



**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE AGREGACIÓN EN AGUA
DE MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS DERIVADAS
DE L-VALINA**

YASMINE HAMMOUDI HAOUACHE

MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA

TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

CASTELLÓN, noviembre 2021

**Escuela superior de Tecnología y Ciencias Experimentales
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica Grupo de
Nanomateriales Moleculares Orgánicos con Aplicaciones
Biomédicas**



**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE AGREGACIÓN EN AGUA DE
MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS DERIVADAS DE L-
VALINA**

YASMINE HAMMOUDI HAOUACHE

MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA

TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER

CASTELLÓN, NOVIEMBRE 2021

El Dr. Juan Felipe Miravet Celades, catedrático perteneciente al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón de la Plana,

CERTIFICA

Que el trabajo fin de máster con el título **SÍNTESIS Y ESTUDIO DE AGREGACIÓN EN AGUA DE MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS DERIVADAS DE L-VALINA** ha sido realizado por Yasmine Hammoudi Haouache bajo su dirección, en el grupo de Nanomateriales Moleculares Orgánicos con Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón de la Plana.

Lo que certifico a los efectos oportunos en Castellón de la Plana el día 16 de noviembre del año 2021.

Fdo. Dr. Juan F. Miravet Celades

Agradecimientos

- ❖ En primer lugar, me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a mi tutor Dr. Juan F. Miravet Celades por ser una persona tan cercana y accesible, por resolver cualquier duda que pudiera surgir y por promover el buen ambiente dentro de su grupo de investigación en el cual es una gozada trabajar, al ser lejos de mi familia durante esta experiencia académica estuvo para mí como un padre motivándome cada día con sus ondas positivas. También me gustaría agradecer a Ana por todo lo que me enseñó en el laboratorio.
- ❖ Me gustaría dedicar este trabajo y todo el esfuerzo que hice desde que empecé esta aventura en España a mi familia, Mama, papa, Amira, Inés, Amine, Anís, que, aunque no puede verlos durante dos años estuvieron a mi lado en cada momento. Gracias por haber hecho de mí la persona que soy hoy en día. También quería agradecer mi hermana de corazón Nesrine por todo su apoyo.
- ❖ Por último, no podría faltar agradecer a mi familia de aquí, mis amigos y sobre todo a mi amiga y compañera de estudio María José por apoyarme y hacer que esta experiencia fuera inolvidable.

Abreviaturas

ARN=Ácido ribonucleico

Boc = t – butiloxicarbonilo

Cbz = Carboxibencilo

CD = Celulas dendríticas

Cst = Cisteamina

CTRT = Citrato de sodio

DCC = Diciclohexilcarbodiimida

Dec=Decametileno

DEX = Dextrano

DLS= Dynamic light scattering” (Dispersión dinámica de luz

Dox = Doxorrubicina

DTT = Ditiotreitól

GSH = Glutación

GSSG = Glutación oxidado

GFP-DS=*Green or red fluorescent protein*

IX= Protoporfirina

LA = Acido lipoico

NHS = Hidroxisuccinimida

NP = Nanopartículas

Osu = Radical N-oxisuccinimida

PEG = Polietilenglicol

RMN = Resonancia magnética nuclear

THF = Tetrahidrofurano

TFA = Acido tricloroacético

Val =Valina

Índice

1. Introducción	1
1.1. La nanotecnología y las nanopartículas	1
1.1.1. Las nanopartículas orgánicas ⁷	4
1.2. Nanovehículos ¹⁰	9
1.3. El glutatión ¹³	10
2. Objetivos	15
3. Resultados y discusión	19
3.1. Síntesis de Val-Cst-Val y Val-Dec-Val-2HCl.....	19
3.1.1. Síntesis del compuesto Valina-Cistamina-Valina	19
3.1.2. Síntesis del compuesto Valina-Decametileno-Valina-2HCl	22
3.2. Estudio de agregación usando Hipericina como sonda fluorescente. ¹⁸	23
3.3. Determinación del tamaño de las nanopartículas de los compuestos	27
Val-Cst-Val y Val-Dec-Val-2HCl mediante DLS.....	27
3.4. Estudio de la sensibilidad al glutatión de los agregados de Val-Cst-Val mediante DLS ²²	29
4. Conclusiones.....	33
5. Sección experimental	37
5.1. Proceso de la Síntesis del Val-Cst-Val.....	37
5.2. Proceso de la Síntesis del Val-Dec-Val-2HCl.....	39
6. Bibliografía	43
7. Anexos.....	47
7.1. Espectros RMN	47
7.1.1. RMN de la Síntesis del Val-Cst-Val	47
7.1.2. RMN de la Síntesis del Val-Dec-Val-2HCl.....	50

Introducción

1. Introducción

El siguiente trabajo está basado en la síntesis y el estudio de la agregación en medio acuoso de dos compuestos derivados de L-Valina. Uno de ellos presenta una agrupación disulfuro, lo que lo hace sensible al glutatión (GSH). Los agregados de estos compuestos en nanopartículas pueden tener aplicación en el campo de la liberación controlada de fármacos. Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta introducción se ha realizado una breve revisión sobre el área de la nanotecnología y en particular sobre nanopartículas interés biomédico. Adicionalmente, se comenta la utilidad como nanovehículos de nanopartículas responden a la presencia de GSH.

1.1. La nanotecnología y las nanopartículas

La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas (nanomateriales). Lo más habitual es que tal manipulación se produzca en un rango de entre uno y cien nanómetros. La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala. Cuando se manipula la materia a escala tan minúscula, presenta fenómenos y propiedades totalmente nuevas.¹

El principal objetivo del uso de nanopartículas es el de innovar y desarrollar nuevas herramientas y materiales en distintas áreas, como la medicina, la electrónica o la cosmética. La nanomedicina es una subdisciplina de la nanociencia y es una de las vertientes más prometedoras dentro de los muchos avances tecnológicos todavía en estudio, ya que brinda la posibilidad de diagnosticar y tratar enfermedades a nivel celular y molecular.^{2,3,4}

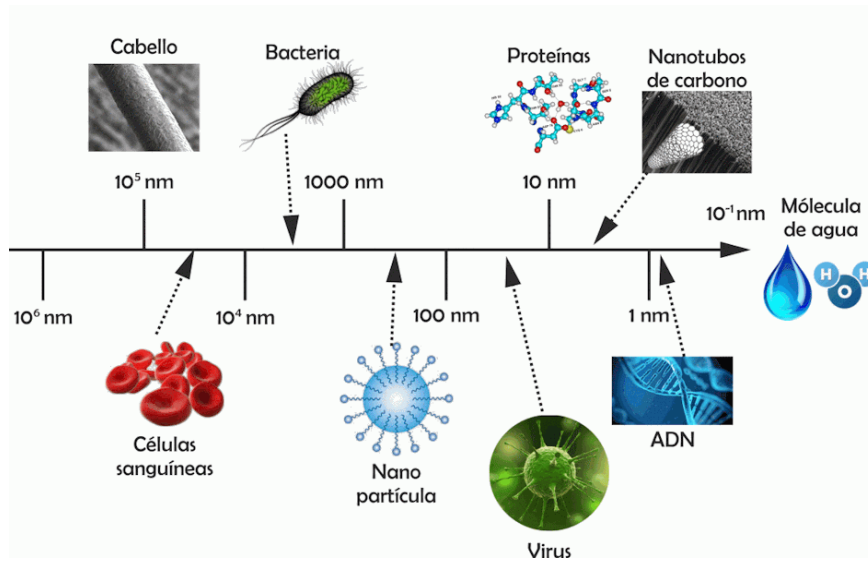


Figura 1. Escala nanométrica

Se utilizan dos estrategias básicas para producir nanopartículas: «de arriba hacia abajo» y «de abajo hacia arriba».⁵ El término «de arriba hacia abajo» se refiere aquí a la trituration mecánica del material usando un proceso de molienda. En la estrategia de «abajo hacia arriba», las estructuras se construyen mediante procesos químicos (Figura 2). La selección del proceso respectivo depende de la composición química y de las características especificadas de las nanopartículas deseadas.⁴

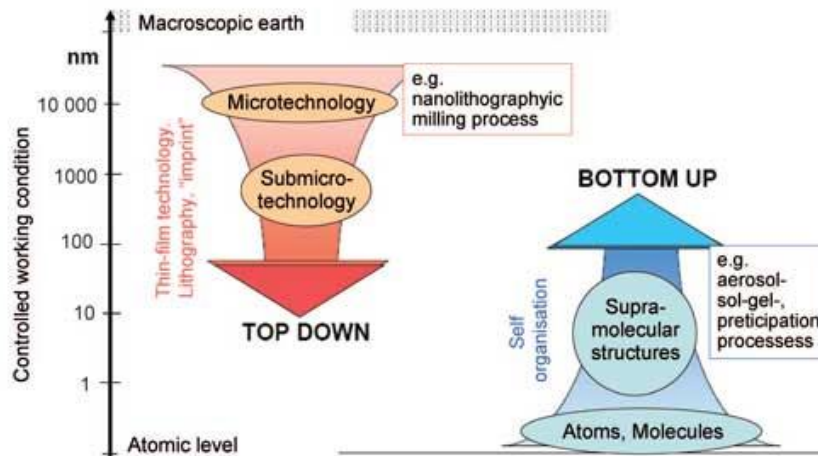


Figura 2. Métodos de producción de nanopartículas

Los métodos ascendentes se basan en principios fisicoquímicos de autoorganización molecular o atómica.⁶ Este enfoque produce estructuras más seleccionadas, más complejas a partir de átomos o moléculas y un mejor control del tamaño. Incluye procesos en aerosol, reacciones de precipitación y procesos sol-gel.⁴

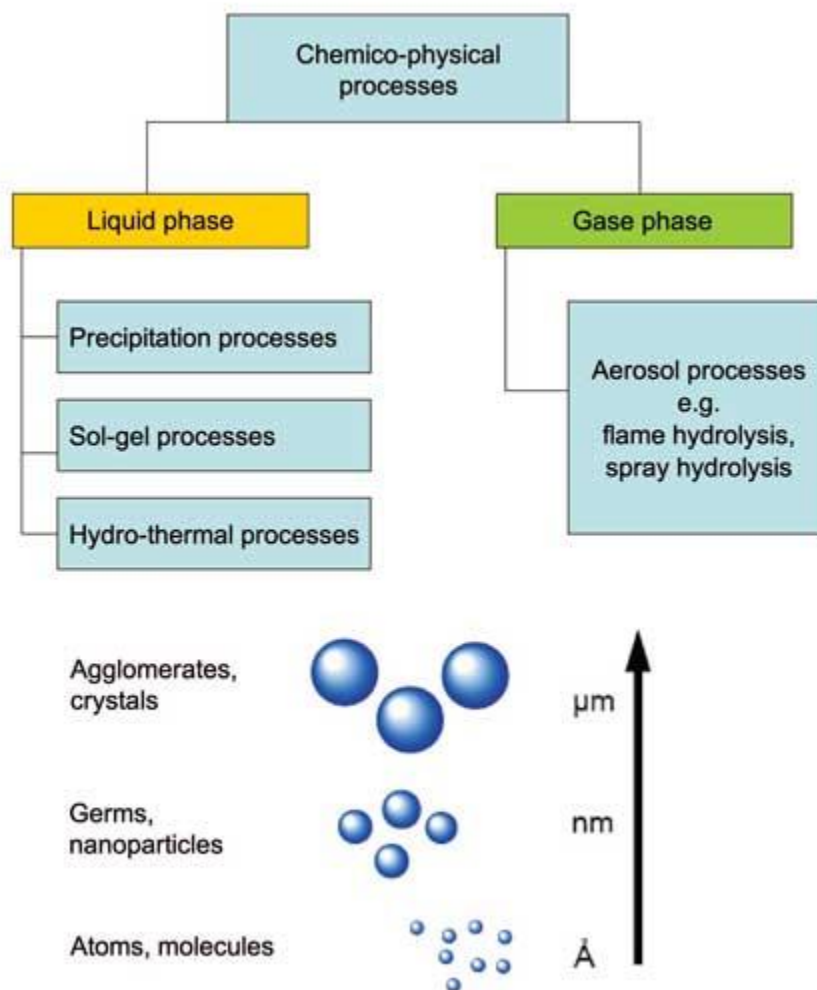


Figura 3. Procesos químico-físicos en la producción de nanopartículas

En particular, en el caso de nanopartículas orgánicas, se ha publicado recientemente una revisión de las diferentes estrategias para su preparación dentro de un contexto biomédico en la que se basa el siguiente apartado.

1.1.1. Las nanopartículas orgánicas ⁷

Las nanopartículas orgánicas han atraído una amplia atención para diversas aplicaciones biomédicas, como el diagnóstico de enfermedades, la administración de fármacos, la bioimagen y la terapia contra el cáncer. Por tanto, se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar diferentes estrategias para la construcción de nanopartículas orgánicas con distintas morfologías y propiedades.

Los diferentes componentes básicos para la preparación de las nanopartículas orgánicas tienen una excelente biocompatibilidad y funcionalidad diversa, una amplia variedad de materiales orgánicos que incluyen moléculas pequeñas como por ejemplo moléculas de fármacos y moléculas orgánicas fluorescentes, polímeros, copolímeros, polímeros semiconductores o dendrímeros y biomoléculas. Además, los ácidos nucleicos, péptidos o proteínas se han empleado ampliamente como bloques de construcción para construir nanopartículas a través de múltiples interacciones intermoleculares para aplicaciones biomédicas.

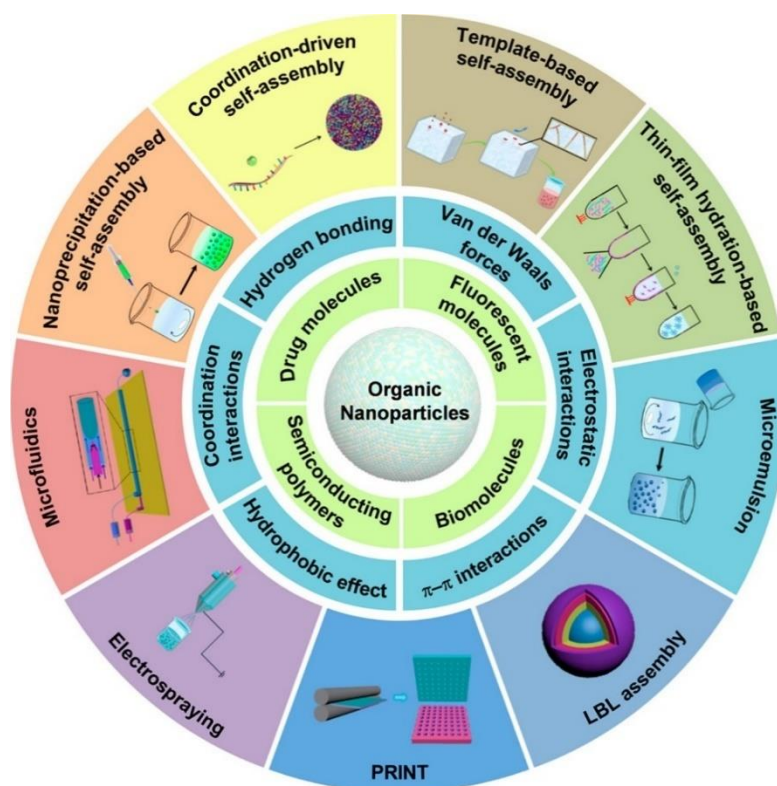


Figura 4. Ilustración esquemática de bloques de construcción típicos, fuerzas impulsoras y estrategias para la preparación de nanopartículas orgánicas.⁶

Debido a los diversos méritos de las nanopartículas orgánicas para aplicaciones biomédicas, se han desarrollado numerosas estrategias de fabricación. Se pueden dividir principalmente en métodos de autoensamblaje, microemulsiones y ensamblaje “capa a capa” (LbL), así como técnicas basadas en algunos instrumentos específicos como PRINT, electropulverización y microfluidos.⁷

- **Estrategias para la preparación de nanopartículas orgánicas⁷**

- a. **El autoensamblaje:⁷**

El autoensamblaje es la estrategia más utilizada y práctica para preparar nanopartículas orgánicas con componentes básicos, incluidos copolímeros de bloques anfífilicos, complejos huésped-huésped, polielectrolitos o moléculas orgánicas pequeñas. Las interacciones no covalentes como las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas, el efecto hidrófobo y los enlaces de hidrógeno a menudo están involucradas en el autoensamblaje (Figura 5).

Estas fuerzas de unión relativamente débiles a menudo confieren a las nanopartículas orgánicas ensambladas sensibilidad a los cambios ambientales, lo que favorece sus aplicaciones en respuestas bajo demanda a factores ambientales como la temperatura o el pH.



Figura 5. Fuerzas impulsoras para la construcción de nanopartículas orgánicas.

b. Microemulsión

La microemulsión es un método simple y versátil para la fabricación de nanopartículas orgánicas sin necesidad de instrumentos costosos. En comparación con la nanoprecipitación, la microemulsión requiere un emulsionante o un tensioactivo y se considera un método de síntesis de plantilla blanda. Generalmente, los tamaños de las nanopartículas orgánicas producidas por este método son <500 nm. En una emulsión típica el disolvente orgánico, que contiene las moléculas orgánicas que formarán las nanopartículas (tal como diclorometano, inmisible con el agua) se añadiría a la solución acuosa con un emulsionante bajo ultrasonidos o agitación vigorosa. Entonces se formarían nanopartículas orgánicas con una cierta cantidad de emulsionante.

Por ejemplo, Vivero-Escoto y sus colaboradores fabricaron nanopartículas de polisilsesquioxano (PSiQ) sensibles a estímulos mediante microemulsión, que pueden cargar y administrar simultáneamente ARN terapéutico, curcumina y protoporfirina IX (PpIX) para tratar el cáncer de mama triple negativo con una combinación de terapia génica, quimioterapia y fototerapia. (figura 6)⁸

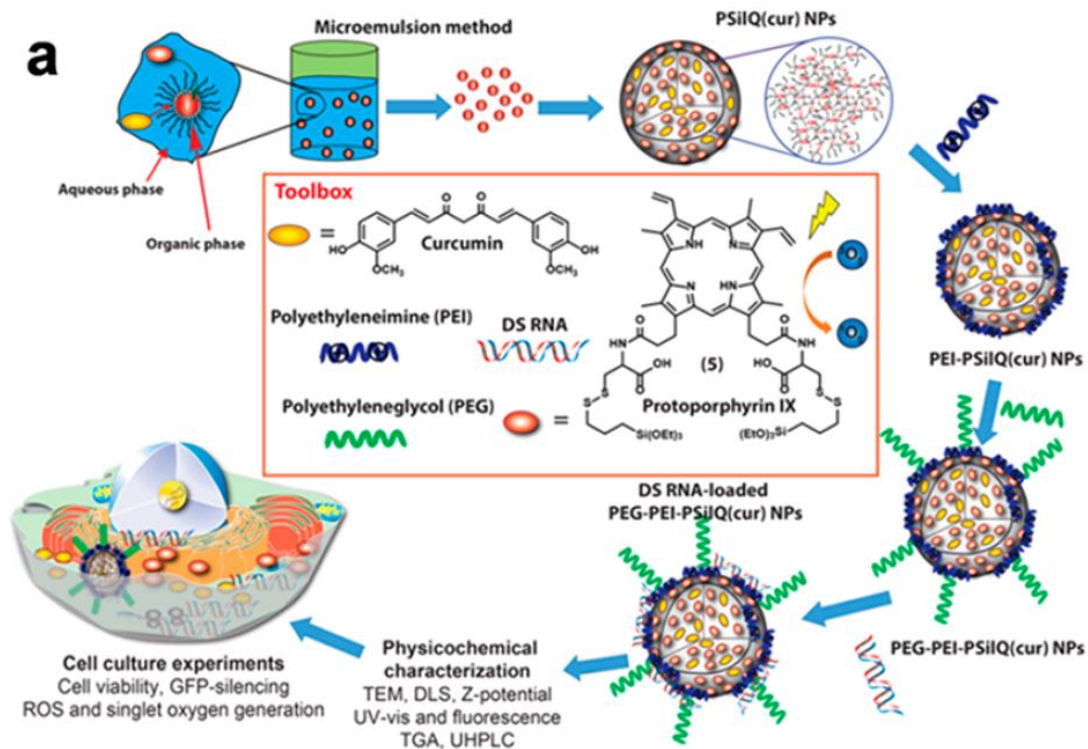


Figura 6. Representación de la preparación y caracterización de las NP de PEG-PEI-PSiQ (cur) cargadas con ARN de GFP-DS mediante el método de microemulsión

c. Ensamblaje capa por capa (LbL)⁷

El ensamblaje de LbL es un método universal y flexible para preparar nanopartículas multifuncionales mediante el recubrimiento de núcleos de nanopartículas con polímeros, biomoléculas y coloides, etc. El ensamblaje de LbL se puede lograr con diferentes fuerzas de interacción, incluida la interacción electrostática, el reconocimiento biológico, los enlaces de hidrógeno y la interacción huésped-huésped.

Este enfoque podría integrar convenientemente propiedades multifuncionales a una nanoarquitectura mediante el ensamblaje de materiales con diferentes funciones para cada capa como puede ser la respuesta a estímulos o tiempos de circulación sistémica prolongados.

d. Replicación de partículas en plantillas no humectantes (PRINT)

En 2005, el grupo de De Simone propuso la tecnología de replicación de partículas en plantillas no humectantes (PRINT), que es un método "de arriba hacia abajo" para fabricar micropartículas y nanopartículas bien definidas con tamaños de 20 nm a 100 μm .

El método PRINT, como estrategia de litografía blanda, muestra un control preciso del tamaño, la geometría y la composición con un elastómero a base de perfluoropoliéter no humectante (PFPE). Después de décadas de desarrollo, PRINT se ha utilizado para fabricar nanopartículas a partir de una amplia gama de materiales

e. Electropulverización

La electropulverización es un método versátil, de un solo paso y rentable para la fabricación de nanopartículas orgánicas con un tamaño relativamente pequeño, que incluye electropulverización con una sola aguja, electropulverización coaxial, electropulverización multiaxial, electropulverización simple y multiplexada.

El principio de la electropulverización es que la solución de material se expulsa de una jeringa en forma de nanopartículas bajo la aplicación de un alto voltaje. Comúnmente, las nanopartículas orgánicas producidas por este método se pueden utilizar como vehículos para administrar fármacos, proteínas y vitaminas, así como factores de crecimiento con su morfología controlada, encapsulación eficaz y excelente reproducibilidad.

f. Microfluidos

Desde principios de la década de 1980, la tecnología de microfluidos se ha desarrollado rápidamente. La principal ventaja de la tecnología de microfluidos es su capacidad para manejar con precisión fluidos monofásicos o multifase con pequeños volúmenes (desde microlitros hasta picolitros) en microcañales (decenas a cientos de micrómetros). Hoy en día, la tecnología de microfluidos se ha adoptado para una amplia gama de aplicaciones biológicas o químicas, como síntesis de micromateriales y nanomateriales, administración de fármacos, detección de analitos, debido a sus méritos únicos de control preciso de reacciones, alto nivel de integración, alta eficiencia de producción y buena reproducibilidad.

El flujo en los microcañales está influenciado principalmente por las fuerzas viscosas más que por las fuerzas de inercia. Mientras tanto, con una superficie más grande, el microfluído proporciona transferencias de masa y calor más rápidas y uniformes.

Se han fabricado una variedad de nanopartículas orgánicas con una morfología bien definida mediante métodos de microfluidos, incluidas nanopartículas poliméricas como ácido poli(L-láctico-co-glicólico), polisacáridos, liposomas o nanopartículas lipídicas. Leal y sus colaboradores utilizaron la tecnología de microfluidos para crear cuboplexos de pequeño tamaño, que son cubosomas (nanoestructuras con propiedades de cristal líquido que presentan una ordenación cúbica). cargados de ARN de interferencia (Figura 7).⁹

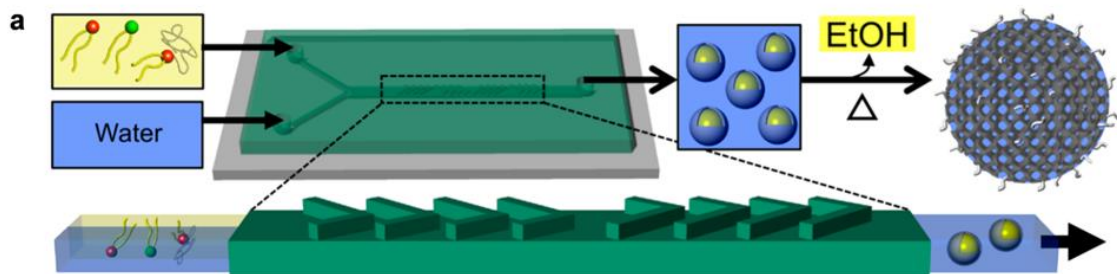


Figura 7. Representación de la síntesis mediante microfluidos de un cubosoma.

1.2. Nanovehículos ¹⁰

Con la nanotecnología se han diseñado los fármacos inteligentes que tienen como principal mecanismo la liberación controlada de un medicamento en una región específica del organismo. Este tipo de fármacos están formados por una cubierta sintética que contiene el principio activo del tamaño nanométrico que lo dirige al lugar adecuado. Así aumenta su eficacia y se evitan los efectos secundarios en otras partes del cuerpo. Sin embargo, este 'Nanovehículo' debe cumplir varios requisitos, como ser resistente en los medios biológicos, tener una vida media relativamente elevada, y evidentemente no ser tóxico.

En muchos casos, los fármacos para ejercer efectos terapéuticos requieren su administración y liberación en los compartimentos celulares, como el citoplasma o el núcleo celular. Este sería el caso, entre otros, de los fármacos fotosensibilizadores, anticancerígenos, antioxidantes, peptídicos o proteicos.¹¹ Los posibles sistemas de administración de fármacos dirigidos, por lo tanto, deben poder superar no solo las barreras extracelulares (tiempo de circulación prolongado, acumulación preferencial en sitios enfermos, unión selectiva a las células diana, etc.) sino también barreras intracelulares igualmente importantes (internalización celular, escape endosomal, liberación de fármacos, etc.). En los últimos años, el diseño de nuevos nanoportadores biosensibles que liberan fármacos en respuesta a una señal intracelular, en particular pH ácido y potencial redox, ha recibido gran interés.

Los nanovehículos, que son sensibles al pH, se diseñan habitualmente para desestabilizar los vehículos y liberar fármacos en compartimentos endosomales y / o lisosomales, que tienen valores de pH típicamente tan bajos como 5,5 y 4,5, respectivamente. Por otro lado, los vehículos con respuesta redox están destinados principalmente a desmontar y liberar fármacos en el citosol en respuesta a la presencia de glutatión (GSH) (Figura 8).¹²

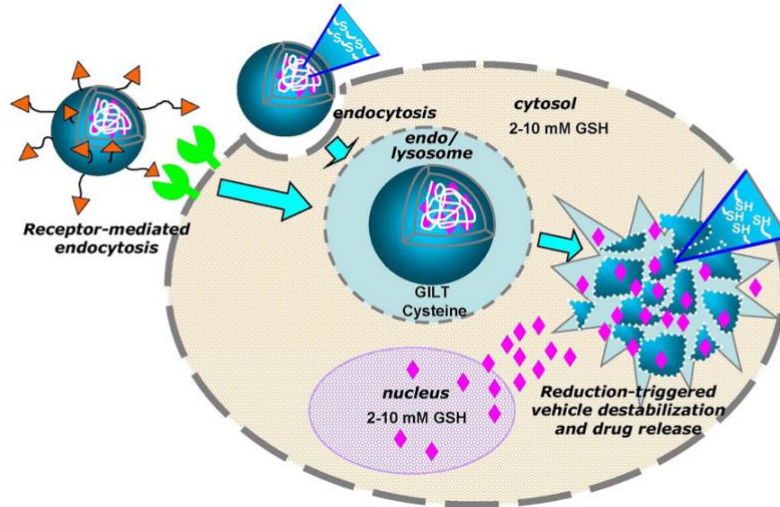


Figura 8. Ilustración esquemática a la vía de tráfico intracelular de nanovehículos sensible a GSH

1.3. El glutatión ¹³

El glutatión (GSH) es una molécula formada por la asociación de 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Es el principal antioxidante con presencia en todas las células y ayuda a protegerlas de los radicales libres y los tóxicos celulares en general. En las células, el glutatión se encuentra en estado reducido (GSH) disponible para su función y, en menor cuantía, en su estado oxidado (GSSG), fruto de su acción de defensa de la célula. Una enzima, la Glutatión reductasa lo va reparando a medida que se oxida.

La función principal del glutatión es proteger sus células y las mitocondrias del daño oxidativo y peroxidación. El envejecimiento disminuye la capacidad de producir glutatión reducido, al igual que diversos problemas de salud, como el Alzheimer, Parkinson, arterioesclerosis o las cataratas entre otros.

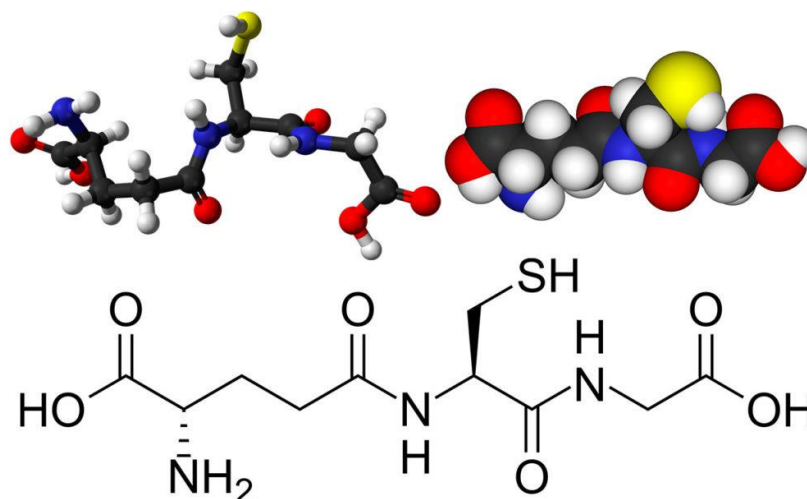


Figura 9. Molécula de la Glutación

GSH / disulfuro de glutación (GSSG) es la principal pareja redox en las células animales que determina la capacidad antioxidante de las células.¹⁴GSH / GSSG se mantiene reducido por NADPH y glutación reductasa. El nivel intracelular de GSH también depende de otras parejas redox como NADH / NAD⁺y NADPH / NADP⁺. Cabe señalar además que el compartimento endosómico también es activo en reacciones redox. En este caso el potencial redox está modulado por una enzima reductora específica, tiol reductasa lisosomal, inducible por gamma-interferón (GILT) en la copresencia de un agente reductor como la cisteína (pero no GSH).¹⁵

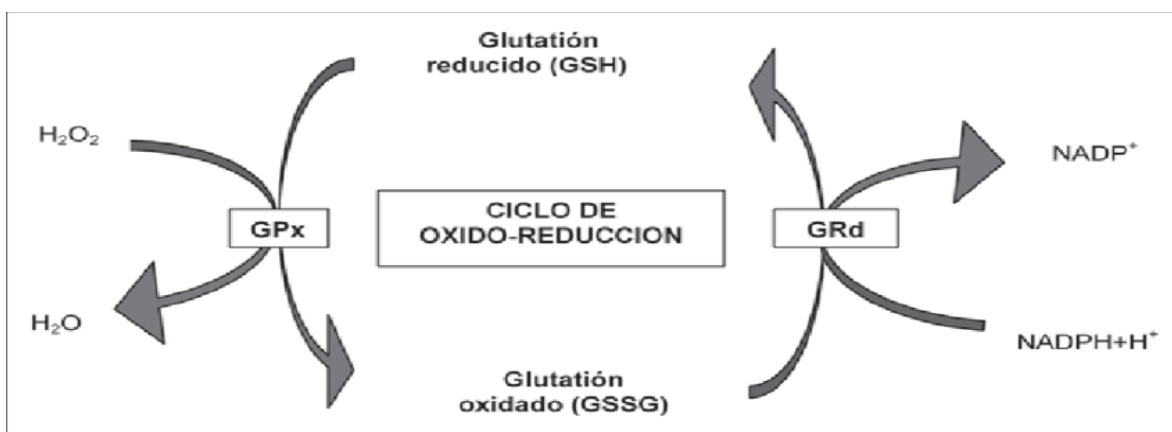


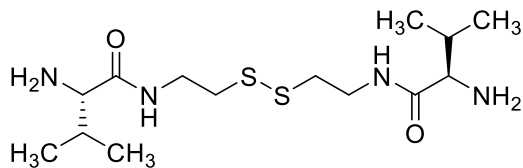
Figura 10. Ciclo de oxido-reducción del glutación

Los últimos años han sido testigos de un enorme progreso en el desarrollo de nanovehículos sensibles al glutatión para la administración de genes y fármacos intracelulares dirigidos. Varios compartimentos intracelulares como el citosol, las mitocondrias y el núcleo celular contienen una alta concentración de glutatión (GSH) tripéptidos (alrededor de 2 - 10 mM), que es de 100 a 1000 veces mayor que en el extracelular.¹² Por ello, el glutatión ha sido reconocido como un estímulo interno ideal para la rápida desestabilización de nanoportadores dentro de las células para lograr eficiente la liberación intracelular de fármacos.

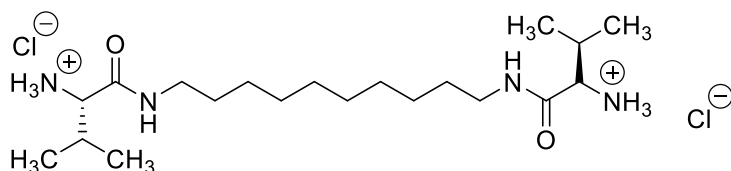
Objetivos

2. Objetivos

- Síntesis del **Val-Cst-Val**



- Síntesis del **Val-Dec-Val-2 HCl**



- Determinación de la concentración crítica micelar del Val-Cst-Val utilizando la hipericina como sonda fluorescente
- Determinación del tamaño de las nanopartículas formadas por estas moléculas. por medio de medidas de DLS.
- Estudio de la sensibilidad de Val-Cst-Val al glutatión mediante DLS.

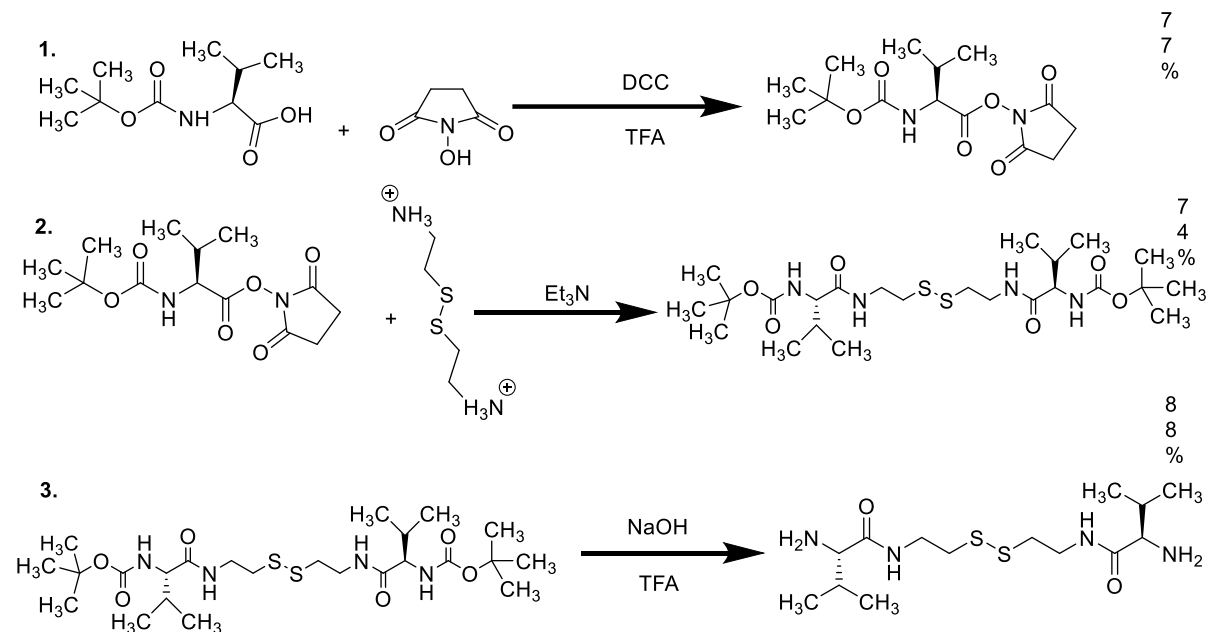
Resultados y discusión

3.Resultados y discusión

3.1. Síntesis de Val-Cst-Val y Val-Dec-Val-2HCl

3.1.1 Síntesis del compuesto Valina-Cistamina-Valina

El compuesto Val-Cst-Val fue obtenido a partir de L-cistina y BocValOH en tres pasos diferenciados.



Paso 1: Se realiza la activación del BocValOH mediante DCC para obtener el ester activado de N-hidroxisuccinimida. En esta reacción se emplea el aminoácido L-valina protegido con BOC. La nucleofílica y basicidad del grupo amino obliga a protegerlo en numerosas síntesis orgánicas. Esta protección se realiza uniendo al nitrógeno un grupo electrón atractor que disminuya su reactividad.

Los grupos protectores más populares son: Boc (*t*-butiloxicarbonilo) y CBz (carboxibencilo). El grupo protector Boc se suele introducir a partir del carbonato de *t*-butilo mientras que el CBz a partir del cloroformiato de bencilo.

El grupo Boc se elimina en condiciones ácidas relativamente suaves mientras que el CBz requiere ácidos concentrados o, preferiblemente, hidrogenólisis.¹⁷

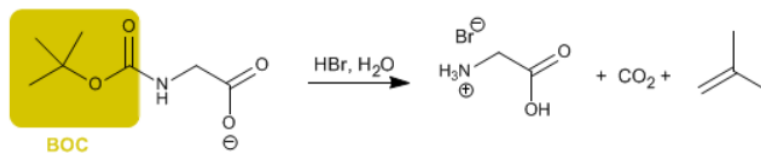


Figura 11. Ejemplo de la protección del grupo amino con **Boc**

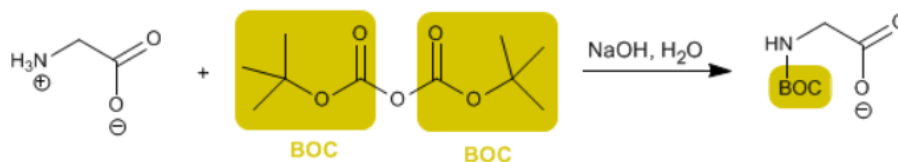


Figura 12. Ejemplo de desprotección del grupo Boc

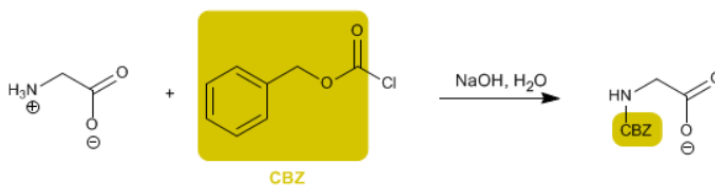


Figura 13. Protección del grupo amino con **CBz**

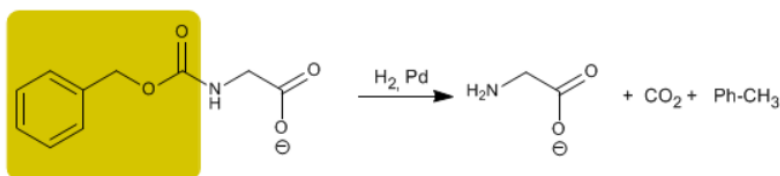


Figura 14. Eliminación del grupo CBz hidrogenólisis catalizada con paladio.

Paso 2: Se forma el enlace amida por la reacción del ester activado con cistamina.

Paso 3: Se elimina el grupo protector BOC mediante TFA y se extrae en medio básico el producto Val-Cst-Val como amina libre.

Se tomó un espectro RMN para su debida caracterización como se muestra en la (figura 15)

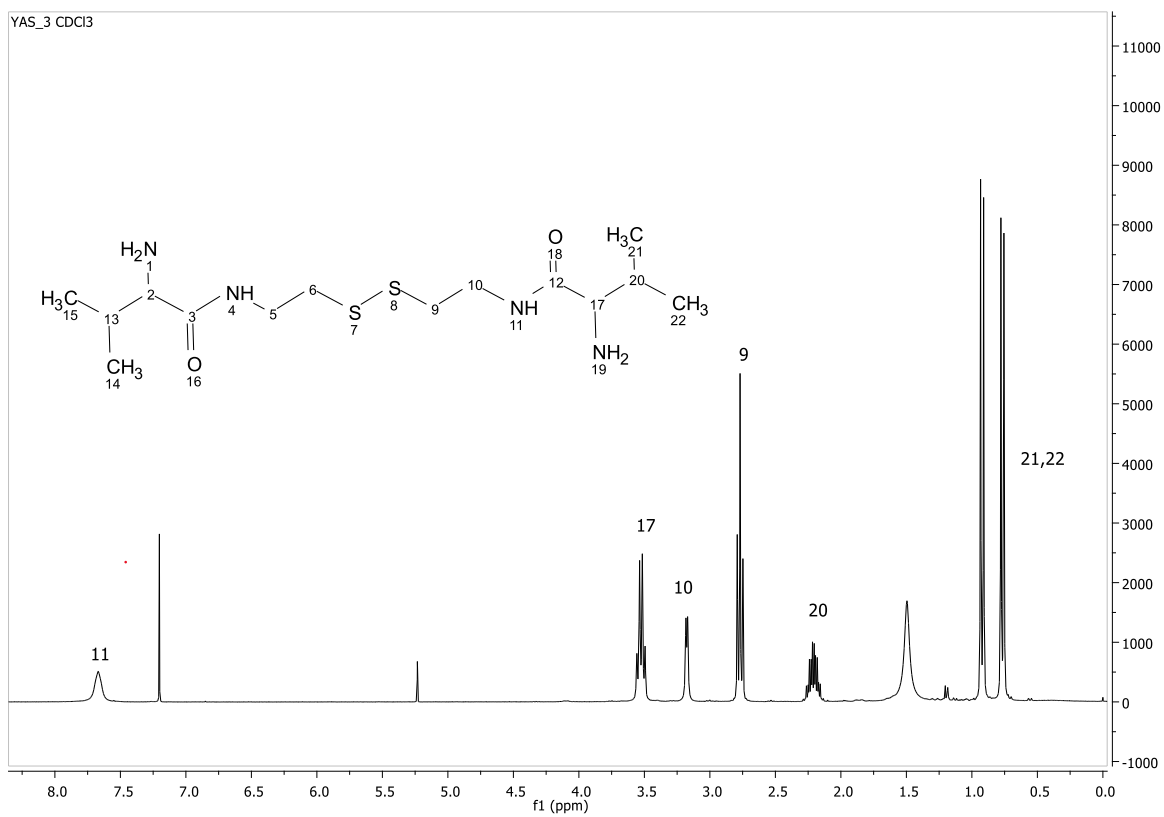
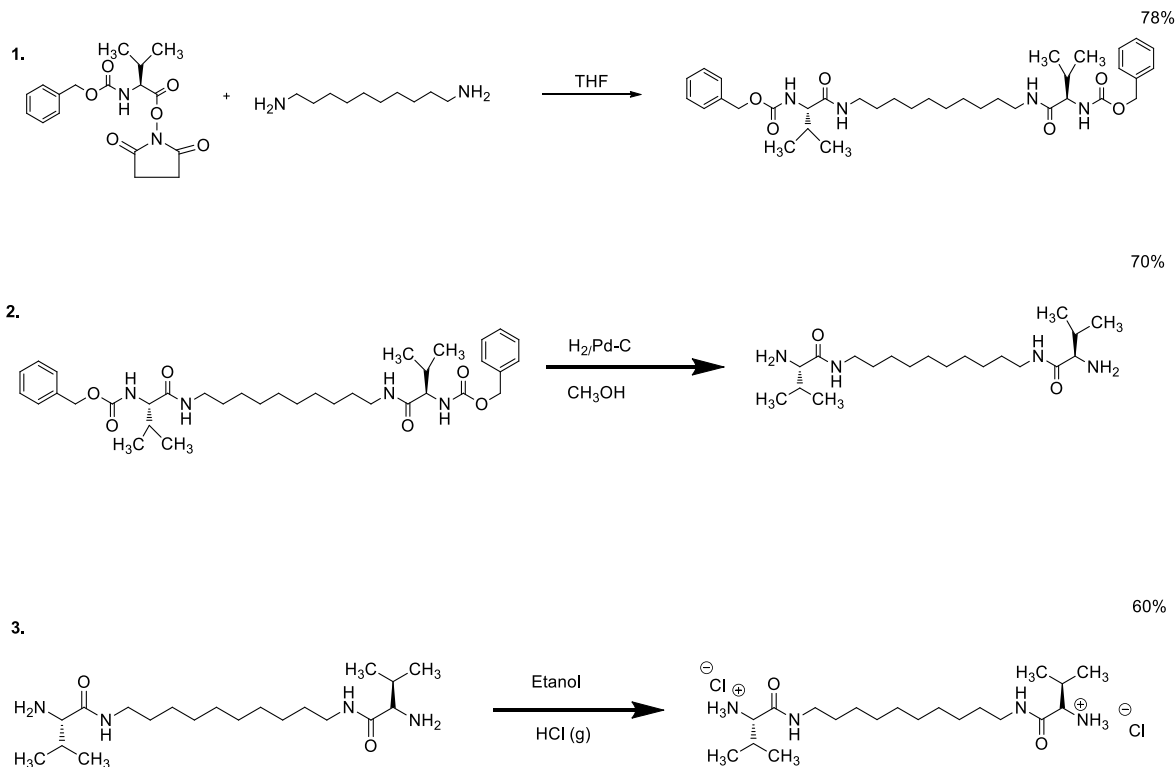


Figura 15. Espectro ¹H RMN de Val-Cst-Val en CDCl₃

3.1.2. Síntesis del compuesto Valina-Decametileno-Valina-2HCl

El compuesto Val-Dec-Val fue obtenido a partir de 1,10-diaminodecano y el grupo Cbz en tres pasos diferenciados.



Paso 1: Se acopla la L-valina N-protegida con el grupo Cbz y activada como ester de N-hidroxisuccinimida con el 1,10-diaminodecano.

Paso 2: Se realiza la desprotección del Cbz mediante la hidrogenación catalítica (Pd-C /H₂).

Paso3: Se obtiene el clorhidrato de Val-Dec-Val mediante burbujeo con HCl (g) en etanol.

Se tomó un espectro RMN para su debida caracterización como se muestra en la (figura16).

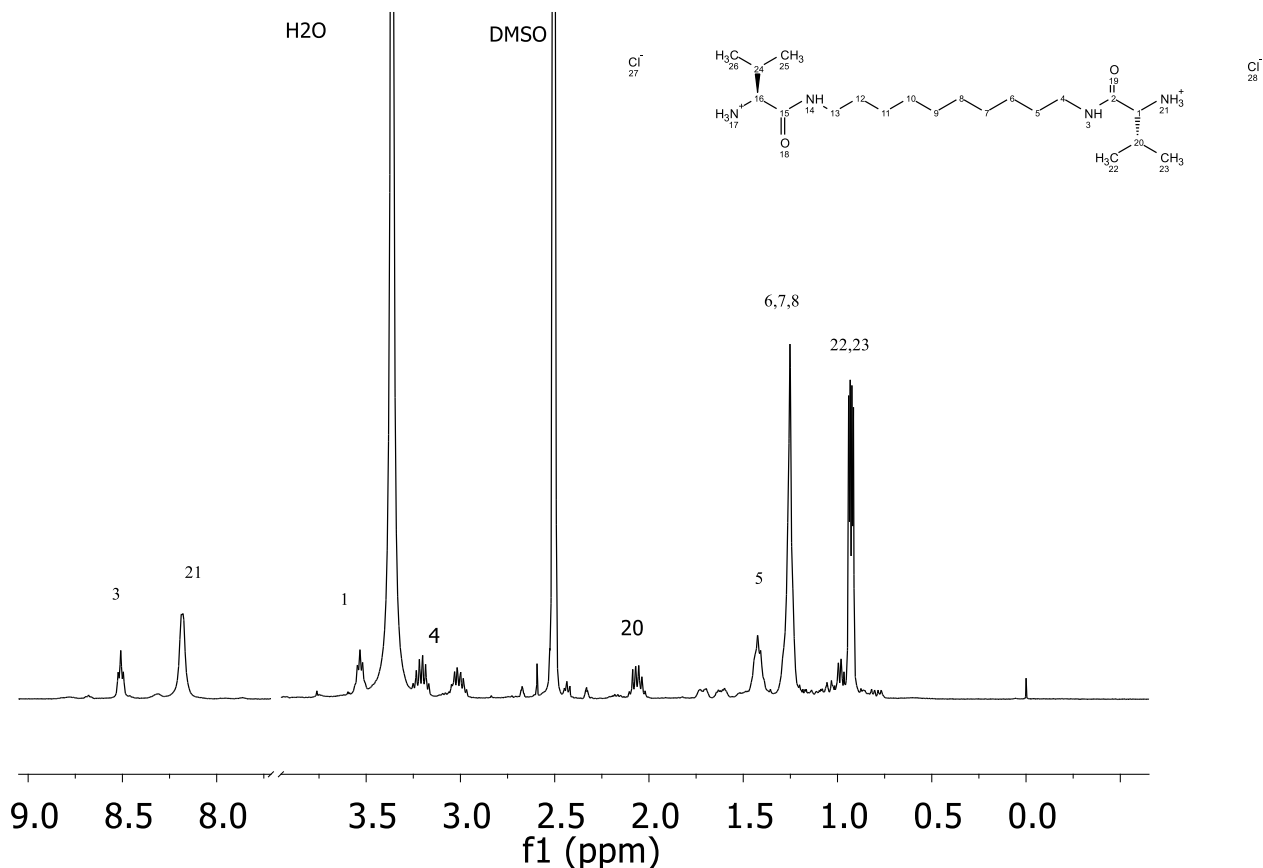


Figura 16. ^1H RMN del Compuesto Val-Dec-Val₂ HCl en DMSO

3.2. Estudio de agregación usando Hipericina como sonda fluorescente.¹⁸

Cuando los especímenes, vivos o no vivos, orgánicos o inorgánicos, absorben y posteriormente vuelven a irradiar luz, el proceso se describe como fotoluminiscencia.

Si la emisión de luz persiste hasta unos segundos después de que se suspende la energía de excitación (luz), el fenómeno se conoce como fosforescencia.

La fluorescencia, por otro lado, describe la emisión de luz que continúa solo durante la absorción de la luz de excitación. El intervalo de tiempo entre la absorción de la luz de excitación y la emisión en fluorescencia es de una duración extraordinariamente corta, generalmente menos de una millonésima de segundo.

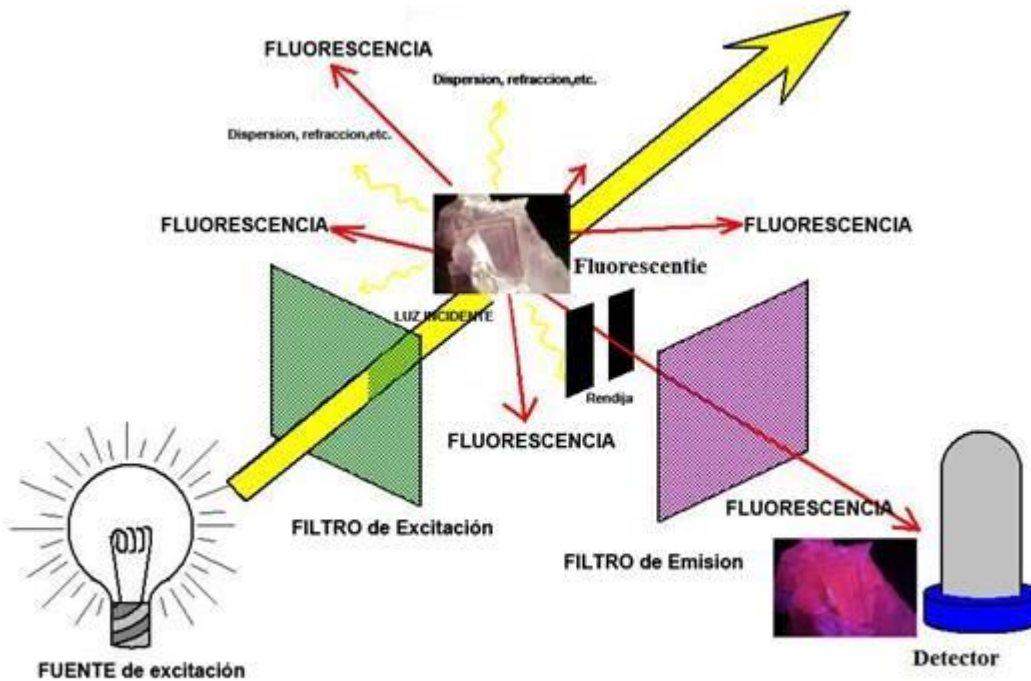


Figura 17. Esquema del fundamento de la espectroscopia de fluorescencia

La hipericina es una molécula de origen natural que presenta un rendimiento cuántico alto en su estado triplete y genera eficientemente especies reactivas de oxígeno. La hipericina a pH neutro es un polianión que a priori interactuará con las partículas catiónicas formadas por los compuestos preparados.¹⁹

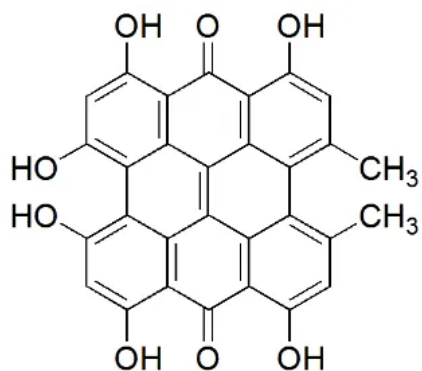


Figura 18. molécula de la hipericina

La concentración crítica micelar (CMC) es una de las propiedades esenciales de los surfactantes, definida como la concentración de surfactante en un disolvente por encima de la cual las micelas se forman de forma espontánea. Cuanto más por encima de esta concentración, mayor número de micelas se formarán. Esta concentración crítica depende de la naturaleza tanto del surfactante como del disolvente, así como de otras propiedades físicas como la temperatura. Una de las formas de determinar esta propiedad es por medio de la fluorescencia, utilizando un tinte fluorescente hidrofóbico que exhiba distintas características fluorescentes dependiendo de las propiedades del medio de disolución. Un ejemplo de ello es la Hipericina, que es sensible a la polaridad del medio y muestra un comportamiento fluorescente distinto en disoluciones micelares y no micelares.

Se ponen los viales 10 minutos en el ultrasonido y se miden mediante la espectrometría de fluorescencia., a una longitud de onda nuestro de 555 nanómetros.

A continuación, se muestran los espectros de emisión fluorescente obtenidos y la representación gráfica de la intensidad obtenida para diferentes concentraciones de Val-Cst-Val. Se Puede observar que la intensidad de emisión disminuye con el aumento de la concentración del compuesto estudiado en todos los casos. Esto es debido al “quencheo” parcial de la emisión fluorescente causado probablemente por los grupos disulfuro y amonio.

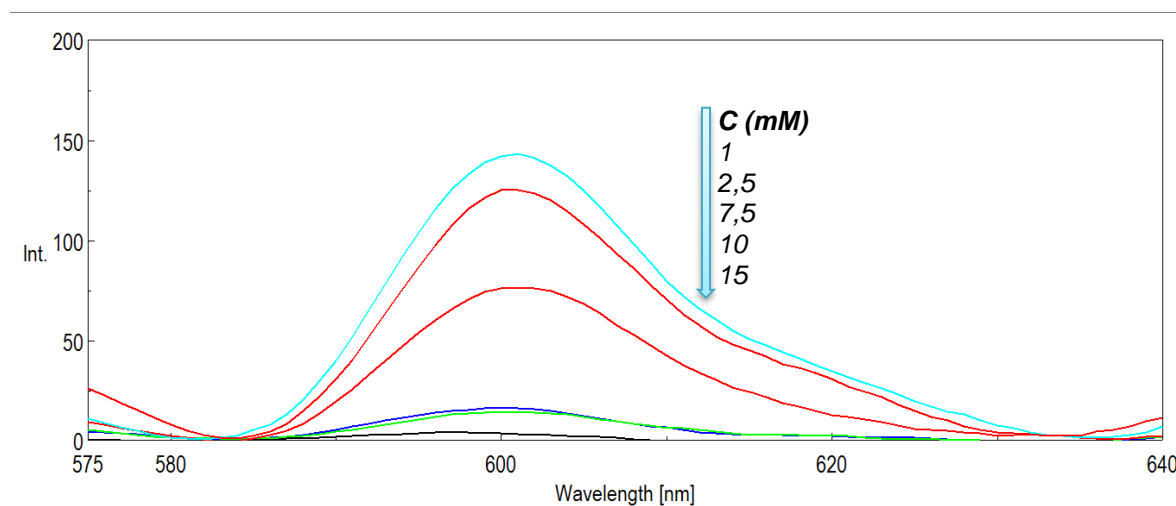


Figura 19. Superposición de espectros de fluorescencia de la hipericina ($\lambda_{ex} = 555 \text{ nm}$) obtenidos para distintas concentraciones del Val-Cst-Val.

La representación gráfica de estos datos permite observar un punto de discontinuidad claro alrededor de una concentración de Val-Cst-Val de 8 mM, que correspondería a la formación de agregados (Figura 20).

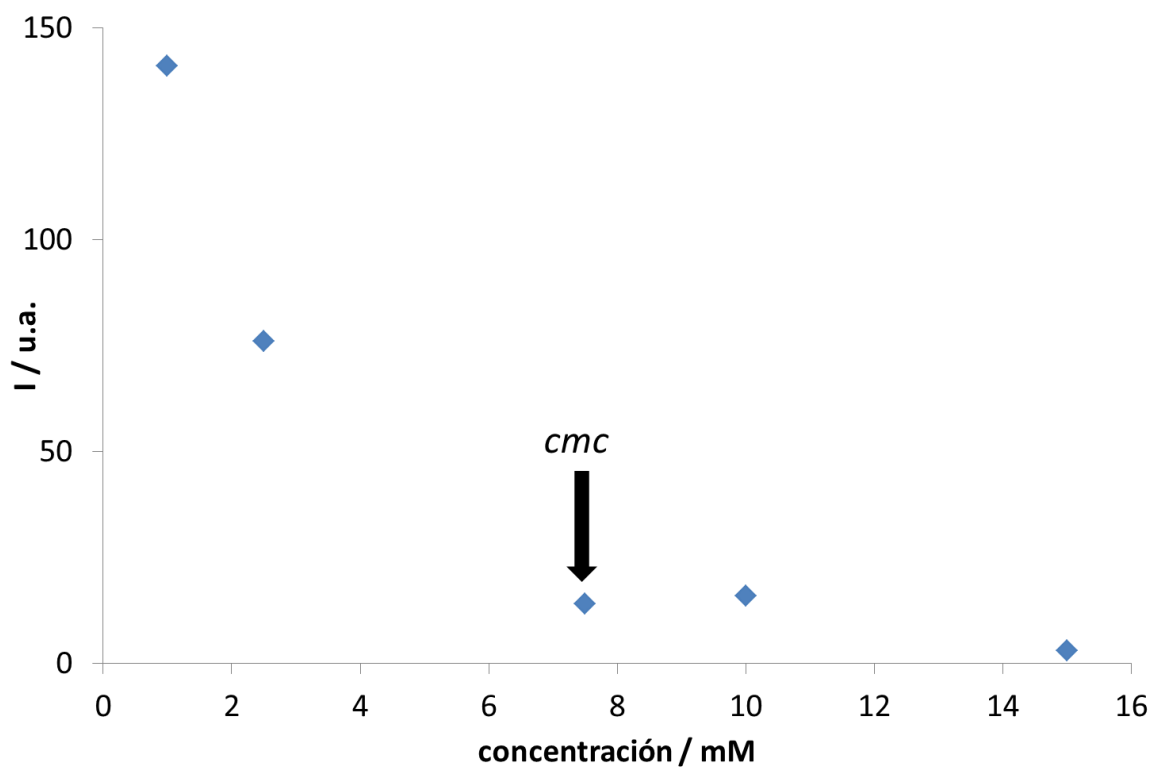


Figura 20. Variación de la intensidad de emisión fluorescente de Hipericina en función de la concentración Val-Cst-Val.

3.3. Determinación del tamaño de las nanopartículas de los compuestos Val-Cst-Val y Val-Dec-Val-2HCl mediante DLS

La detección de la dispersión de la luz en la materia es una técnica muy útil con aplicaciones en una multitud de disciplinas científicas en las que, dependiendo de la fuente de luz y el detector, se pueden estudiar distintas propiedades de las moléculas.²⁰

Einstein y Smoluchowski propusieron que un líquido debe considerarse como un medio continuo donde las fluctuaciones térmicas crean heterogeneidades que resultan en fluctuaciones en su densidad y concentración. También establecieron la teoría del movimiento Browniano, que explica el movimiento de las partículas en un fluido. Este principio describe como las partículas están continuamente colisionando con las moléculas del disolvente, generando una cierta cantidad de energía que se transfiere, lo que causa más movimiento.²¹

Cuando un haz de luz monocromático se encuentra con una disolución que contiene macromoléculas, la luz se dispersa en todas las direcciones en función del tamaño y la forma de estas macromoléculas. En la dispersión de luz estática, la intensidad de la luz dispersada se puede analizar como intensidad media a lo largo del tiempo, lo que proporciona información sobre el peso molecular y el radio de las macromoléculas.

Por otro lado, si se analizan las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada, se puede obtener el coeficiente de difusión de estas macromoléculas. La dispersión de luz dinámica, “dynamic light scattering” (DLS), mide primeramente el movimiento browniano de las macromoléculas de la disolución y lo relaciona con el tamaño de la partícula. Este movimiento depende, como hemos indicado, del tamaño, de la temperatura y de la viscosidad del disolvente, por lo que es imprescindible conocer esta información del disolvente a utilizar para la medida. Conociendo todos estos valores se calcula el tamaño de partícula mediante la ecuación de Stokes- Einstein:

$$dH = kT / 3\eta\pi D$$

Dónde:

- **dH**: diámetro hidrodinámico
- **k**: constante de Boltzman
- **T**: temperatura absoluta
- **η** : viscosidad del disolvente
- **D**: coeficiente de difusión

Tras la medida en el equipo de DLS de una disolución de Val-Cst-Val en tampón CTRT (citrato de sodio) pH=6.9, la distribución de tamaños de partícula obtenida es la que se muestra en la figura 21. Puede observarse una distribución simétrica de tamaños monomodal con un máximo alrededor de 1400 nm. Este elevado tamaño sugiere que los agregados observados por esta técnica serían liposomas.

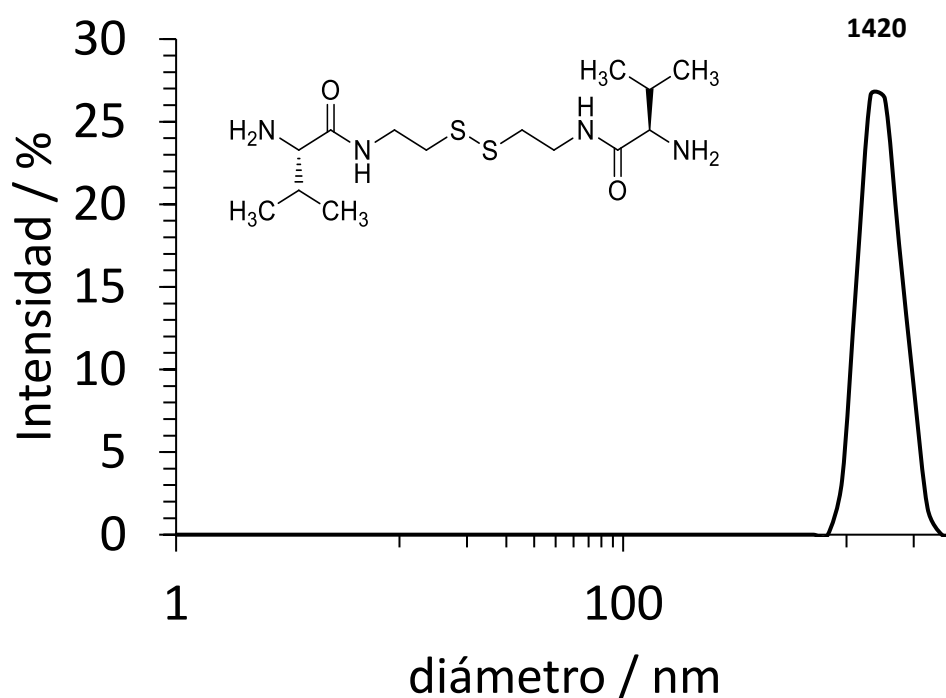


Figura 21. Distribución de tamaño de partícula determinado por DLS para los agregados formados por Val-Cst-Val a pH 6.9.

En el caso del compuesto Val-Dec-Val en tampón CTRT (citrato de sodio) pH=6.9 la distribución de tamaños de partícula obtenida muestra también distribución simétrica de tamaños monomodal con un máximo alrededor de 500 nm, que también indicaría la presencia de liposomas.

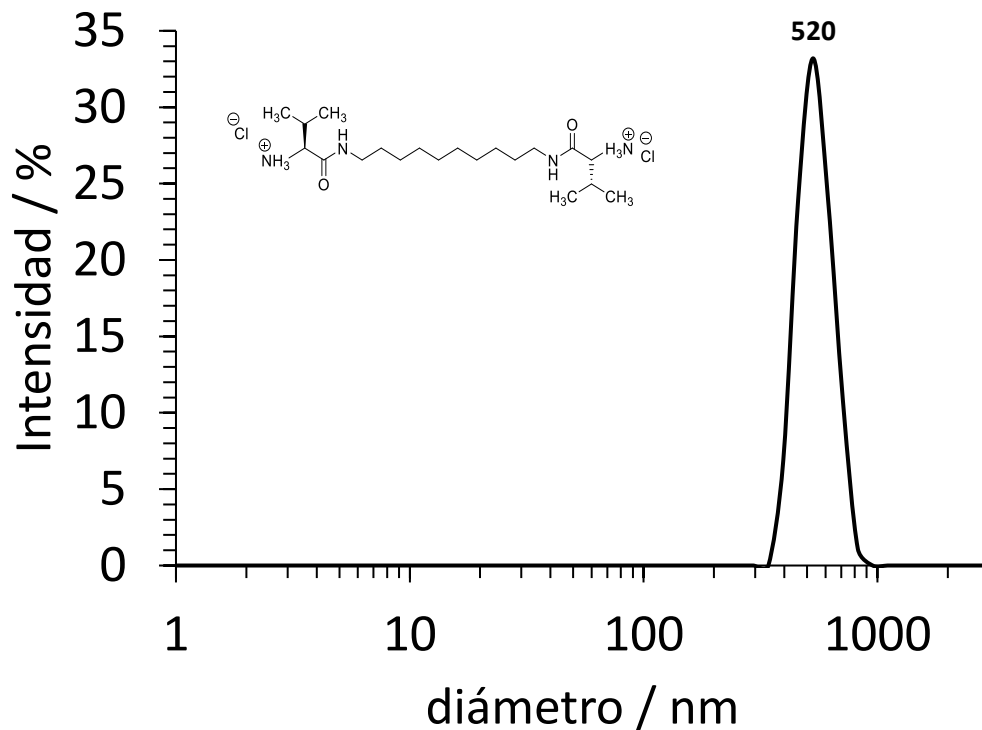


Figura 22. Distribución de tamaño de partícula determinado por DLS para los agregados formados por Val-Dec-Val-2HCl a pH 6.9

3.4. Estudio de la sensibilidad al glutatión de los agregados de Val-Cst-Val mediante DLS ²²

Tal y como se muestra en la siguiente Figura el GSH rompe los puentes disulfuro mediante un proceso de reducción. En el caso de la molécula Val-Cst-Val, se utilizó DLS para evaluar si la adición de GSH provocaba la desagregación de las nanopartículas formadas. Para ello, se realizó la medición de la intensidad de luz dispersada por DLS a diferentes intervalos de tiempo después de la adición de GSH. Como puede observarse en la Figura 24 al cabo de cuatro horas la intensidad (kilocuentas por segundo, kcps) disminuye aproximadamente a la mitad, sugiriendo que tiene lugar el desembalaje debido a la reducción del grupo disulfuro de Val-Cst-Val.

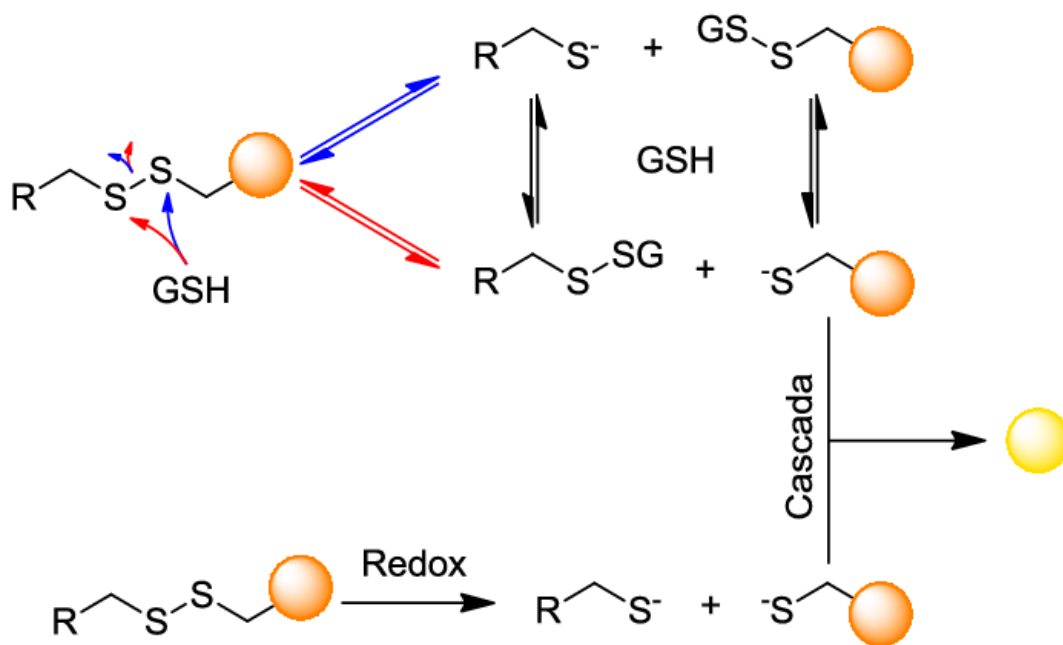


Figura 23. Reducción del puente disulfuro mediante GSH

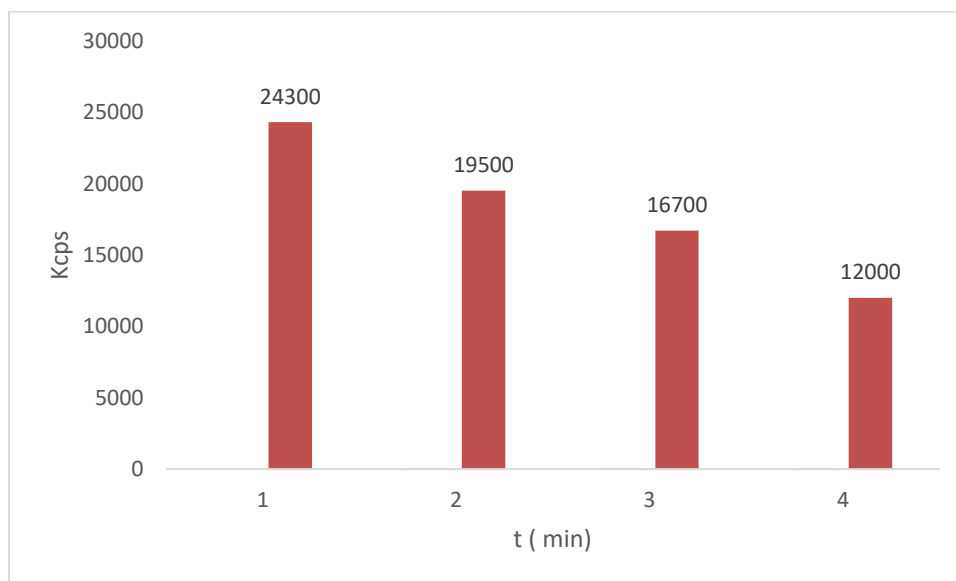


Figura 24. Variación de la intensidad de luz dispersada por DLS (kilocuentas por segundo) para una disolución de nanopartículas de Val-Cst-Val (10 mM) tras adicionar GSH (20 mM).

Conclusiones

4. Conclusiones

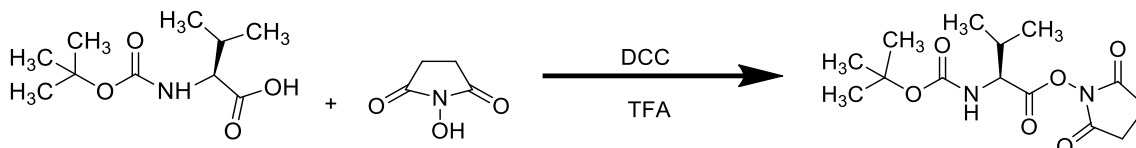
- La síntesis de los compuestos Val-Cst-Val y Val-Dec-Val-2HCl es viable pudiéndose obtener con la pureza suficiente sin necesidad de separaciones cromatográficas
- El estudio la fluorescencia de la hipericina en presencia de Val-Cst-Val indica que este presenta una concentración crítica de agregación en torno a 8 mM.
- El análisis por DLS del compuesto Val-Cst-Val muestra que este se agrega para dar partículas con un diámetro promedio de 1400 nm
- El análisis por DLS del compuesto Val-Dec-Val-2HCl muestra que este se agrega para dar partículas con un diámetro promedio de 520 nm
- La medición de la intensidad de luz dispersada por DLS sugiere que las partículas formadas por Val-Cst-Val se desagregan en presencia de glutatión.

Sección experimental

5. Sección experimental

5.1. Proceso de la Síntesis del Val-Cst-Val

- Síntesis del Boc-Val-OSu



Se disuelve BocValOH 10 g (0.046 mol, eq) y N-Hydroxysuccinimida 5.351 g (0.046 mol, 1 eq) en 80 mL de THF, y se pone en un baño de hielo, en agitación y bajo atmósfera de Nitrógeno.

Después de 10 min, se le añade gota a gota, una disolución de 1,3-Diciclohexylcarbodiimide 9.497 g (0.046 mol, 1. eq) en 40 mL de THF.

Se mantiene en agitación durante 1h, en baño de hielo y bajo atmósfera de Nitrógeno. y se guarda en el congelador durante todo el fin de semana.

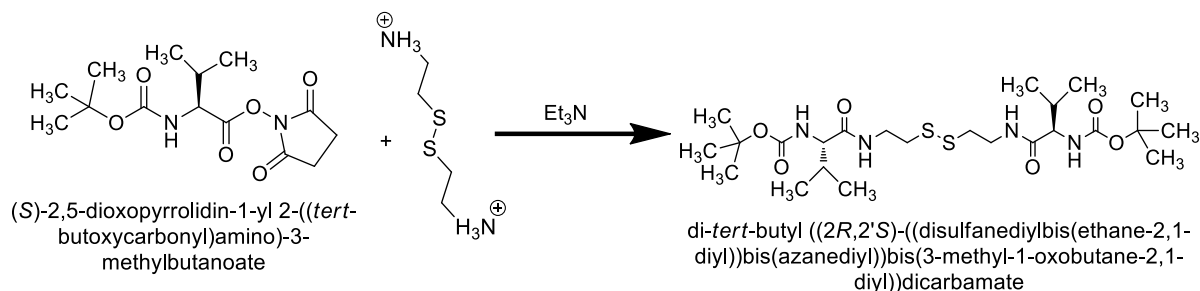
Se filtra la mezcla resultante en frío, y se obtiene un precipitado, que se seca a vacío.

El sólido se cristaliza en isopropanol 80mL y a una temperatura de 90°C, luego se filtra a vacío y se deja secar en la estufa.

Se obtiene 3,915 g, 0.012 mmol de producto final. Rendimiento 77%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.92 (d, 1H), 4.52 (m, 1H), 2.77 (s, 4H), 2.21 (m 1H), 1.48 (s, 9H), 1.14 – 0.73 (m, 6H).

- **Boc-Val-Cst-Val-Boc**



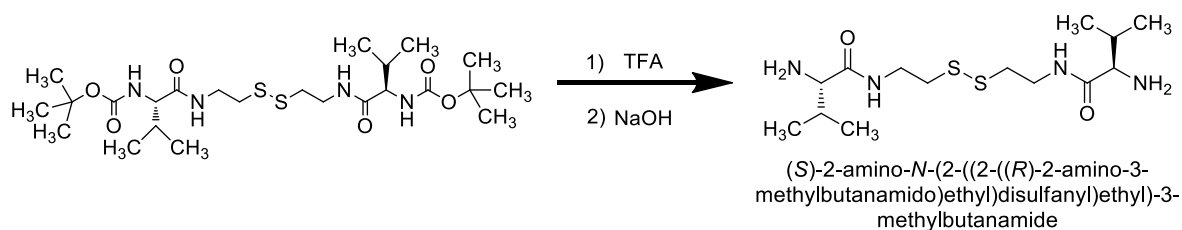
A una disolución de la cisteamina 1,192 g (5,294 mmol ,1 eq) y Triethylamina 1,071 g (10,587 mmol , 2 eq) en THF (60 mL) se le añadió el compuesto BocValOsu3,328 g (10,587 mmol , 2 eq) gota a gota y bajo atmosfera de Nitrógeno .

La mezcla resultante se dejó agitando y calentando a temperatura de 55°C durante una noche.

Pasado este tiempo la mezcla se puso en el rotavapor obteniendo un compuesto sólido que se lavó con una HCl (0.1M), NaOH (0.1 M) y agua destilada. Se secó en estufa de vacío para dar lugar a 2,156 g, 3,915 mmol del producto final. Rendimiento 74%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (m, 1H), 5.52 (m, 1 H), 4.03 (t, 2H), 3.82 – 3.33 (m, 4H), 3.09 – 2.53 (m, 4H), 2.05 (m, 2H), 1.43 (s, 18H), 0.95 (t, 12H)

- **Val -Cst-Val**



Una disolución Boc-Val-Cst (2.156 g, 3.915 mmol, 1 eq) en 8 mL de CH₂Cl₂, se pone en agitación y bajo atmósfera de nitrógeno añadiendo poco a poco 10 mL de TFA.

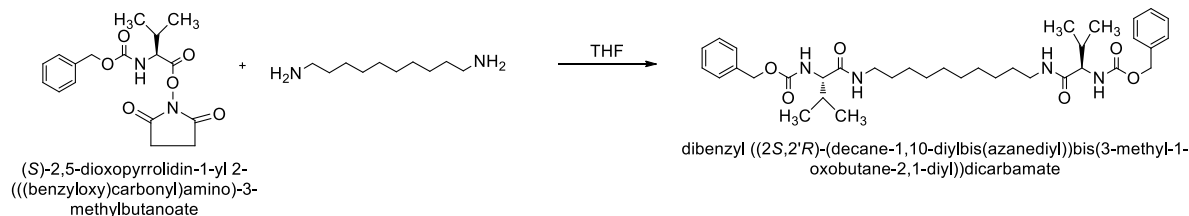
Después de 30 minutos la mezcla resultante se pone en el rotavapor para evaporar el disolvente. Se obtiene un aceite anaranjado, se le añade agua destilada hasta que se disuelve completamente, luego se basificó con perlas de NaOH.

El producto ValCstVal se extrae con diclorometano y la fase orgánica y se seca con sulfato de magnesio MgSO₄. Tras evaporar se obtienen 1,2 g, 3,423 mmol del producto deseado. Rendimiento 88%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (m, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.32 (d, 1H), 2.75 (t, 2H), 2.20 (m, 1H), 0.84 (dd, 6H)

5.2. Proceso de la Síntesis del Val-Dec-Val-2HCl

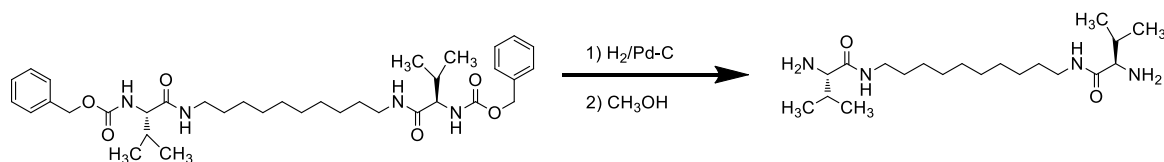
• Z-Val-Dec-Val-Z



A una disolución del 1,10-diaminodecane 0,57 g (3,310 mmol, 1 eq) en 45 mL de THF se le añade gota a gota ZValOSu 0,002 g (0,007 mmol, 1 eq) disuelto en 40mL de THF y se dejó toda la noche a una temperatura de 50°C. Pasado este tiempo la mezcla se puso en el rotavapor obteniendo un compuesto sólido que se lavó con una HCl (0.1M), NaOH (0.1 M) y agua destilada. Se secó en estufa de vacío para dar lugar a 0.164g, 0.256 mmol del producto final. Rendimiento 78%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 9H), 5.85 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.15 (m, 1H), 2.13 (m, 2H), 1.42 (m, 1H), 1.25 (m, 17 H), 0.8 (m, 12 H).

• Val-Dec-Val

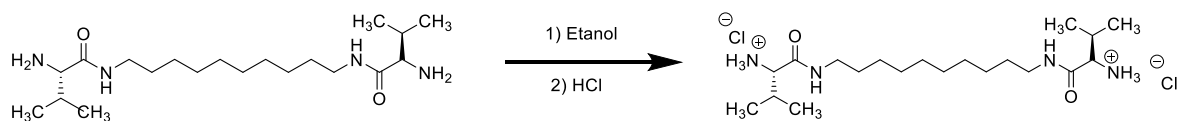


En un matraz redondo de dos bocas se introduce el compuesto Z-Val-Dec-Val-Z (0.810 g, 0.001mmol), se le añade 0,243 g del catalizador Pd/C y 150 mL de CH₃OH y se deja la mezcla en agitación. Luego en una de las bocas del matraz, se coloca un tapón pinchado con una aguja para purgar el oxígeno, bajo atmosfera de nitrógeno. Se prepara un globo con hidrógeno que se coloca en la boca vertical del matraz, dejando la reacción durante toda la noche. Se elimina el Pd/C mediante filtración sobre Celite. En este momento, se

elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose del producto deseado (0,75 g, 0.002mmol). Rendimiento 70%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (s, 2H), 3.76 – 3.38 (m, 2H), 3.35 – 3.10 (m, 4H), 2.44 – 2.09 (m, 2H), 1.77 – 1.20 (m, 12H), 1.07 – 0.61 (m, 12H).

- **Val-Dec-Val. 2 HCl**



A una disolución del Val-Dec-Val en 20 mL de etanol, se le burbujea HCl (g) formado a partir de cloruro de sodio y ácido sulfúrico. Se evapora el disolvente en el rotavapor para dar lugar a un sólido blanco que se seca en la estufa. Rendimiento 60%

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.55 (dd, $J = 39.6, 34.1$ Hz, 1H), 8.18 (s, 3H), 3.70 – 3.46 (m, 1H), 3.19 (tt, $J = 34.3, 17.2$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 36.0, 29.1$ Hz, 1H), 2.26 – 1.83 (m, 1H), 1.34 – 1.16 (m, 6H), 1.03 – 0.74 (m, 6H).

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografía

1. Castro, N. P., Olivero, J., Juan, V. & Padilla, R. Nanotecnología aplicada a la medicina * Nanotechnology applied to medicine. *Revista Científica Guillermo de Ockham* **11**, (2009).
2. ETHERIDGE, M. L. , C. S. A. , E. A. G. , H. C. L. , W. S. M. , M. J. “The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products”. En *Nanomedicine*. *9(1)*, pp 1-14 (2013).
3. PUURUNEN, K. , V. P. “Opportunities for utilising nanotechnology in reaching near-zero emissions in the paper industry” . . *En J Clean Prod*. *15(13-14)*, pp 1287-1294 (2007).
4. ¿Como son fabricadas las Nanopartículas? | NANOVA. <https://nanova.org/fabricacion-de-nanoparticulas/>.
5. ZHANG, L. , W. T. “Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration” . . *En Nano Today*. *4(1)*, pp 66-80. (2009).
6. Burrows, C. J. *et al.* Update to Our Reader, Reviewer, and Author Communities - April 2020. *ACS Materials Letters* **2**, 563–564 (2020).
7. Fang, F., Li, M., Zhang, J. & Lee, C. S. Different Strategies for Organic Nanoparticle Preparation in Biomedicine. *ACS Materials Letters* **2**, 531–549 (2020).
8. Plastinin, I. v., Burikov, S. A. & Dolenko, T. A. Laser diagnostics of reverse microemulsions: Influence of the size and shape of reverse micelles on the Raman spectrum on the example of water/AOT/cyclohexane system. *Journal of Molecular Liquids* **325**, 115153 (2021).
9. Xu, J. *et al.* Future of the Particle Replication in Nonwetting Templates (PRINT) Technology. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 6580–6589 (2013).
10. NANOVEHÍCULOS: FÁRMACOS INTELIGENTES. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/tecnologia/230-numero-26/413-nanovehiculos-farmacos-inteligentes.html>.
11. Drug Delivery - HMX | Harvard Medical School. https://onlinelearning.hms.harvard.edu/hmx/hmx-pro/drug-delivery/?msclkid=352309b839331c58bc42682967cc44d2&utm_source=bing&utm_medium=cpc&utm_campaign=PPhRM_DEL&utm_term=%2Bdrug%20%2Bdelivery&utm_content=PPhRM_DEL.
12. Cheng, R. *et al.* Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **152**, 2–12 (2011).

13. - ¿Qué es el glutatión y para qué sirve? <https://www.farmaciaserra.com/blog/que-es-glutation-para-que-sirve.html>.
14. Ait-Oudhia, S., Mager, D. E. & Straubinger, R. M. Application of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis to the Development of Liposomal Formulations for Oncology. *Pharmaceutics* 2014, Vol. 6, Pages 137-174 **6**, 137–174 (2014).
15. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **66**, 2–25 (2013).
16. Hrkach, J. S., Peracchia, M. T., Domb, A., Lotan, N. & Langer, R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by ¹H NMR spectroscopy. *Biomaterials* **18**, 27–30 (1997).
17. Lundt, B. F., Johansen, N. L., Vølund, A. & Markussen, J. REMOVAL OF t-BUTYL AND t-BUTOXYCARBONYL PROTECTING GROUPS WITH TRIFLUOROACETIC ACID. *International Journal of Peptide and Protein Research* **12**, 258–268 (1978).
18. Fluorescence - Introduction to Fluorescence | Olympus LS. <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluorointroduction/>.
19. Hypericin: the active ingredient in Saint John's Wort. <https://web.archive.org/web/20070928004046/http://www.delano.com/ReferenceArticles/Hypericin-Active.html>.
20. Gandhi, K. Nano-Technological and Biochemical Techniques for Assessing the Quality and Safety of Milk and Milk Products. *ICAR-National Dairy Research Institute, Karnal* doi:10.13140/RG.2.2.12306.50883.
21. Christensen Jr., W. J. The Mind-Brain Problem Bose-Einstein Statistics, Temperature, Heat, Entropy God and Other Elementary Particles. *Journal of Modern Physics* **11**, 1330–1360 (2020).
22. Comparación entre un sistema de escisión de enlaces disulfuro mediante... | Download Scientific Diagram. https://www.researchgate.net/figure/Figura-104-Comparacion-entre-un-sistema-de-escision-de-enlaces-disulfuro-mediante_fig19_278678440.

Anexos

7.Anexos

7.1. Espectros RMN

7.1.1. RMN de la Síntesis del Val-Cst-Val

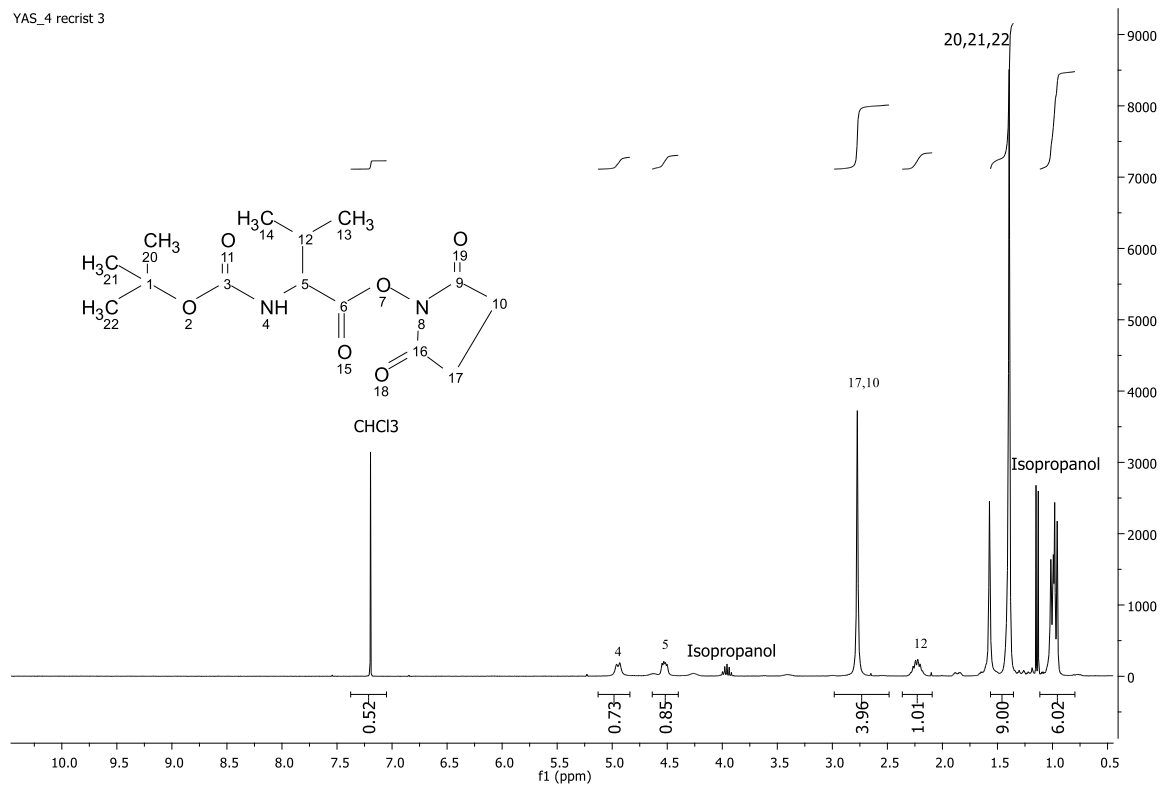


Figura 25. ¹H RMN (CDCl₃) Boc-Val-Osu

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.92 (d, 1H), 4.52 (m, 1H), 2.77 (s, 4H), 2.21 (m 1H), 1.48 (s, 9H), 1.14 – 0.73 (m, 6H).

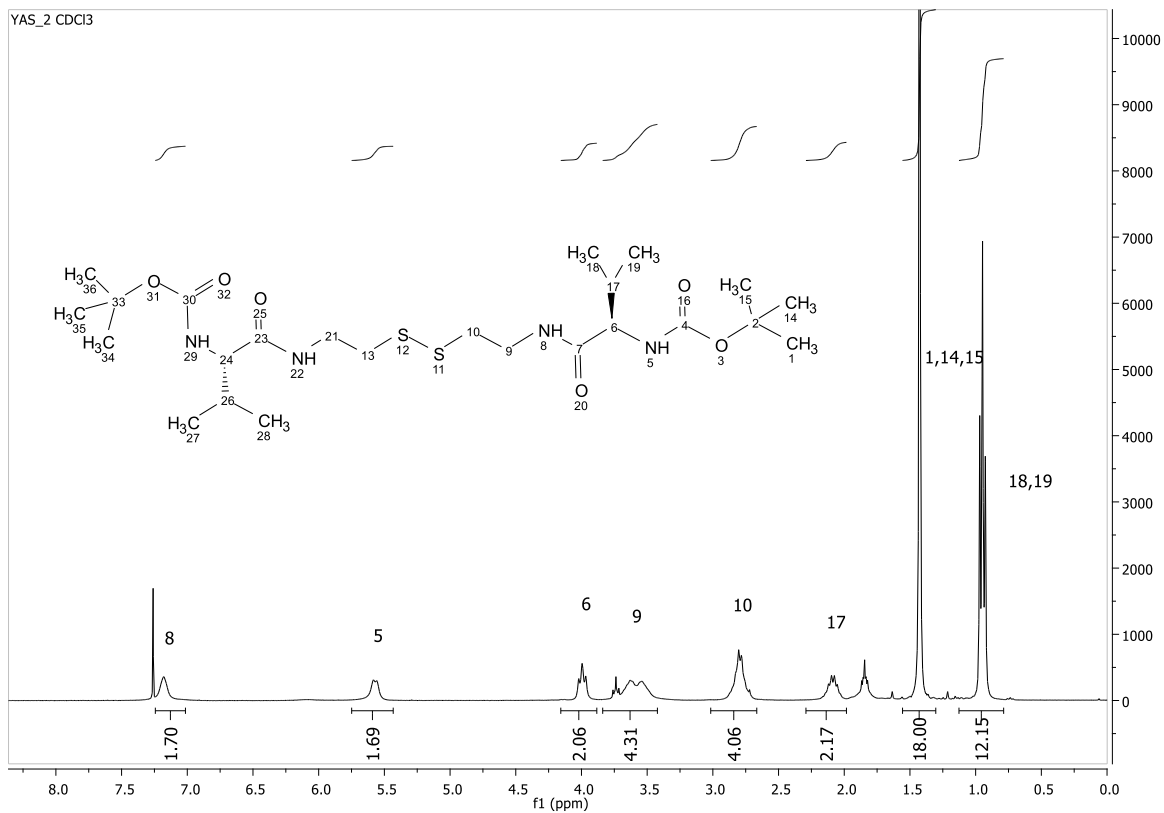


Figura 26. ^1H RMN (CDCl_3) Boc-Val-Cst

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.22 (m, 1H), 5.52 (m, 1H), 4.03 (t, 2H), 3.82 – 3.33 (m, 4H), 3.09 – 2.53 (m, 4H), 2.05 (m, 2H), 1.43 (s, 18H), 0.95 (t, 12H)

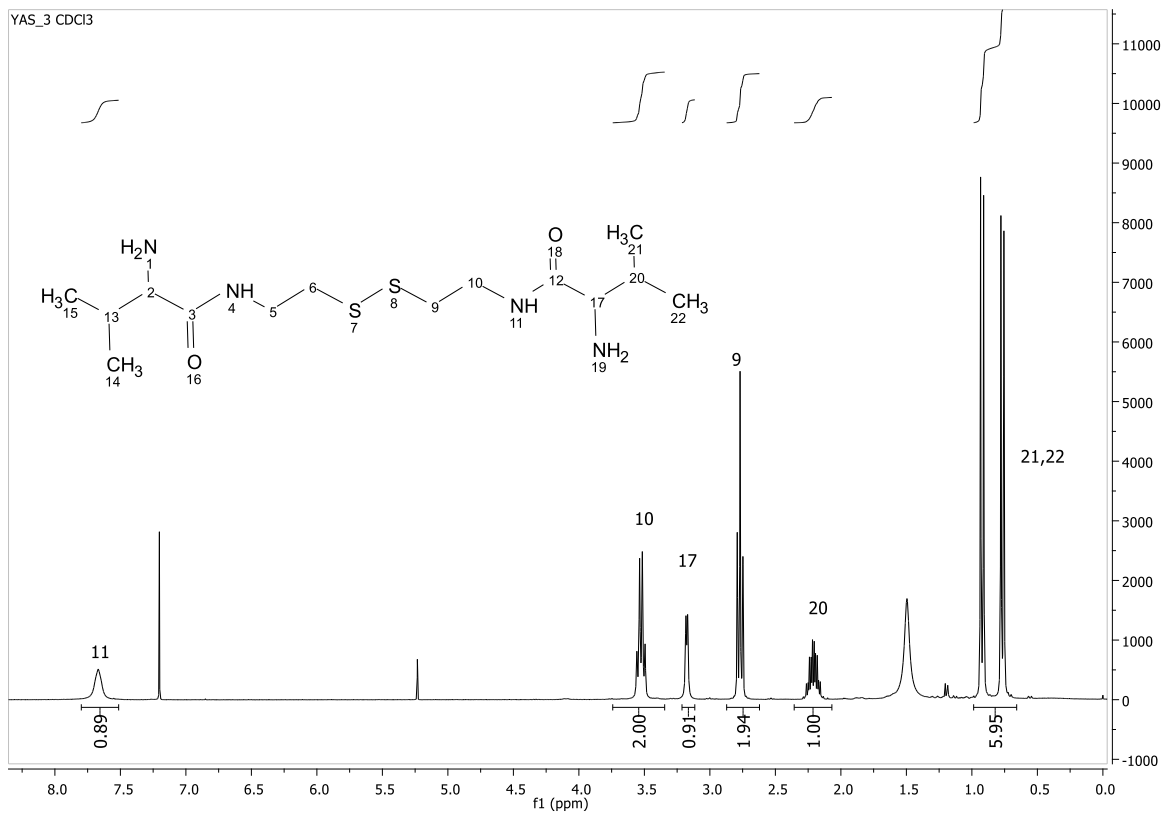


Figura 27. ¹H RMN (CDCl₃) ValCstVal

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (m, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.32 (d, 1H), 2.75 (t, 2H), 2.20 (m, 1H), 0.84 (dd, 6H)

7.1.2. RMN de la Síntesis del Val-Dec-Val-2HCl

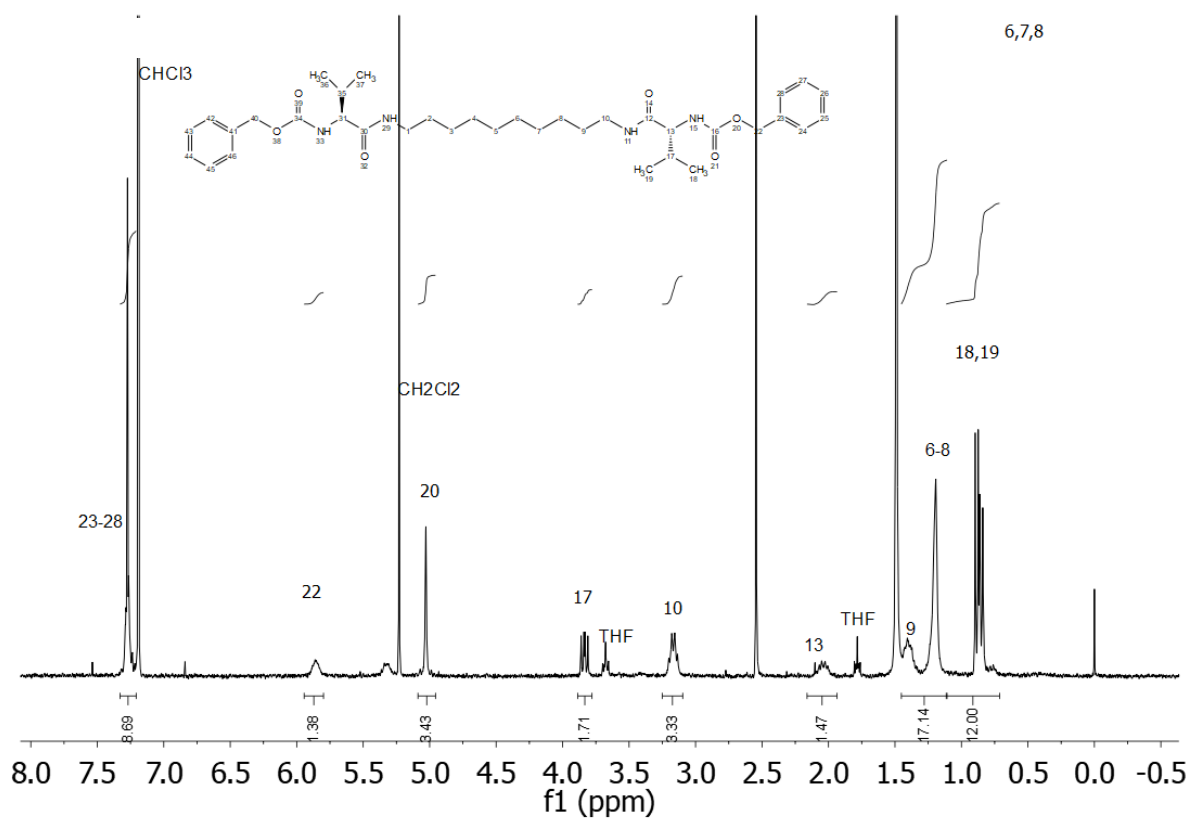


Figura 28 . ^1H RMN (CDCl_3) Cbz-Val-Dec

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.30 (m, 9H), 5.85 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 3.15 (m, 1H), 2.13 (m, 2H), 1.42 (m, 1H), 1.25 (m, 17 H), 0.8 (m, 12 H).

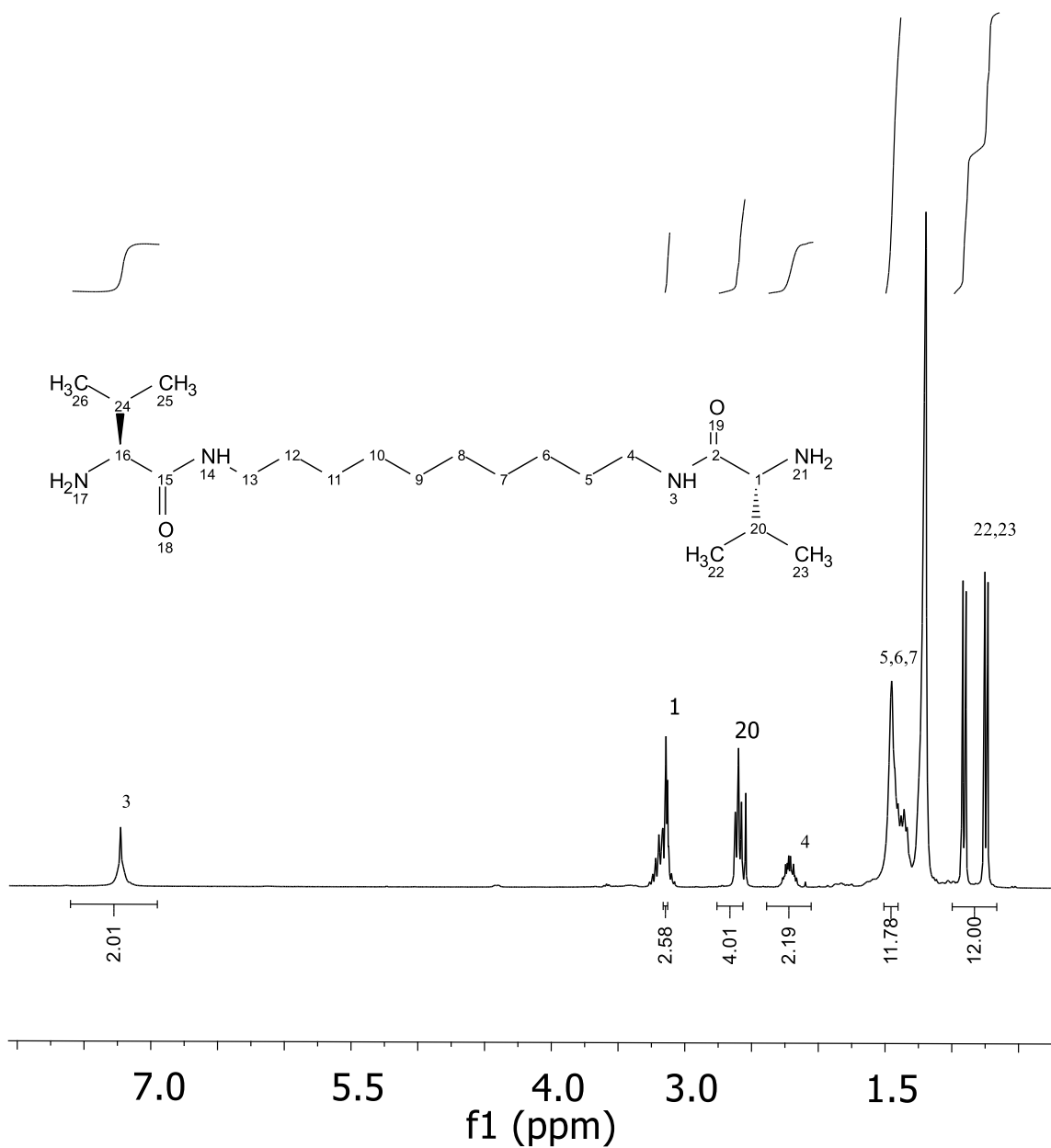


Figura 29 . 1H RMN (CDCl₃) ValDecVal

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (s, 2H), 3.76 – 3.38 (m, 2H), 3.35 – 3.10 (m, 4H), 2.44 – 2.09 (m, 2H), 1.77 – 1.20 (m, 12H), 1.07 – 0.61 (m, 12H).

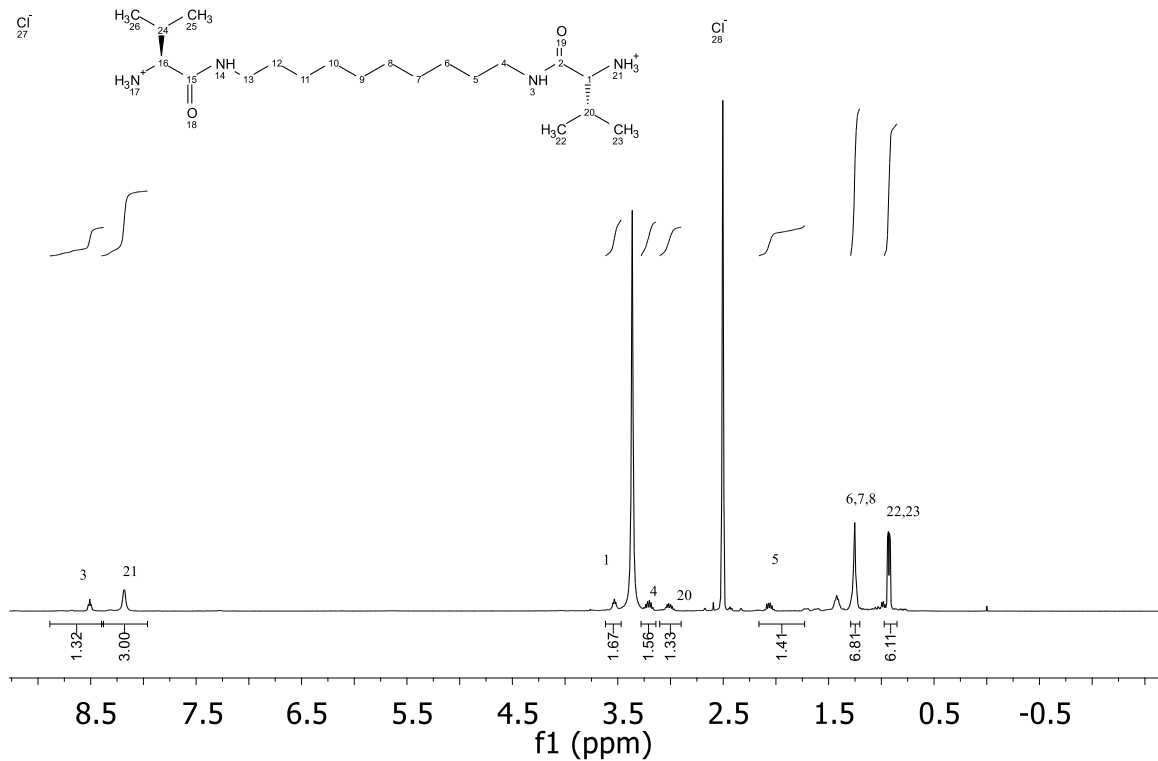


Figura 30 . 1H RMN (DMSO) Val-Dec-Val.2 HCl

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.55 (dd, $J = 39.6, 34.1$ Hz, 1H), 8.18 (s, 3H), 3.70 – 3.46 (m, 1H), 3.19 (tt, $J = 34.3, 17.2$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 36.0, 29.1$ Hz, 1H), 2.26 – 1.83 (m, 1H), 1.34 – 1.16 (m, 6H), 1.03 – 0.74 (m, 6H).

