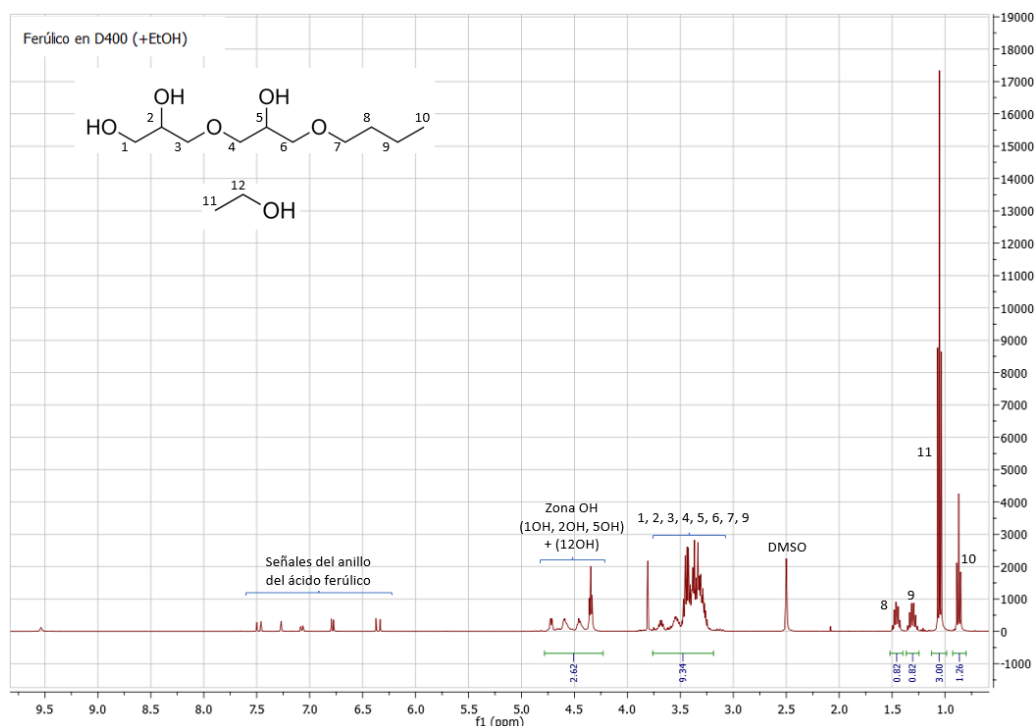


Figura 3: Ejemplo de uno de los espectros RMN obtenidos: ácido ferúlico en dímero 400.

Este cálculo por RMN se llevó a cabo en las disoluciones de todos los ácidos en todos los dímeros comprobando que presentaban dando porcentajes del 50% de etanol en moles en la mayor parte de los casos (*Tabla A10 Anexo IV*), lo que representa valores de hasta el 28% en peso (*Tabla A11 Anexo IV*).

Este hecho puede afectar a los valores de solubilidad observados en los dímeros y sería de esperar que, si se consigue eliminar el etanol en su totalidad, los valores de solubilidad mejorasen debido a que la solubilidad de los ácidos hidroxicinámicos escogidos son un orden de magnitud menores en etanol. Esto es válido tanto para las solubilidades del ácido ferúlico ya comentadas, como para las de los ácidos cumárico y cafeico que se comentarán a continuación.

Para los dos ácidos hidroxicinámicos restantes encontramos referencias recogidas en el apartado *Antecedentes* (*Tabla 1*). Lamentable en la bibliografía del ácido cumárico y caféico no dispone de datos de solubilidad en EG, PG y PEG, por lo que no se puede

llevar a cabo el mismo estudio que para el ácido ferúlico. Por lo que, a partir de ahora, compararemos el ácido cafeico y el ácido cumárico teniendo en cuenta tanto las referencias como las solubilidades del ácido ferúlico obtenidas.

ÁCIDO FERÚLICO		ÁCIDO CUMÁRICO		ÁCIDO CAFEICO	
Disolvente	X	Disolvente	X	Disolvente	X
100	0.0618	100	0.1267	100	0.0597
200	0.0732	200	0.1423	200	0.0530
3F00	0.0168	3F00	0.0172	3F00	-
400	0.0605	400	0.1234	400	0.0380
D100	0.1267	D100	0.2437	D100	0.1203
D200	0.1423	D200	0.1987	D200	0.1323
D3F00	0.0172	D3F00	0.1495	D3F00	0.0473
D400	0.1234	D400	0.3131	D400	0.1392
Glicerol	0.0074	Glicerol	0.0105	Glicerol	-
Diglicerol	0.0907	Diglicerol	0.1246	Diglicerol	0.0770
Triglicerol	0.1406	Triglicerol	0.2519	Triglicerol	0.1405

Tabla 4: Fracciones molares de los diferentes disolventes de los ácidos hidroxicinámicos estudiados.

A continuación, se analizan los resultados dentro de cada familia de disolventes estudiados. Si realizamos una comparación estructural, los monoéteres provienen de la sustitución de un hidrógeno de un grupo hidroxilo por un radical orgánico, mientras que los dímeros se pueden considerar como derivados del diglicerol, en el que se ha llevado a cabo una sustitución similar. Dicho esto, podemos observar que, para todos los solutos, la solubilidad de los ácidos en el monoéter 100 es mucho mayor que en glicerol, aproximadamente en una escala de diez veces superior, y que la solubilidad en el dímero D100 siguiendo la misma tendencia (entre 1,5 y 2 veces mayor) siendo este el mejor disolvente dentro de la familia de dímeros. Además, la solubilidad en los dímeros siempre suele ser mayor que en los correspondientes monómeros.

Estos resultados parecerían indicar que, al aumentar la parte hidrófoba de la molécula, el derivado de glicerol se comporta como un mejor disolvente. Sin embargo, si comparamos la solubilidad entre los monoéteres, no siempre un aumento en el tamaño de la cadena alquílica (aumento de la parte hidrófoba) va acompañado de un aumento de la solubilidad de los solutos (*Tabla 4*). Lo mismo pasa en los dímeros, que la mayor solubilidad no siempre se da para los que tienen la cadena más larga. Los disolventes perfluorados son disolventes polares hidrófobos, que podría haber sido un factor determinante para la mejora de la solubilidad, pero finalmente han sido los peores disolventes estudiados en

todos los casos (en algunos fue imposible determinar su solubilidad, como se ve en la tabla, puesto que sus valores no entraban en el rango de la recta de calibración utilizada).

Por lo tanto, la hidrofobicidad de los sustituyentes por sí sola no explica la solubilidad. El otro hecho a la vez común y variable para todos los disolventes estudiados es la presencia de grupos OH en su estructura.

4.3. Estudios de log P y factor hidrofílico en disolventes

Puesto que parece que los enlaces de hidrógeno a través los de los grupos hidroxilo de los solutos y disolventes, así como la hidrofobicidad de las moléculas, parecen influir en la solubilidad de los hidroxiácidos escogidos, vamos a estudiar la correlación entre la solubilidad y alguna propiedad que pueda medir estos efectos. En este sentido, de las variables que relacionan la capacidad que posee un disolvente para solubilizar, vamos a estudiar el *factor hidrofílico* y el *log P*. El *factor hidrofílico* es un descriptor específico indicador de la afinidad por el agua basado en la proporción de grupos hidrófilos sobre el total de átomos de la molécula. Estos valores serán mayores cuanto más hidrófilo sea el disolvente. En cuanto al *log P* (coeficiente de reparto octanol/agua) es lo que define la hidrofobicidad de un compuesto y puede usarse para predecir la miscibilidad de un disolvente en agua de una forma aproximada además de estimar la solubilidad con otro disolvente [34].

A continuación, se muestran una serie de gráficas organizadas por familias de disolventes estudiadas: monoéteres (100; 200; 3F00; 400), dímeros (D100; D200; D3F00; D400) y disolventes comerciales (glicerol, diglicerol y triglicerol) que representan los valores de solubilidad frente a los dos parámetros descritos. Si las solubilidades se expresan en mg/mL, se puede observar una buena correlación con ambos parámetros.

Las tablas correspondientes a las gráficas se recogen en el *Anexo III*. Los datos obtenidos de *log P* y *factor hidrofílico* (*Hy*) se obtuvieron utilizando el software T.E.S.T. EPA (Toxicity Estimation Software Tool) versión 4.2.1.

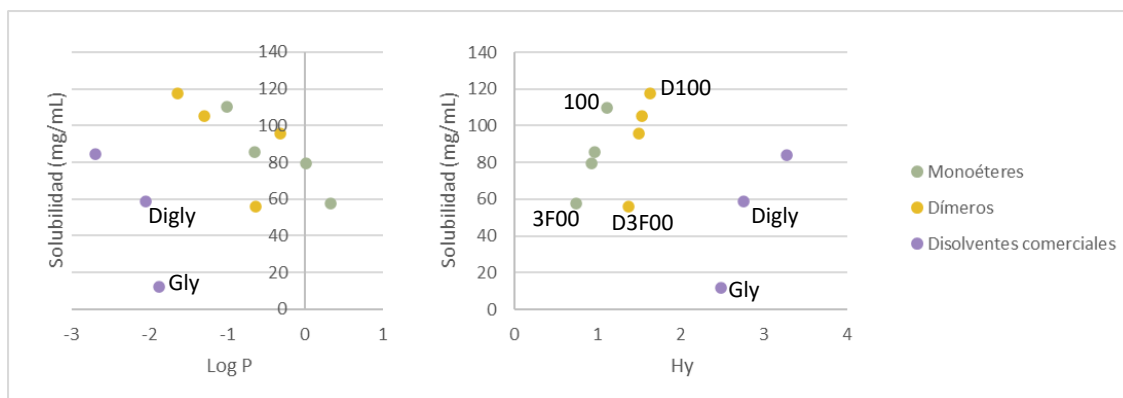


Figura 4: Gráficas de $\log P$ y factor hidrofílico para ácido ferúlico.

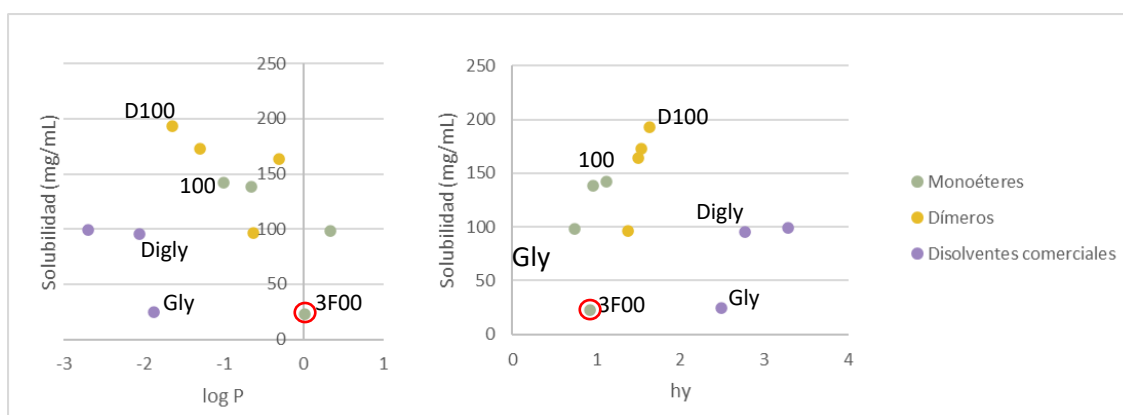


Figura 5: Gráficas de $\log P$ y factor hidrofílico para ácido cumárico.

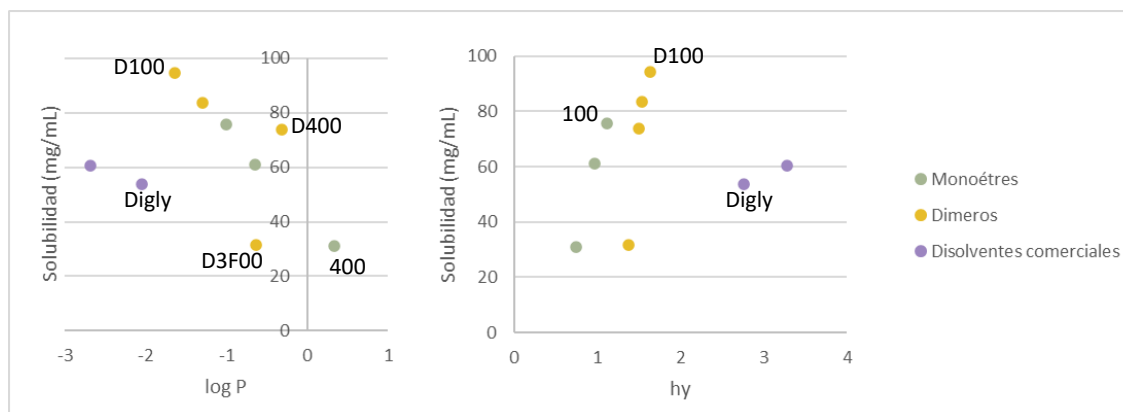


Figura 6: Gráficas de $\log P$ y factor hidrofílico para ácido cafeico.

Se observa, por grupos de familias, una relación lineal entre la solubilidad y el factor hidrofílico, Hy . Así, los disolventes con menor Hy presentan menores valores de solubilidad, esto es, los disolventes fluorados, 3F00 y D3F00, y el glicerol. Los valores

máximos de solubilidad coinciden con los máximos de H_y , como es el caso del 100 y D100.

Por el contrario, la relación entre el $\log P$ y la solubilidad parece ser global, sin distinciones entre monoéteres y dímeros, aunque gráficamente estén representadas agrupadas por familias. A mayor hidrofobicidad, menor solubilidad. De esta tendencia solo se desvían los disolventes perfluorados; D3F00 y 3F00. Los disolventes comerciales; glicerol, diglicerol y triglicerol se relacionan linealmente disminuyendo la solubilidad cuanto mayor es su $\log P$ (y mayor masa molecular presenta el disolvente), pero no se pueden comparar con los monoéteres y los dímeros.

En conclusión, las gráficas anteriores indican que el conocimiento de los valores de *factor hidrofílico* o de $\log P$ pueden servir como indicadores para predecir la solubilidad de los ácidos hidroxicinámicos estudiados en una familia concreta de disolventes que mantengan un esqueleto molecular común y varíe únicamente la naturaleza de sus sustituyentes.

4.4. Estudios de RMN: Interacciones de los ácidos hidroxicinámicos en los disolventes estudiados

Los valores de solubilidad estudiados van a venir condicionados por las interacciones entre el soluto y el disolvente, y, por tanto, pueden verse reflejados en espectros RMN de las disoluciones saturadas obtenidas. Así seremos capaces de ver las modificaciones que sufren tanto las señales del soluto como las del disolvente en las disoluciones, lo que puede ayudarnos a entender qué tipo de interacciones se establecen entre ellos.

Se realizaron ^1H -RMN en DMSO de los tres solutos puros y de cada uno de los monoéteres de glicerol, y además se estudió por RMN cada una de las correspondientes disoluciones saturadas de cada uno de los ácidos en los disolventes estudiados. Los RMN se hacen en DMSO porque en este disolvente los OH se acoplan con los CH del esqueleto carbonado dando lugar a señales desdobladas (resueltas), observándose también el acoplamiento en las señales de los CH y CH_2 del esqueleto carbonado. Todos los RMN realizados se encuentran detallados en los *Anexos V, VI, VII y VIII*.

En el espectro de los disolventes, las señales destacadas son los dos OH de cada monoéter, que se ven en una zona limpia del espectro (4.3-4,7 ppm) y pueden verse afectados por la interacción soluto-disolvente; y la señal del CH del esqueleto de glicerol que también se

ve en una zona limpia (3,55 ppm), y cuya multiplicidad variará si se acopla con el OH o no: si se acopla con el OH dará un sextuplete, si no lo hace dará un quintuplete.

Seguidamente encontramos una tabla para cada soluto estudiado que recoge las señales más representativas con posibilidad de sufrir cambios con respecto a la señal obtenida del compuesto puro.

Espectros	Señales propias del ácido ferúlico		Señales propias del disolvente	
	12 ppm Señal -OOH	9.5 ppm Señal OH	4.3-4.7 ppm Zona OH	3.55 ppm Señal CH del esqueleto
Ferúlico en 100	no aparece	aparece	señales no resueltas (doblete ancho)	quintuplete
Ferúlico en 200	no aparece	aparece	señales no resueltas (doblete ancho)	quintuplete
Ferúlico en 3F00	no aparece	aparece	señales resueltas (doblete y triplete)	multiplete
Ferúlico en 400	no aparece	aparece	señales no resueltas (doblete ancho)	quintuplete

Tabla 5: Señales representativas de los RMN's recogidos en el anexo IV.

En el espectro del ácido ferúlico puro vamos a encontrar, como señales características, la señal del hidrógeno fenólico y la del grupo ácido. Si estos OH forman enlaces de hidrógeno inter- o intramoleculares, y están en rápido intercambio, las señales pueden no aparecer. Estas señales se ven claramente en el espectro del soluto puro. Sin embargo, en las disoluciones, la señal del grupo ácido no aparece, por lo tanto, se puede suponer que está interviniendo en interacciones soluto-disolvente. El OH fenólico posiblemente no interaccione con el disolvente en una extensión tan grande, puesto que su señal continúa viéndose, probablemente porque tiene la posibilidad de formar un enlace de hidrógeno intramolecular con el grupo metoxi.

En cuanto a las señales de los disolventes, los OH del glicerol no se resuelven para aquellos monoéteres que más solubilizan al ácido ferúlico (monoéteres 100, 200 y 400), lo cual parece indicar que esos OH están implicados en un rápido intercambio a través de enlaces de hidrógeno con el soluto, y por tanto no se acoplan con el CH del glicerol. Confirmando este hecho, la señal del CH del glicerol también se modifica en esos casos, (ver *Figura A9*), pasando a ser un quintuplete, y confirmando así que el hidrógeno del OH “ha desaparecido” por estar formando un enlace de hidrógeno con el soluto. En el único disolvente en que se ve el acoplamiento CH-OH del glicerol (OH resuelto, CH como sextuplete) es en el 3F00 en el que el ácido ferúlico apenas se disuelve.

Espectros	Señales propias del ácido cumárico		Señales propias del disolvente	
	12.1 ppm Señal -OOH	10 ppm Señal OH	4.3-4.7 ppm Zona OH	3.55 ppm Señal CH del esqueleto
Cumárico en 100	no aparece	no aparece	señales no resueltas (doblete muy ancho)	quintuplete
Cumárico en 200	no aparece	no aparece	señales no resueltas (doblete muy ancho)	quintuplete
Cumárico en 3F00	no aparece	aparece	señales no resueltas (doblete ancho)	multiplete
Cumárico en 400	no aparece	no aparece	señales no resueltas (doblete muy ancho)	quintuplete

Tabla 6: Señales representativas de los RMN's recogidos en el anexo V.

Podemos extrapolar este razonamiento para las disoluciones de ácido cumárico: en cuanto a las señales del ácido, ni el COOH ni el OH aparecen, porque se intercambian rápidamente con el disolvente en todos ellos. Asimismo, las señales de los OH del derivado de glicerol no se acoplan con el CH, porque están participando en enlaces de hidrógeno con el soluto, existiendo un intercambio rápido. La única excepción es para el 3F00, donde el ácido es apenas soluble.

Espectros	Señales propias del ácido cafeico		Señales propias del disolvente	
	12 ppm Señal -OOH	9-9.5 ppm Señales de OH en orto	4.3-4.7 ppm Zona OH	3.55 ppm Señal CH del esqueleto
Cafeico en 100	aparece	aparecen (dos singletes)	señales resueltas (doblete y triplete)	quintuplete
Cafeico en 200	aparece	aparecen (dos singletes)	señales resueltas (doblete y triplete)	sextuplete
Cafeico en 3F00	no aparece	no aparecen	señales no resueltas (doblete muy ancho)	multiplete
Cafeico en 400	no aparece	no aparecen	señales no resueltas (doblete muy ancho)	quintuplete

Tabla 7: Señales representativas de los RMN's recogidos en el anexo VI.

Sin embargo, el ácido cafeico presenta un comportamiento especial debido a que en su RMN puro (ver *Anexo VIII*) el H del ácido no aparece y los H de los grupos hidroxilo en orto se presentan como un singlete ancho, lo que nos indica que forman un enlace intramolecular de forma que el hidrógeno del OH se está intercambiando rápidamente. No obstante, al estudiar las disoluciones, ocurre lo contrario que con ferúlico y cumárico, en aquellos disolventes en los que existe una mayor solubilidad (100 y 200) estas señales se resuelven dando lugar a dos singletes en el caso de los hidrógenos de los fenoles, y un singlete en el caso del hidrógeno del ácido. A su vez, los OH del glicerol también se

resuelven. Esto parece indicar que existe una especial interacción soluto-disolvente donde no están en juego los hidrógenos de los fenoles ni del ácido, y es probablemente el hidroxilo del disolvente el que aporta el protón para el enlace de hidrógeno con ambos fenoles (*Figura 10*). Esto fijaría un enlace muy definido entre las moléculas, sin intercambio de hidrógeno, y por eso las señales se definen, se acoplan y no se ensanchan.

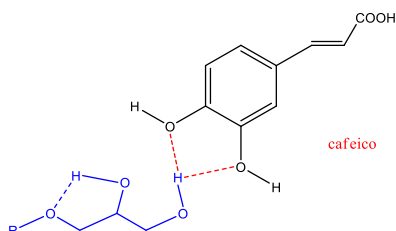


Figura 10: Disposición molecular del ácido cafeico con un disolvente genérico.

Por este estudio parece claro que el RMN puede ser una herramienta muy útil para estudiar el tipo de interacción soluto-disolvente en este tipo de derivados de glicerol, permitiendo comprender mejor los factores que afectan a la solubilidad de las moléculas.

5. Parte experimental

5.1. Metodología para la cuantificación de ácidos

5.1.1. Técnicas generales e instrumentación

Los análisis de las disoluciones se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detector ultravioleta. La fase estacionaria se trata de una columna C18 Phenomenex® Luna de 5µm de dimensiones 150 mm x 4.6 mm.

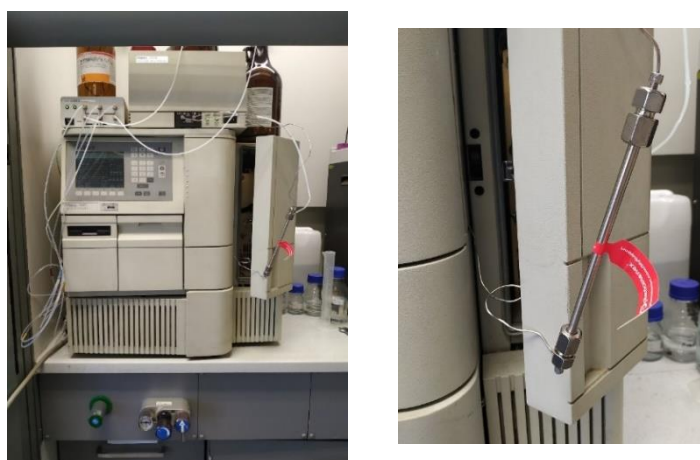


Figura 11: HPLC modelo Waters 2690 Separations con desgasificador JASCO DG-2080-53 3-Line Degasser y detector Waters 2996 Photodiode Array (izquierda).
Columna utilizada (derecha).

Para la elección de la fase móvil, se tomaron como referencia estudios de estos ácidos fenólicos en HPLC de diferentes artículos, en concreto Alevizou y Voutsas [20] y Musfiroh et al. [35]. Partiendo de esa base, se optimizan dichos métodos para cada ácido recogiendo las condiciones en la siguiente tabla.

	Eluyentes	Proporciones eluyentes	Flujo	Tiempo de retención	Longitud de onda de detección*
Ácido ferúlico	Agua con 1% (v/v) ácido acético /ACN	70/30	1 mL/min	3,6	324 nm
Ácido cumárico	Agua con 1% (v/v) ácido acético /MeOH	40/60	1 mL/min	3,35	308 nm
Ácido cafeico	Agua con 1% (v/v) ácido acético /MeOH	40/60	1 mL/min	3,9	324 nm

Tabla 8: Condiciones óptimas finales para la determinación.

5.1.2. Calibraciones

Se realizaron disoluciones en un rango de concentración conocida de manera análoga para los 3 ácidos a analizar como se estableció en el trabajo de fin de grado [33] previo. Para ello, a partir de una disolución madre de 1 mg/mL en metanol se preparan diluciones sucesivas que se inyectarán posteriormente en HPLC sonicándose previamente para asegurar la uniformidad de picos. Las gráficas obtenidas se adjuntan en el *Anexo II*.

5.2. Preparación de muestras para el protocolo de solubilidad y elección de disolventes.

Para preparar cada una de las muestras se pesaron 100 mg de ácido en un vial ámbar y se añadieron 0,25 mL del disolvente correspondiente. Se utilizaron viales ámbar para proteger las muestras de la luz. La preparación de las muestras se realiza por triplicado para evitar posibles errores en el procedimiento. Las muestras se agitan en un agitador orbital (biológico) a 100 rpm durante 72 horas a 25°C como se describe en Shakeel et al. [19] para que los resultados sean comparables con datos bibliográficos. Transcurrido ese tiempo, se microfiltran con microfiltros de teflón de 0,4 µm y se diluyen en metanol (10 µL a 10 mL) en matraces aforados, preparando así las muestras para su cuantificación. El único cambio realizado en la preparación de disoluciones con dímeros, diglicerol y triglicerol fue la preparación previa de disoluciones de cada disolvente en etanol (5 mL de dímero en 20 mL de etanol) para así poder añadir un volumen exacto (1 mL) y disolver el ácido hasta su saturación. Posteriormente se evaporan en un rotavapor con el baño a 35°C para eliminación del alcohol y posterior agitación.

Los monoéteres derivados de glicerol fueron preparados a partir de glicidol (fuente renovable) por métodos optimizados dentro del grupo de investigación donde se llevó a cabo el presente trabajo [16]. La caracterización de estos compuestos se realizó anteriormente, los respectivos RMN están descritos en la tesis de Alejandro Leal Duaso [34]. Con respecto a los dímeros de monoéteres de glicerol no son compuestos puros por lo que gracias a sus espectros de RMN (ver *Anexo III*) se calcula su porcentaje de pureza.

	Dímero R00	Diglicerol/Triglicerol
Dímero 100	86.7 - 89.2 %	13.3-10.8%
Dímero 200	83 - 86%	17-14%
Dímero 3F00	74.4%	*
Dímero 400	83 - 92 %	17-8%

*No parece observarse ni diglicerol ni triglicerol. Puede ser posible que haya una mezcla del dímero lineal y ramificado.

Tabla 9. Porcentajes de fracción molar de los diferentes dímeros estudiados.

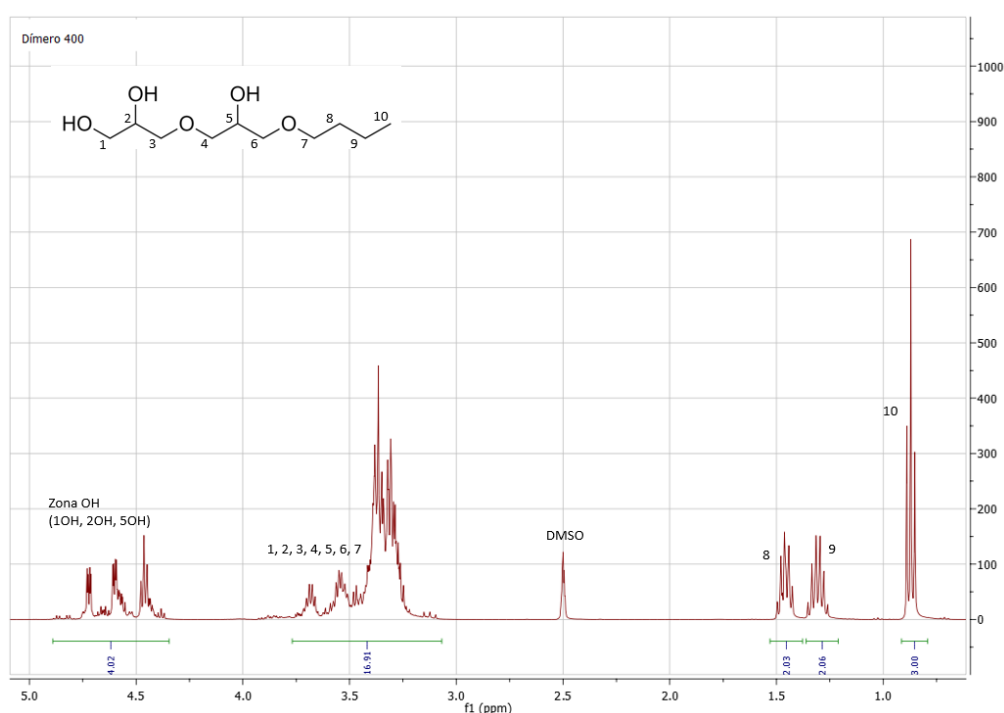


Figura 12: Ejemplo de uno de los espectros RMN obtenidos: Dímero 100.

5.3. Preparación de RMN para el estudio de interacciones de disolventes con los diferentes ácidos estudiados

Para la realización de los espectros se añaden 20 μ L de disolución saturada en 0,4 mL de DMSO. Todos los espectros obtenidos se han usado para la discusión de resultados y pueden consultar en los *Anexos V, VI, VII y VIII*. Aquellos espectros cuya escala está más ampliada es porque no hay señales fuera de ella.

6. Conclusiones

- Se ha optimizado un método de determinación de solubilidades por HPLC para los ácidos ferúlico, cumárico y cafeico, incluyendo algunas pequeñas modificaciones en función de las características de los disolventes estudiados.
- Los ácidos hidroxycinámicos estudiados siguen el siguiente orden de solubilidad: ácido cumárico > ácido ferúlico > ácido cafeico. Se confirma que este orden es independiente del disolvente a estudiar y coincide con tendencias previamente descritas en la bibliografía.
- Las solubilidades obtenidas en los derivados de glicerol son mejores respecto a sus disolventes convencionales de estructura similar (monoéteres respecto a EG y PG). Cabe destacar que en el caso de los dímeros se podrían describir mejores solubilidades si se elimina el porcentaje de etanol obtenido superando así las obtenidas PEG-400.
- El *factor hidrofílico* y el *log P* son variables muy interesantes, determinantes para la solubilidad de los ácidos estudiados dentro de una familia de disolventes y pueden ayudar a predecir la solubilidad dentro de una familia de compuestos con un esqueleto común.
- Se han estudiado las interacciones soluto-disolvente gracias a espectros de RMN, o pudiendo relacionar la solubilidad de los compuestos con el comportamiento y modificación de las señales de las parejas soluto-disolvente.

7. Bibliografía

- (1) Clarke, C. J.; Tu, W.-C.; Levers, O.; Bröhl, A.; Hallett, J. P. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (2), 747–800. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00571.
- (2) Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, *2012*, 1–10. DOI: 10.5402/2012/195727.
- (3) Nollet, L. M. L.; Gutierrez-Urbe, J. A.; Gutierrez-Urbe, J. A. *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*; CRC Press, 2018. DOI: 10.1201/9781315120157.
- (4) Wang, Z.; Ganewatta, M. S.; Tang, C. Sustainable Polymers from Biomass: Bridging Chemistry with Materials and Processing. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *101*. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.101197.
- (5) Gupta, V. K.; Tuohy, M. G.; O'Donovan, A.; Lohani, M. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*; John Wiley & Sons, 2015.
- (6) Cvjetko Bubalo, M.; Vidović, S.; Radojčić Redovniković, I.; Jokić, S. Green Solvents for Green Technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90* (9), 1631–1639. DOI: 10.1002/jctb.4668.

- (7) Calvo-Flores, F. G.; Monteagudo-Arrebola, M. J.; Dobado, J. A.; Isac-García, J. Green and Bio-Based Solvents. *Top. Curr. Chem.* **2018**, 376 (3), 18. DOI: 10.1007/s41061-018-0191-6.
- (8) Lei, Z.; Chen, B.; Koo, Y.-M.; MacFarlane, D. R. Introduction: Ionic Liquids. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (10), 6633–6635. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00246.
- (9) Hulsbosch, J.; De Vos, D. E.; Binnemans, K.; Ameloot, R. Biobased Ionic Liquids: Solvents for a Green Processing Industry? *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4 (6), 2917–2931. DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b00553.
- (10) Smith, E. L.; Abbott, A. P.; Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (21), 11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
- (11) Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R. L.; Duarte, A. R. C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, 2 (5), 1063–1071. DOI: 10.1021/sc500096j.
- (12) De Morais, P.; Gonçalves, F.; Coutinho, J. A. P.; Ventura, S. P. M. Ecotoxicity of Cholinium-Based Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2015**, 3 (12), 3398–3404. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01124.
- (13) Lapeña, D.; Errazquin, D.; Lomba, L.; Lafuente, C.; Giner, B. Ecotoxicity and Biodegradability of Pure and Aqueous Mixtures of Deep Eutectic Solvents: Glyceline, Ethaline, and Reline. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, 28 (7), 8812–8821. DOI: 10.1007/s11356-020-11144-w.
- (14) Radošević, K.; Cvjetko Bubalo, M.; Gaurina Srček, V.; Grgas, D.; Landeka Dragičević, T.; Radojčić Redovniković, I. Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 112, 46–53. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
- (15) García, J. I.; García-Marín, H.; Pires, E. Glycerol Based Solvents: Synthesis, Properties and Applications. *Green Chem* **2014**, 16 (3), 1007–1033. DOI: 10.1039/C3GC41857J.
- (16) Leal-Duaso, A.; Caballero, M.; Urriolabeitia, A.; Mayoral, J. A.; García, J. I.; Pires, E. Synthesis of 3-Alkoxypropan-1,2-Diols from Glycidol: Experimental and Theoretical Studies for the Optimization of the Synthesis of Glycerol Derived Solvents. *Green Chem.* **2017**, 19 (17), 4176–4185. DOI: 10.1039/C7GC01583F.
- (17) Perales, E.; García, J. I.; Pires, E.; Aldea, L.; Lomba, L.; Giner, B. Ecotoxicity and QSAR Studies of Glycerol Ethers in *Daphnia Magna*. *Chemosphere* **2017**, 183, 277–285. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.107.
- (18) Passino, D. R. M.; Smith, S. B. Acute Bioassays and Hazard Evaluation of Representative Contaminants Detected in Great Lakes Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1987, 6, 7. DOI: 10.1002/etc.5620061111.
- (19) Shakeel, F.; Salem-Bekhit, M. M.; Haq, N.; Siddiqui, N. A. Solubility and Thermodynamics of Ferulic Acid in Different Neat Solvents: Measurement, Correlation and Molecular Interactions. *J. Mol. Liq.* **2017**, 236, 144–150. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.04.014.
- (20) Alevizou, E. I.; Voutsas, E. C. Solubilities of P-Coumaric and Caffeic Acid in Ionic Liquids and Organic Solvents. *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, 62, 69–78. DOI: 10.1016/j.jct.2013.02.013.
- (21) Vilas-Boas, S. M.; Brandão, P.; Martins, M. A. R.; Silva, L. P.; Schreiner, T. B.; Fernandes, L.; Ferreira, O.; Pinho, S. P. Solubility and Solid Phase Studies of Isomeric Phenolic Acids in Pure Solvents. *J. Mol. Liq.* **2018**, 272, 1048–1057. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.10.108.
- (22) Vilas-Boas, S. M.; Vieira, V.; Brandão, P.; Alves, R. S.; Coutinho, J. A. P.; Pinho, S. P.; Ferreira, O. Solvent and Temperature Effects on the Solubility of Syringic, Vanillic

- or Veratric Acids: Experimental, Modeling and Solid Phase Studies. *J. Mol. Liq.* **2019**, 289, DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111089.
- (23) Vilas-Boas, S. M.; Alves, R. S.; Brandão, P.; Campos, L. M. A.; Coutinho, J. A. P.; Pinho, S. P.; Ferreira, O. Solid-Liquid Phase Equilibrium of Trans-Cinnamic Acid, p-Coumaric Acid and Ferulic Acid in Water and Organic Solvents: Experimental and Modelling Studies. *Fluid Phase Equilibria* **2020**, 521, 112747. DOI: 10.1016/j.fluid.2020.112747.
- (24) Ji, W.; Meng, Q.; Ding, L.; Wang, F.; Dong, J.; Zhou, G.; Wang, B. Measurement and Correlation of the Solubility of Caffeic Acid in Eight Mono and Water+ethanol Mixed Solvents at Temperatures from (293.15 to 333.15) K. *J. Mol. Liq.* **2016**, 224, 1275–1281. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.10.110.
- (25) Ji, W.; Meng, Q.; Li, P.; Yang, B.; Wang, F.; Ding, L.; Wang, B. Measurement and Correlation of the Solubility of *p*-Coumaric Acid in Nine Pure and Water + Ethanol Mixed Solvents at Temperatures from 293.15 to 333.15 K. *J. Chem. Eng. Data* **2016**, 61 (10), 3457–3465. DOI: 10.1021/acs.jced.6b00361.
- (26) Mota, F. L.; Queimada, A. J.; Pinho, S. P.; Macedo, E. A. Aqueous Solubility of Some Natural Phenolic Compounds. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, 47 (15), 5182–5189. DOI: 10.1021/ie071452o.
- (27) Shakeel, F.; Haq, N.; Siddiqui, N. A. Thermodynamic Solubility and Solvation Behavior of Ferulic Acid in Different (PEG-400 + Water) Binary Solvent Mixtures. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, 45 (9), 1468–1476. DOI: 10.1080/03639045.2019.1628768.
- (28) Haq, N.; Siddiqui, N. A.; Shakeel, F. Solubility and Molecular Interactions of Ferulic Acid in Various (Isopropanol + Water) Mixtures. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, 69 (11), 1485–1494. DOI: 10.1111/jphp.12786.
- (29) Xu, R.; Xue, J.; Huang, C.; Zhao, H. Remarks on “Solubilities of p-Coumaric and Caffeic Acid in Ionic Liquids and Organic Solvents.” *J. Chem. Thermodyn.* **2019**, 131, 21–24. DOI: 10.1016/j.jct.2018.10.011.
- (30) Dai, Y.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus Tinctorius* L. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (13), 6272–6278. DOI: 10.1021/ac400432p.
- (31) Abranches, D. O.; Benfica, J.; Soares, B. P.; Leal-Duaso, A.; Sintra, T. E.; Pires, E.; Pinho, S. P.; Shimizu, S.; Coutinho, J. A. P. Unveiling the Mechanism of Hydrotropy: Evidence for Water-Mediated Aggregation of Hydrotropes around the Solute. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (52), 7143–7146. DOI: 10.1039/D0CC03217D.
- (32) Soares, B. P.; Abranches, D. O.; Sintra, T. E.; Leal-Duaso, A.; García, J. I.; Pires, E.; Shimizu, S.; Pinho, S. P.; Coutinho, J. A. P. Glycerol Ethers as Hydrotropes and Their Use to Enhance the Solubility of Phenolic Acids in Water. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, 8 (14), 5742–5749. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c01032.
- (33) Muñiz Romera, Andrea. *Estudio de solubilidades de compuestos activos para el desarrollo de formulaciones cosméticas: Estado del arte, puesta a punto de la determinación de resultados y protocolo de solubilidad*. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, **2020**.
- (34) Leal Duaso, Alejandro. *Disolventes biobasados derivados de glicerol. Síntesis, propiedades y aplicaciones*. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, **2020**.
- (35) Musfiroh, I.; Indriyati, W.; Abadi, M. L. N.; Muchtaridi, M. Analysis of ferulic acid in arabica coffee bean (*coffea arabica* l.) using solid phase extraction–high performance liquid chromatography. **2019**, 11 (5), 5.