



SÍNTESIS DE NUEVOS BOLAANFÍFILOS CATIÓNICOS CON GRUPOS TERMINALES N-METILPIRIDINIO

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales

Departamento de Química Inorgánica y Orgánica

Laura Camila Rodríguez Moreno

Trabajo Final de Máster

Castelló de la Plana, Septiembre 2023

Abreviaturas

d	Doblete
dd	Doble doblete
DIPEA	N, N-diisopropiletilamina
DLS	Dynamic light scattering
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
m	Multiplete
MHz	Megahercios
ppm	Partes por millón (desplazamiento químico)
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
t	Triplete
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato
TEM	Transmission electron microscopy
THF	Tetrahidrofurano
d	Doblete
dd	Doble doblete
DIPEA	N, N-diisopropiletilamina
DLS	Dynamic light scattering
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
m	Multiplete
ppm	Partes por millón (desplazamiento químico)

Agradecimientos

Primero quería dar las gracias a Dr. Juan F. Miravet, el supervisor de este trabajo, por el tiempo que me ha dedicado durante estos meses, por su apoyo y enseñanzas.

Al Dr. César A. Angulo Pachón, muchas gracias por el acompañamiento, por todo lo que me ha enseñado y por el tiempo que me ha dedicado siempre con una muy buena actitud y amabilidad, y con deseo de compartir sus conocimientos.

Finalmente, a mi familia, gracias por estar a mi lado siempre y apoyarme en todo momento sin importar la distancia.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	LIPOSOMAS EN NANOMEDICINA	5
1.2.	LIPOSOMAS CATIONICOS	7
1.3.	BOLAANFÍFILOS	9
1.4.	ARTÍCULOS RECIENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACION EN EL ESTUDIO DE AGREGACIÓN DE ANFÍFILOS Y BOLAANFÍFILOS	11
2	OBJETIVOS	15
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1	Síntesis de MePVal12 y MePVal3	16
3.2	Estudio de la agregación de MePVal12	17
3.3	Estudios pendientes	20
4	CONCLUSIONES	21
5	SECCIÓN EXPERIMENTAL	22
5.1	Métodos Generales	22
5.2	Procedimientos sintéticos	22
5.3	Obtención de MePVal3·I y MePVal12·I	25
5.4	Obtención del producto final, MePVal3 y MePVal12	26
6	ANEXOS	27
6.1	Espectros RMN	27
6.2	Espectro de masas	29
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LIPOSOMAS EN NANOMEDICINA¹⁻²

La nanomedicina es un campo revolucionario que ha abierto nuevas oportunidades terapéuticas a escala nanométrica para el tratamiento, prevención y diagnóstico de diversas enfermedades. Una de las tecnologías clave en este campo son los sistemas de administración de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés), que utilizan nano-vehículos para mejorar la eficacia de los medicamentos, aumentar su concentración en el sitio deseado y reducir los efectos secundarios. Estos DDS pueden estar compuestos por una amplia variedad de nanopartículas (NP) de diferentes tamaños, materiales y formas, incluyendo cerámica, polímeros, metales y lípidos, como las micelas y, especialmente, los liposomas.

Los liposomas son nanoestructuras versátiles que desempeñan un papel fundamental en la nanomedicina. Están compuestos por una estructura hueca esférica formada por fosfolípidos dispersos en una solución acuosa. La belleza de los liposomas radica en su capacidad de ser moldeados y personalizados según las necesidades terapéuticas específicas. Entre sus propiedades controlables se encuentran la composición lipídica, el tamaño, la estructura, la morfología, la carga superficial y la posibilidad de funcionalizar su superficie con polímeros o ligandos.

La capacidad de los liposomas para encapsular tanto compuestos hidrofílicos como lipofílicos, así como diversas biomoléculas como carbohidratos, proteínas, péptidos, ADN y compuestos de imagen, los convierte en una herramienta poderosa en la nanomedicina. Su estructura se regula mediante interacciones suaves y fenómenos de autoensamblaje, lo que afecta sus propiedades estructurales y su estabilidad en entornos biológicos.

La modificación química de los liposomas ha abierto nuevas posibilidades para mejorar su estabilidad y direccionar la entrega de fármacos a sitios específicos. Por ejemplo, los liposomas PEGilados, que incorporan una capa de polietilenglicol en su superficie, han demostrado prolongar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo, reduciendo la eliminación por el sistema inmunológico y mejorando la entrega de medicamentos.

La carga de activos en los liposomas puede lograrse de varias formas. En el método de carga pasiva, los activos se incorporan durante la preparación de los liposomas, aprovechando las propiedades de autoensamblaje de estos. En contraste, los métodos de carga activa se basan en gradientes químicos para incorporar los activos en el interior de los liposomas. Esto permite una mayor eficiencia en la encapsulación de compuestos activos y una liberación controlada.

Los métodos de preparación de liposomas incluyen el método de eliminación de detergentes y el de inyección de etanol. En el primero, los lípidos se solubilizan en una solución de detergentes, y a medida que se elimina gradualmente el detergente, se forman liposomas unilamelares. Por otro lado, en el método de inyección de etanol, los fosfolípidos disueltos en etanol se inyectan en un tampón acuoso, lo que promueve la autoorganización de los lípidos y la formación de liposomas unilamelares.

En resumen, los liposomas son herramientas esenciales en nanomedicina con aplicaciones diversas debido a su capacidad de encapsulación, orientación y entrega de compuestos activos. Su diseño y modificación cuidadosos permiten optimizar sus propiedades para aplicaciones específicas, lo que ha impulsado avances significativos en la administración de fármacos y la terapia dirigida en el campo de la medicina.

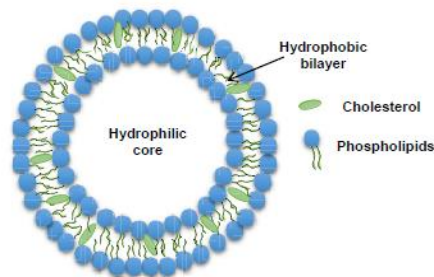


Figura 1 Representación de un liposoma ²

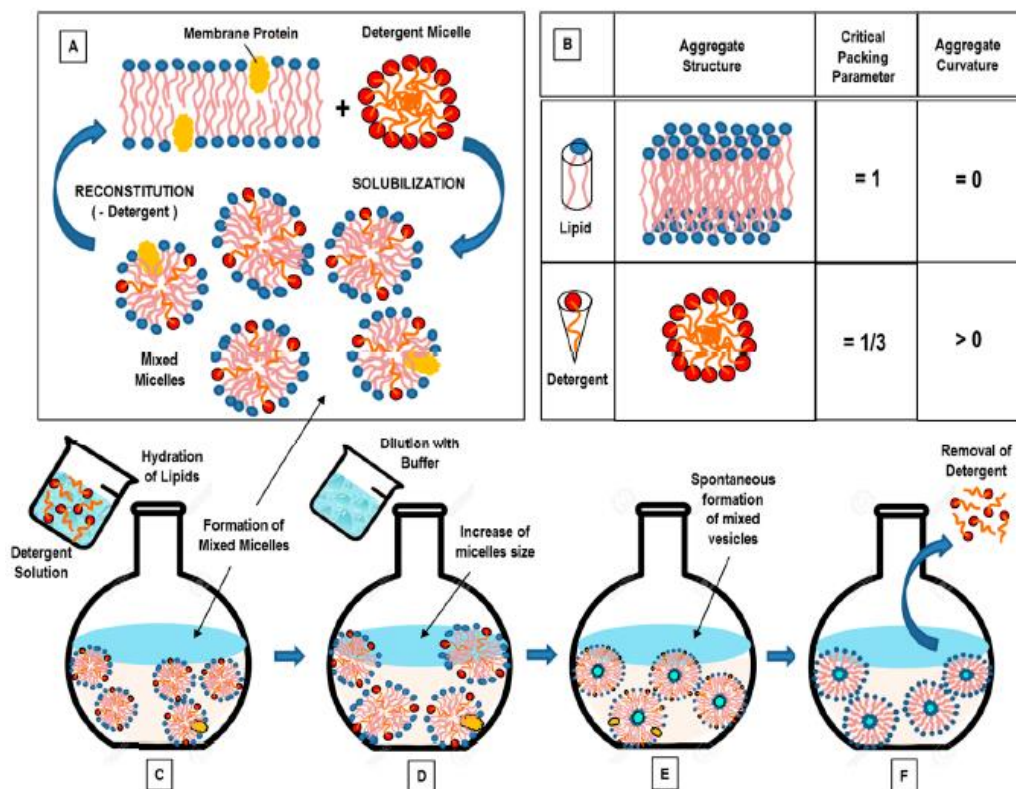


Figura 2 Proceso de autoensamblaje en mezclas de lípidos y detergentes. (A) Solubilización de membrana y reconstitución mediante adición (o eliminación) de detergentes. (B) Geometrías moleculares características, y estructuras de agregados de lípidos (puros) y detergentes. (C–F) Principales etapas de la eliminación del detergente método. Inicialmente, la hidratación lipídica con una solución detergente permite la formación de micelas mixtas (detergente/lípidos). (C). La dilución sucesiva de la solución micelar mixta con agua El tampón favorece un aumento del tamaño (y polidispersidad) de las micelas mixtas (D), seguido de una transición a las estructuras de las vesículas (E). El proceso de formación se completa con un complemento Método para la eliminación del detergente residual dentro de la nanoformulación liposomal (F).
 Figura 4. Proceso de autoensamblaje en mezclas de lípidos y detergentes. (A) Solubilización de membrana y reconstitución mediante adición (o eliminación) de detergentes. (B) Geometrías moleculares características, y estructuras de agregados de lípidos (puros) y detergentes. (C–F) Principales etapas de la eliminación del detergente método. Inicialmente, la hidratación lipídica con una solución detergente permite la formación de mezclas (detergente/lípidos) micelas (C). La dilución sucesiva de la solución micelar mixta con agua El buffer favorece un aumento del tamaño (y polidispersidad) de las micelas mixtas (D), seguido de una transición a las estructuras de las vesículas (E). El proceso de formación se completa con un método complementario para la eliminación del detergente residual dentro de la nanoformulación liposomal (F).³

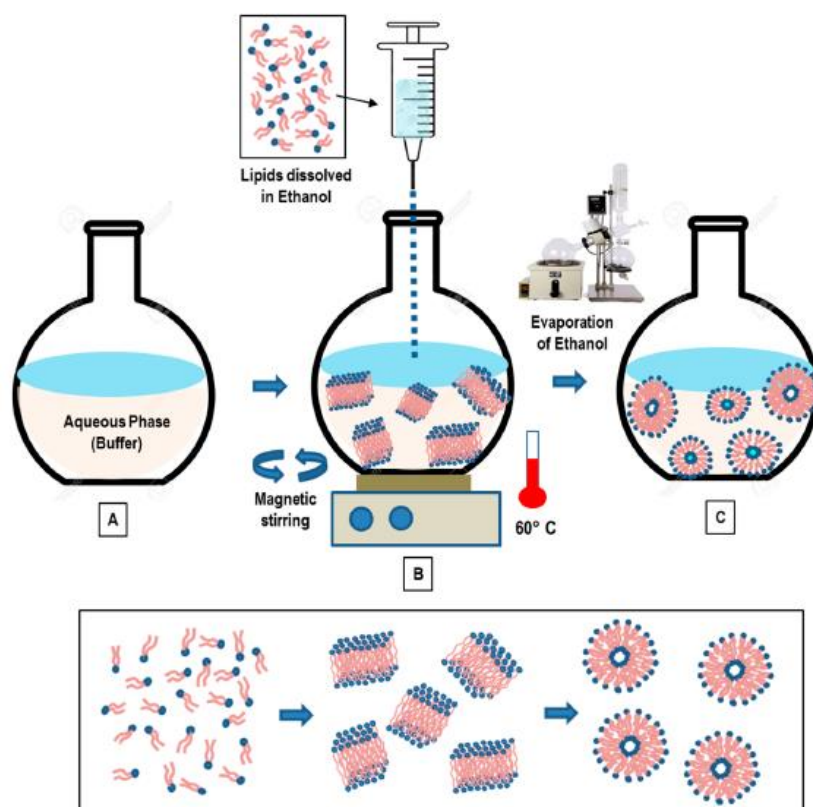


Figura 3 Representación esquemática de las principales etapas del método de inyección de etanol. Una composición de lípidos disueltos en solución alcohólica se inyecta en una fase acuosa (tampón) (A). la dilución de etanol en la solución acuosa favorece el autoensamblaje de los componentes lipídicos y la formación de fragmentos planos bicapa (B). Finalmente, la evaporación (agotamiento) del etanol favorece la fusión del fragmento de lípidos y la formación de vesículas unilaminares cerradas (SUL y LUV) (C).³

1.2. LIPOSOMAS CATIÓNICOS ^{3,4}

Las vesículas catiónicas representan una clase fascinante de nanoestructuras utilizadas en el ámbito de la terapia génica y la entrega de genes. Estas vesículas, compuestas principalmente por lípidos cargados positivamente, han revolucionado la forma en que se pueden administrar genes y medicamentos en el cuerpo humano. Su capacidad para interactuar eficazmente con ácidos nucleicos, como el ADN y el ARN, ha desencadenado avances significativos en la medicina, brindando esperanzas para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades genéticas y adquiridas.

Además de los lípidos catiónicos, las vesículas catiónicas a menudo contienen otros componentes lipídicos y moleculares que pueden influir en su estructura y funcionalidad. Estos componentes pueden incluir lípidos neutros, lípidos anfílicos y ligandos de superficie que mejoran la eficiencia de transfección o dirigen las vesículas hacia células o tejidos específicos.

La formación de las vesículas catiónicas y la posterior generación de complejos vesícula-ácido nucleico (lipoplejos) implican una serie de pasos fundamentales. A continuación, se describen las etapas principales:

- Mezcla de Lípidos Catiónicos y Ácido Nucleico: En la primera etapa, los lípidos catiónicos se combinan con el ácido nucleico de interés, generalmente ADN o ARN. La interacción electrostática entre los grupos catiónicos de los lípidos y los grupos cargados negativamente en el ácido nucleico conduce a la formación de complejos preliminares.
- Reorganización de Vesículas: En esta fase, los lípidos catiónicos y el ácido nucleico se organizan en una estructura más compleja que involucra la reorganización de las bicapas lipídicas. Las vesículas catiónicas pueden pasar de una estructura unilamelar a una estructura multilamelar, permitiendo una mayor incorporación de ácido nucleico en su interior.
- Crecimiento y Estabilización: En la etapa final, los complejos lipoplejo-ácido nucleico continúan creciendo y coalesciendo, formando estructuras más grandes y estables. La estabilización de estas estructuras es esencial para garantizar su integridad durante la administración y la entrada en las células objetivo.

Las vesículas catiónicas tienen una amplia gama de aplicaciones en la investigación y la terapia médica. Algunas de las aplicaciones más destacadas incluyen:

- Terapia Génica: Las vesículas catiónicas se utilizan para entregar genes terapéuticos a las células. Esto tiene aplicaciones en el tratamiento de enfermedades genéticas, cáncer y trastornos hereditarios.
- Inmunización: En el campo de las vacunas, las vesículas catiónicas se utilizan para administrar antígenos y mejorar la respuesta inmunológica del cuerpo. Esto puede aumentar la eficacia de las vacunas.
- Estudios de Investigación: Las vesículas catiónicas son herramientas valiosas en la investigación biomédica para estudiar la función génica y la regulación génica. Se utilizan para introducir genes específicos en células y analizar su impacto.
- Terapias de ARN: Además de la terapia génica, las vesículas catiónicas también se utilizan en la administración de ARN mensajero (ARNm) y pequeños ARN interferentes (ARNi) para modular la expresión génica y tratar enfermedades.
- Terapias de Edición Génica: Con el auge de las técnicas de edición genética como CRISPR-Cas9, las vesículas catiónicas pueden desempeñar un papel crucial en la entrega precisa de herramientas de edición genética a las células.

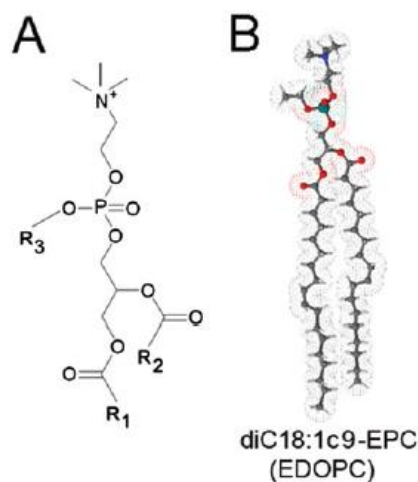


Figura 4 (A) Estructura de las fosfatidilcolinas catiónicas (PC) (1,2-diacil-sn-glicero-3-alquilfosfolinas); (B) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfolina (diC18:1-EPC; EDOPC), el representante mejor estudiado de las PC catiónicas. ⁴

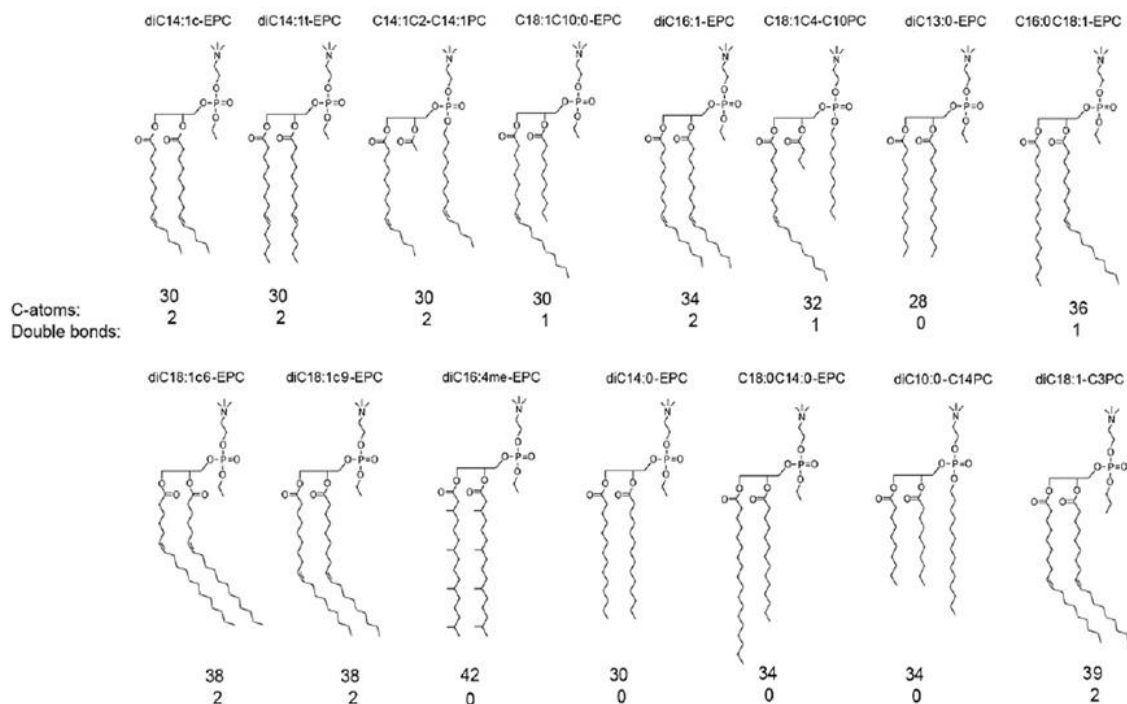


Figura 5 fosfatidilcolinas (PCs) catiónicas que exhiben una alta actividad de transfección⁴

En resumen, las vesículas catiónicas son nanoestructuras cargadas positivamente que tienen un gran potencial en una variedad de aplicaciones biomédicas, desde la terapia génica hasta la inmunización y la investigación científica. Su estructura única y su capacidad para interactuar con ácidos nucleicos los convierten en herramientas valiosas en la búsqueda de tratamientos médicos avanzados y en la comprensión de los mecanismos genéticos.

1.3 BOLAANFÍFILOS^{5,6}

Los bolaanfífilos son moléculas anfifílicas que poseen dos grupos hidrofílicos en sus extremos, separados por un espaciador hidrofóbico. Estas moléculas han sido inspiradas por la estructura única de los lípidos de membrana presentes en arqueobacterias, como las bacterias termofílicas.

Los lípidos en las arqueobacterias se distinguen por tener extremos tetraéter bipolares conectados a través de una unidad de glicerol con cadenas alquílicas macrocíclicas. Algunas de estas cadenas alquílicas incluso contienen anillos de ciclopentano, los cuales regulan la fluidez y la estabilidad térmica de la membrana. Esta peculiar estructura lipídica confiere a las arqueobacterias propiedades bioquímicas únicas en términos de fluidez de membrana, permeabilidad y estabilidad térmica en comparación con las bacterias convencionales.

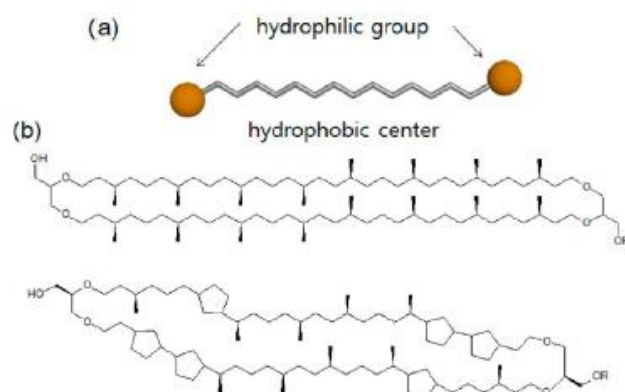


Figura 6 (a) Esquema de un bolaanfifilo idéntico se pueden introducir grupos de cabeza (simétricos) o diferentes (asimétricos) en las posiciones de cabeza hidrófilas.. (b) Ejemplos de Moléculas de lípidos de arqueas. R es H o calditol. ⁶

El interés en los bolaanfifilos se ha centrado en imitar las características esenciales de los lípidos arqueales. Para ello, se diseñan análogos que combinan segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos. Por lo general, se eligen unidades alquílicas largas o unidades isoprenílicas ramificadas como espaciadores hidrofóbicos, mientras que se incorporan grupos polares/ionizables, carbohidratos pequeños, aldonamidas diacetilénicas, biotina, aminoácidos y oligopéptidos como segmentos hidrofílicos. Estos análogos tienen la capacidad de autoensamblarse para formar estructuras planas, vesículas, hélices y nanotubos cristalinos con variaciones en su estructura y grupos químicos en función del disolvente y las fuerzas intermoleculares involucradas.

Destacan los bolaanfifilos peptídicos, que incorporan extremos de aminoácidos u oligopéptidos. A diferencia de otras moléculas anfifílicas autoensamblantes, como surfactantes o lípidos convencionales, estos compuestos pueden exhibir actividad bioquímica y biocompatibilidad gracias a la configuración y la interacción de los segmentos peptídicos hidrofóbicos. Esto los hace idóneos para controlar simultáneamente la morfología y la actividad de las estructuras autoensambladas, imitando así a las proteínas y membranas biológicas.

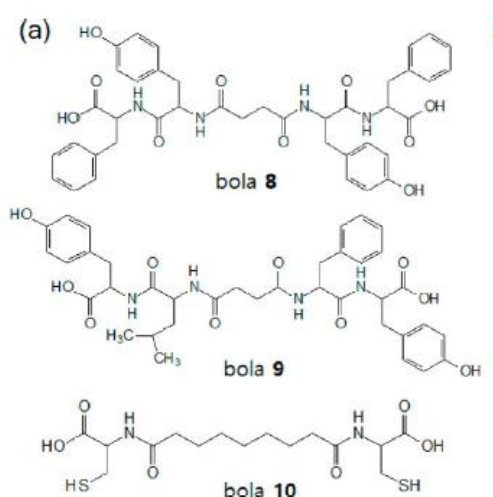


Figura 7 (a) Estructuras de bolas peptídicas que forman fibrilares o tubulares ensamblados. ⁶

En términos de aplicaciones, las vesículas bolaanfifílicas ofrecen ventajas significativas en diversos campos:

Sistemas de entrega de genes: Los bolaanfífilos peptídicos muestran promesa como portadores de genes en comparación con los liposomas tradicionales. Son altamente estables mecánicamente y pueden fusionarse con células diana. Además, pueden personalizarse para lograr un reconocimiento específico de células y una mayor eficiencia de transfección. También tienen la capacidad de liberar su carga de manera controlada en respuesta a estímulos externos, lo que es beneficioso para la entrega dirigida de genes.

Imitación de proteínas chaperonas: Estos compuestos pueden imitar la actividad de las proteínas chaperonas en sistemas de nanotubos de hidrogel, lo que resulta útil en el plegamiento de proteínas.

Estimulación de la proliferación celular: Los bolaanfífilos se pueden utilizar para crear plataformas biocompatibles que fomenten la proliferación celular en entornos tridimensionales. Estas plataformas presentan una baja toxicidad y protegen a las proteínas de tensiones externas, lo que las hace adecuadas para la proliferación celular.

1.4 ARTÍCULOS RECIENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACION EN EL ESTUDIO DE AGREGACIÓN DE ANFÍFILOS Y BOLAANFÍFILOS

*“Reduction-triggered Disassembly of Organic Cationic Nanorods Produces a Cysteine Protease Mimic”*⁷

Este artículo explora un proceso en el que se forman nanovarillas (nanorods en inglés) catiónicas orgánicas a partir de una molécula bolaanfífila. Éstas se desintegran debido a una reacción química de reducción. Lo notable es que esta desintegración va acompañada de la aparición de una actividad catalítica, algo que recuerda a procesos complejos que ocurren en sistemas biológicos. Para llevar a cabo este proceso, utilizan un derivado de la cisteína que tiene grupos de imidazol en su estructura. Esta molécula tiene la capacidad de unirse a sí misma y formar nanovarillas con carga positiva (catiónicas). Sin embargo, este proceso de autoensamblaje requiere la presencia de surfactantes catiónicos, como el cloruro de cetilpiridinio (CPC) o el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

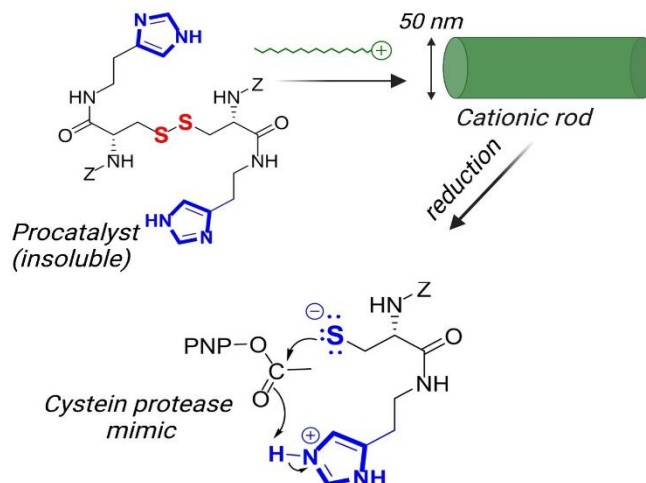


Figura 8 Reducción de la unidad de disulfuro provocando el desmontaje de la varilla y la generación de una cisteína proteasa imitadora⁷

Lo más interesante ocurre cuando se realiza una reacción de reducción en los enlaces de disulfuro presentes en estas nanovarillas catiónicas. Esto desencadena su desmontaje o desintegración y, como resultado, se genera un compuesto que imita la función de una cisteína proteasa, una enzima que normalmente se encuentra en organismos vivos y que se encarga de descomponer proteínas. Lo que hace que este imitador sea aún más intrigante es que muestra una mejora drástica en su eficiencia catalítica, especialmente en la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (PNPA). En resumen, este estudio ofrece una visión fascinante de cómo las nanovarillas catiónicas pueden desmontarse y dar lugar a una actividad catalítica mejorada, lo que tiene implicaciones significativas en términos de aplicaciones bioquímicas y catalíticas.

*Glutathione-responsive molecular nanoparticles from a dianionic bolaamphiphile and their use as carriers for targeted delivery*⁸

Este trabajo se centra en la formación de nanopartículas moleculares en medios acuosos a partir de una molécula de tipo bolaanfílico que contiene un grupo disulfuro. Estas nanopartículas tienen la capacidad de cargar eficientemente una sustancia lipofílica utilizada como marcador mitocondrial llamado DiOC6(3). La carga de esta sustancia en las nanopartículas reduce su fluorescencia, pero esta fluorescencia se puede recuperar mediante un proceso de desmontaje de las partículas que se activa mediante una reacción reductora.

Luego, el estudio demuestra que estas nanopartículas cargadas con DiOC6(3) pueden ser transportadas hacia el interior de células de adenocarcinoma colorrectal humano (HT-29) utilizando técnicas como la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia de barrido confocal. Lo interesante es que se observa un aumento significativo en la fluorescencia intracelular cuando las células son estimuladas para producir glutatión (GSH), una molécula que tiene un papel importante en la protección celular contra el estrés oxidativo y otras funciones.

En resumen, estas nuevas nanopartículas moleculares se presentan como una herramienta terapéutica. Esto significa que tienen la capacidad de realizar tanto la entrega dirigida de sustancias lipofílicas como la señalización de niveles elevados de GSH en las células. Esta combinación de funciones podría ser valiosa en aplicaciones médicas y de diagnóstico, permitiendo el seguimiento de la entrega de sustancias y la detección de respuestas celulares específicas en tiempo real.

Que simultáneamente logra la entrega dirigida de sustancias lipofílicas y señala altos niveles de GSH.⁶

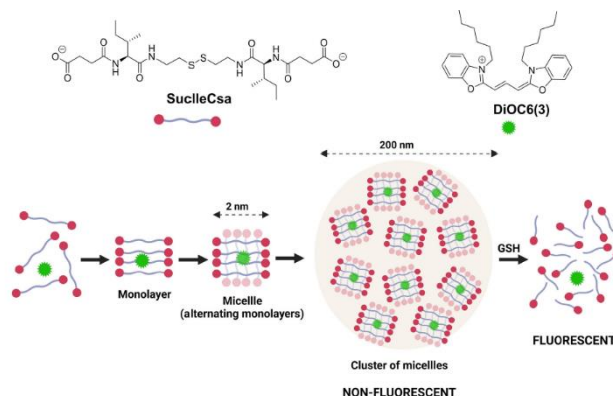


Figura 9 Estructura de la bolaanfífila SucilleCsa en su forma dianiónica y colorante lipofílico DiOC6(3). Representación pictórica de la formación de nanopartículas y promovida por GSH liberación del tinte.⁸

*Non-Polymeric Nanogels as Versatile Nanocarriers: Intracellular Transport of the Photosensitizers Rose Bengal and Hypericin for Photodynamic Therapy*⁹

Este artículo de investigación aborda el uso de nanotransportadores para llevar sustancias activas al interior de las células, lo cual es un área central en la nanomedicina. La novedad principal de este estudio radica en el empleo de nanogeles formados por un gelador de bajo peso molecular.

En este trabajo, se han utilizado nanogeles moleculares no poliméricos con éxito para el transporte intracelular de dos agentes de terapia fotodinámica (PDT), Rose Bengal (RB) e hypericin (HYP). Estos dos fotosensibilizadores (PSs) presentan diferentes limitaciones para su uso en aplicaciones clínicas. HYP tiene una baja solubilidad en agua, mientras que la absorción celular de RB se ve dificultada debido a su carácter dianiónico a valores de pH fisiológicos. Además, ambos PSs tienden a formar agregados que dificultan una PDT efectiva.

A pesar de las diferencias en la naturaleza de estos PSs, los nanogeles formados por el gelador permiten un transporte intracelular eficiente en ambos casos, en células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29), y mejoran notablemente la eficiencia de la PDT, como se ha evaluado mediante microscopía confocal de barrido láser y citometría de flujo. Además, no se observa una toxicidad significativa de los nanogeles en ausencia de luz, lo que respalda la biocompatibilidad del sistema de entrega.

Estos nanogeles desarrollados son altamente reproducibles debido a su naturaleza no polimérica, y su síntesis se puede realizar a gran escala. En resumen, los resultados presentados en este estudio confirman el potencial de los nanogeles moleculares como valiosos nanotransportadores capaces de atrapar sustancias activas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, para la PDT en el tratamiento del cáncer.

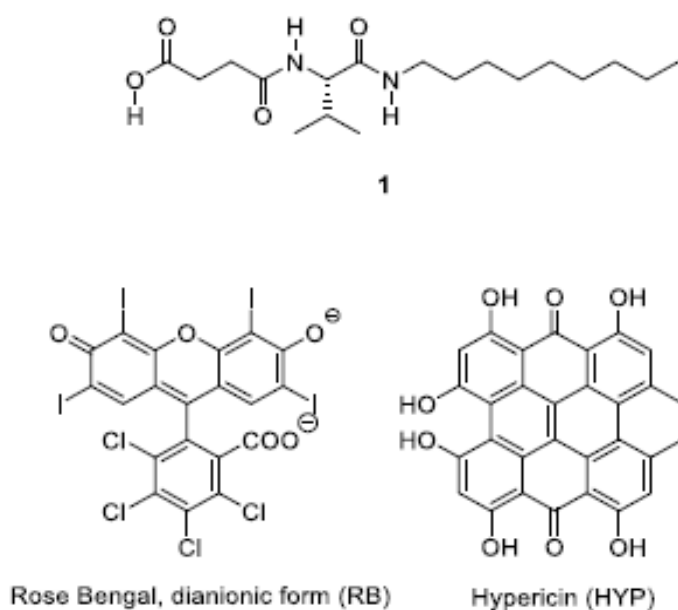


Figura 10 Estructura química del hidrogelificador 1, RB y HYP⁹

A Dual Stimuli Responsive Supramolecular Gel Provides Insulin Hydrolysis Protection and Redox-Controlled Release of Actives¹⁰

Este artículo de investigación que estudia dos hidrogelificantes supramoleculares. Estos gelificantes tienen una característica importante: contienen una unidad central de disulfuro y grupos carboxílicos terminales.

Por un lado, estos hidrogeles son sensibles a un entorno reductor, lo que significa que cuando se encuentran en un ambiente con propiedades reductoras, la unidad de disulfuro se transforma en tiol correspondiente. Por otro lado, también muestran una respuesta al pH debido a la presencia de los grupos carboxílicos. Los geles se forman a un pH inferior a aproximadamente 4, pero a valores de pH más altos, la ionización de los gelificantes provoca la descomposición del gel.

Las propiedades de estos geles se utilizan como prueba de concepto para liberar Bromofenol Blue en presencia de una especie reductora llamada tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Además, se carga insulina en los hidrogeles y se protege de la hidrólisis utilizando un fluido gástrico simulado que contiene pepsina. Se observa una liberación cuantitativa de insulina sin alteraciones, lo que se comprueba con un ensayo colorimétrico de inmunoabsorción ligado a enzimas, al tratar los geles con un tampón a pH 7.4.

Este comportamiento sugiere la posibilidad de utilizar estos nuevos hidrogeles para la entrega oral de insulina, ya que pueden protegerla en el ambiente gástrico y liberarla eficazmente en un entorno más neutro en el intestino.

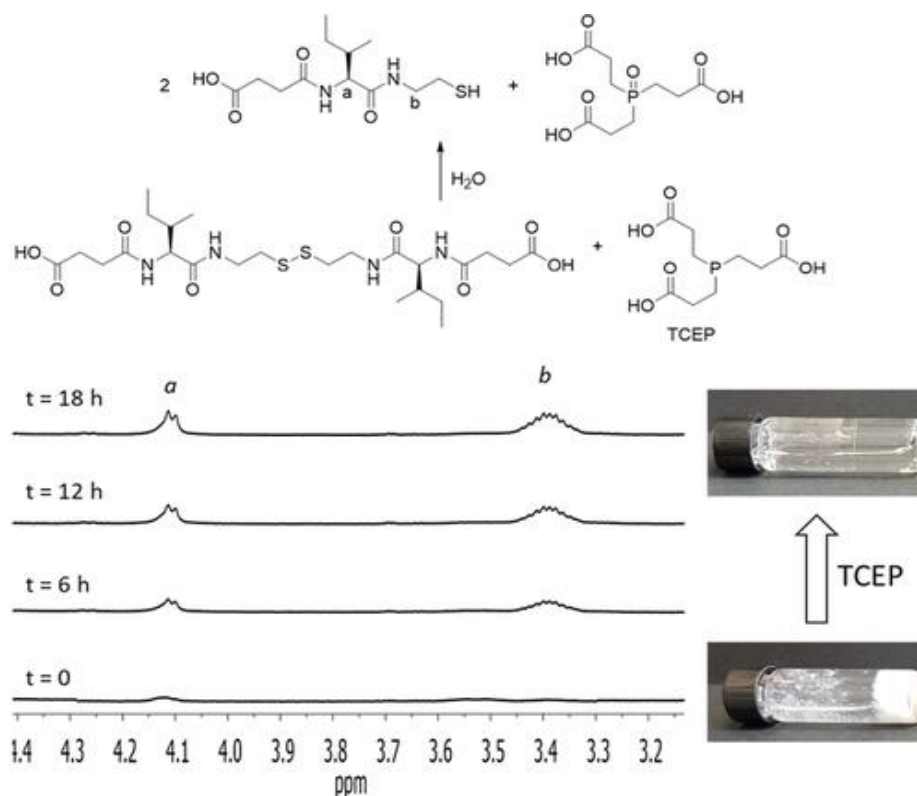


Figura 11 Espectros de RMN 1H seleccionados del estudio cinético del desmontaje del gel SucleCsa en presencia de TCEP ¹⁰

2 OBJETIVOS

- Preparar las moléculas denominadas MePVal12 y MePVal3 que se muestran a continuación. Son moléculas constituidas con unidades terminales catiónicas de metilpiridinio y derivadas del aminoácido L-valina. Su estructura es bolaanfífila, con el objetivo de formar vesículas catiónicas.

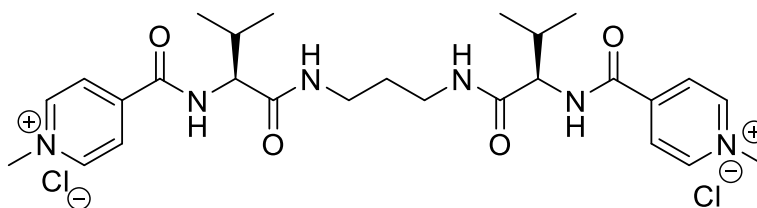


Figura 12 Estructura Molecular MePVal3

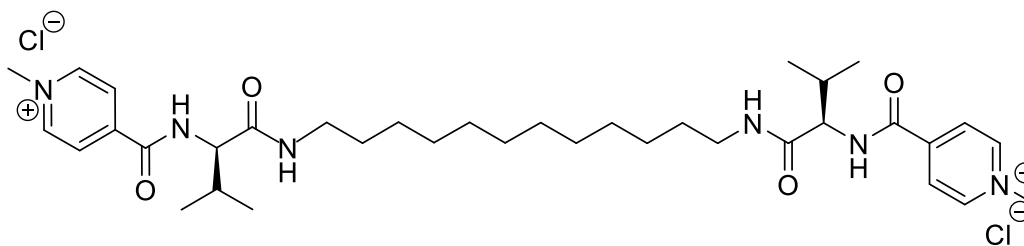


Figura 13 Estructura Molecular MePVal12

- Evaluar la agregación de las moléculas sintetizadas mediante técnicas de espectroscopia UV-Vis, fluorescencia y DLS (*dynamic light scattering*).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de MePVal12 y MePVal3

Se realizó la síntesis de los compuestos MePVal12 y MePVal3 tal y como se muestra en la Figura 14. La preparación de los compuestos PVal3 y PVal12 había sido descrita ya previamente.

En primer lugar, se realizó el acoplamiento entre la diamina correspondiente y la L-Valina N-protegida con el grupo Z. Se utilizó como agente de acoplamiento TBTU. A continuación, se eliminó el grupo protector Z mediante el uso de bromuro de hidrógeno. La diamina obtenida (HVal3 o HVal12) se hizo reaccionar con ácido isonicotínico para obtener la correspondiente diamida, usando de nuevo TBTU como agente de acoplamiento. La metilación del nitrógeno del anillo de piridina se pudo realizar empleando yoduro de metilo. De esta manera se obtuvieron los compuestos MePVal3 y MePVal12 como yoduros de piridinio. Dada la relativa inestabilidad de los yoduros por su fácil oxidación, se intercambió este anión por cloruro empleando una resina de intercambio aniónico.

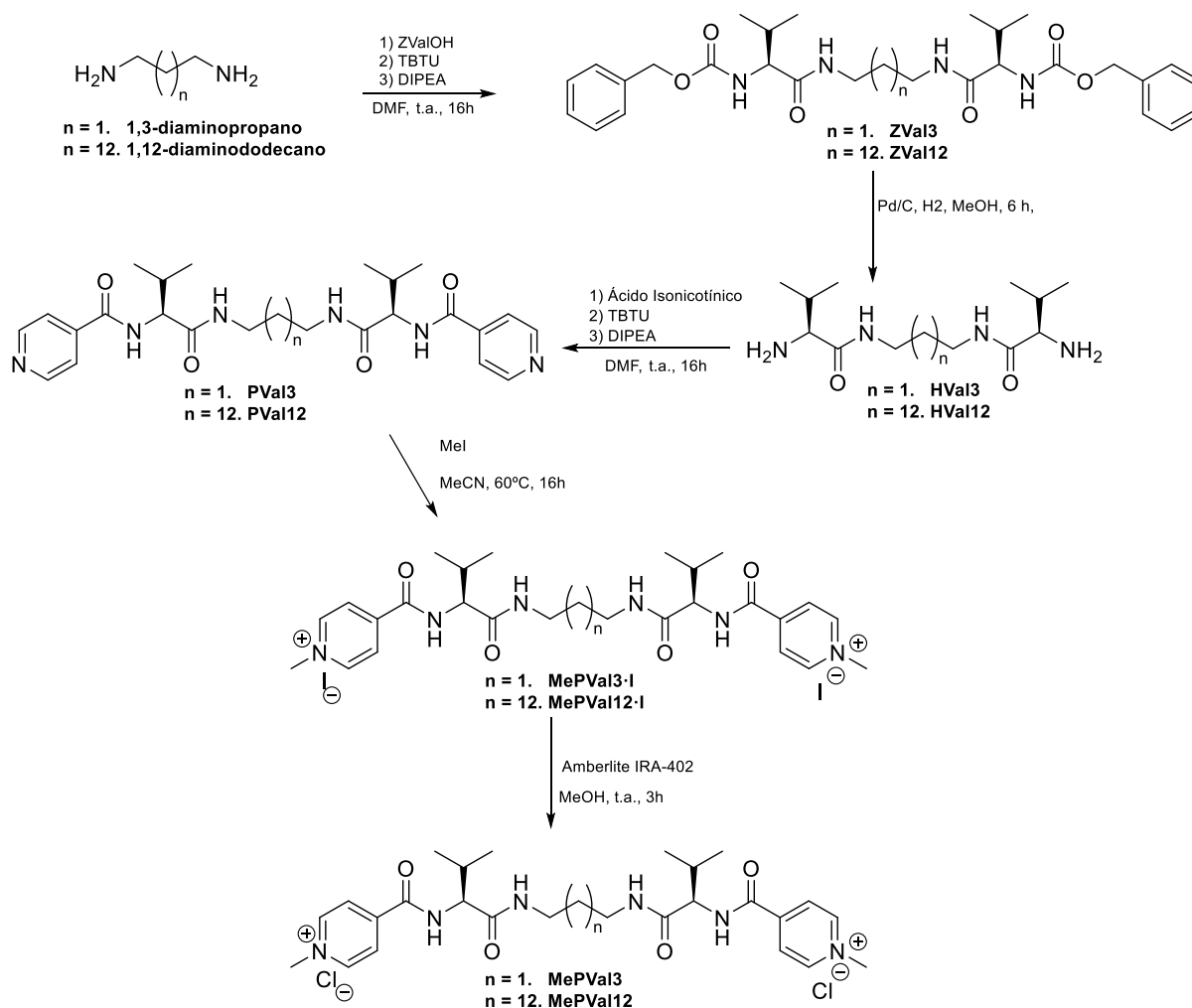


Figura 14 Síntesis de MePVal12 y MePVal3 condiciones y reactivos.

3.2 Estudio de la agregación de MePVal12

La posible formación de agregados por estas moléculas se examinó en primer lugar mediante medidas de dispersión luz a 700 nm, utilizando un espectrómetro UV-Vis. La formación de agregados de tamaño suficiente conlleva una dispersión de luz que resulta en un aumento de la línea base del espectro. En la figura 15 se muestran los espectros obtenidos para muestras con un rango de concentraciones 1-10 mM, correspondiendo las de línea base más alta a las más concentradas.

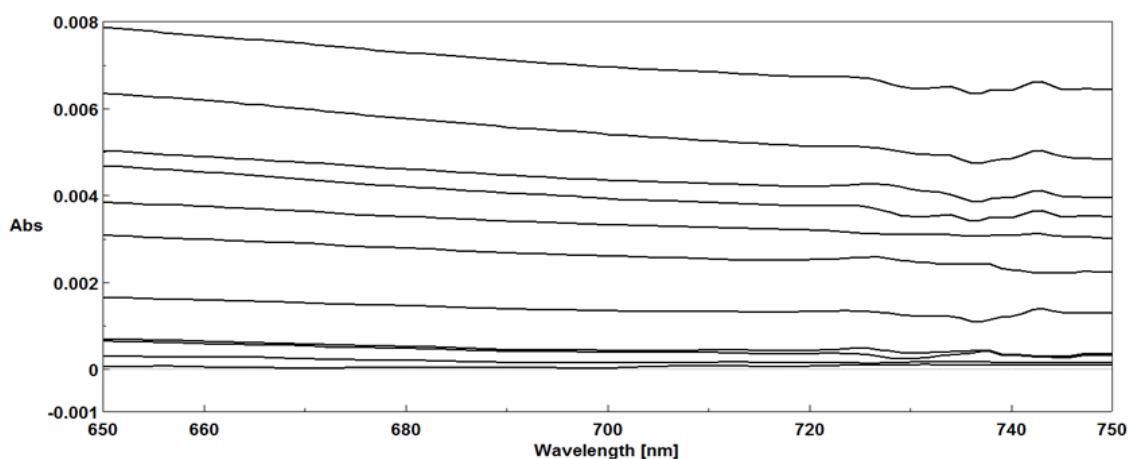


Figura 15 Espectros de absorción MePVal12 en rango de concentraciones 1-10 mM

La representación de los valores de absorción a 700 nm de la figura anterior permite calcular de modo aproximado un valor de concentración crítica de agregación. Puede observarse un punto de cambio de tendencia crítico a una concentración de MePVal12 de 3 mM, que correspondería a la formación de vesículas catiónicas.

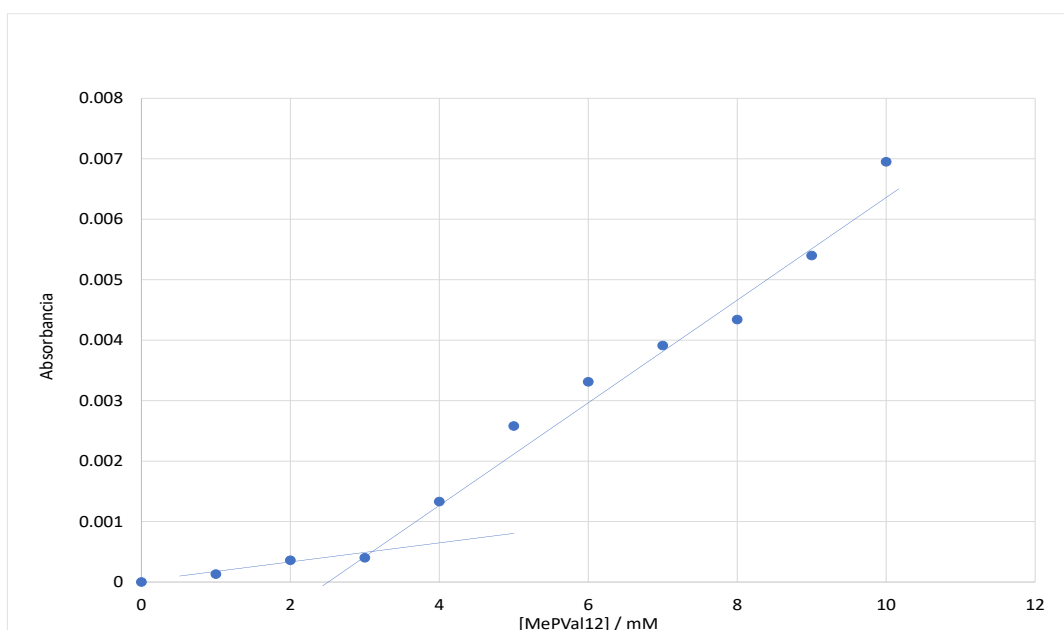


Figura 16 Absorbancia de MePVal12 en agua a 700 nm en función de la concentración.

La formación de vesículas se comprobó también ensayando la solubilización del colorante Nile Red en agua. Este compuesto es muy poco soluble en medios acuosos y no presenta fluorescencia. La presencia de micelas o vesículas permite su solubilización en las regiones apolares, provocando que muestre una fluorescencia intensa. En las figuras 17 y 18 se muestran fotografías que comparan el aspecto de muestras en agua que contienen, respectivamente, solamente Nile Red (10 mM) y Nile Red en presencia de MePVal12. Se puede observar que la presencia de las vesículas da lugar a una coloración intensa como resultado de la solubilización del colorante.

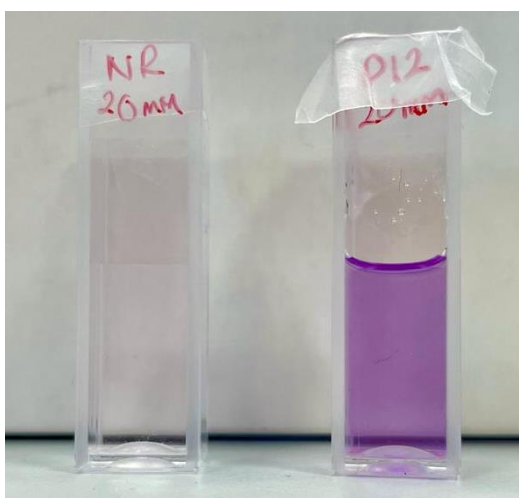


Figura 18 Nile Red disuelto en agua (NR) y Nile Red con MePVal12, concentración de 20mM (NR)

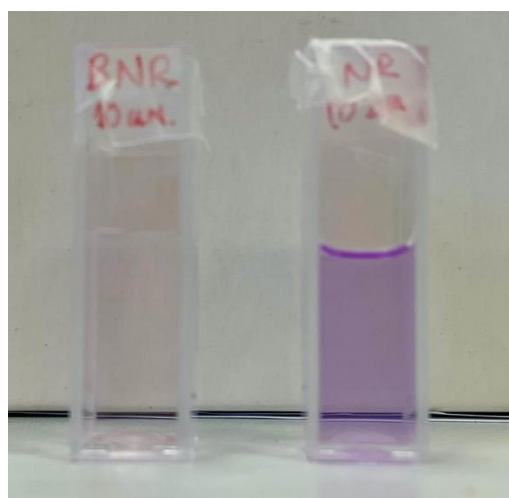


Figura 17 Nile Red disuelto en agua (BNR) y Nile Red con MePVal12, concentración de 10mM (NR)

Este efecto de solubilización se estudió mediante espectroscopia de UV-Vis y medidas de fluorescencia.

En primer lugar, los espectros de UV-Vis (Figura 19) muestran un gran aumento de la absorbancia del Nile Red en presencia de MePVal12, observándose una banda ancha con máximo en 580 nm.

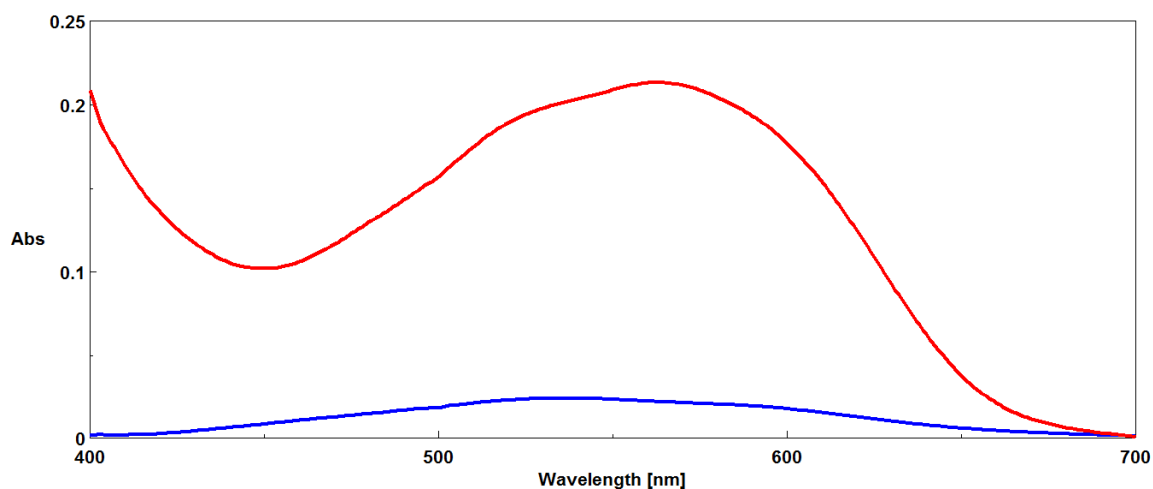


Figura 19 Estudio UV-Vis MePVal12 + Nile Red. La línea roja representa Nile Red con MePVal12 en agua. La línea azul representa Nile Red en agua.

Por lo que hace referencia al estudio de la fluorescencia, se irradiaron las muestras a 565 nm y se obtuvieron los espectros de emisión que se muestran en la figura 20. En ausencia de vesículas no se observa fluorescencia, mientras en presencia de MePVal12 se puede observar que se activa la fluorescencia del Nile Red, generando un espectro de emisión con máximo a 630 nm. Este comportamiento indica que este colorante se ha incorporado en las zonas lipofílicas de la vesícula.

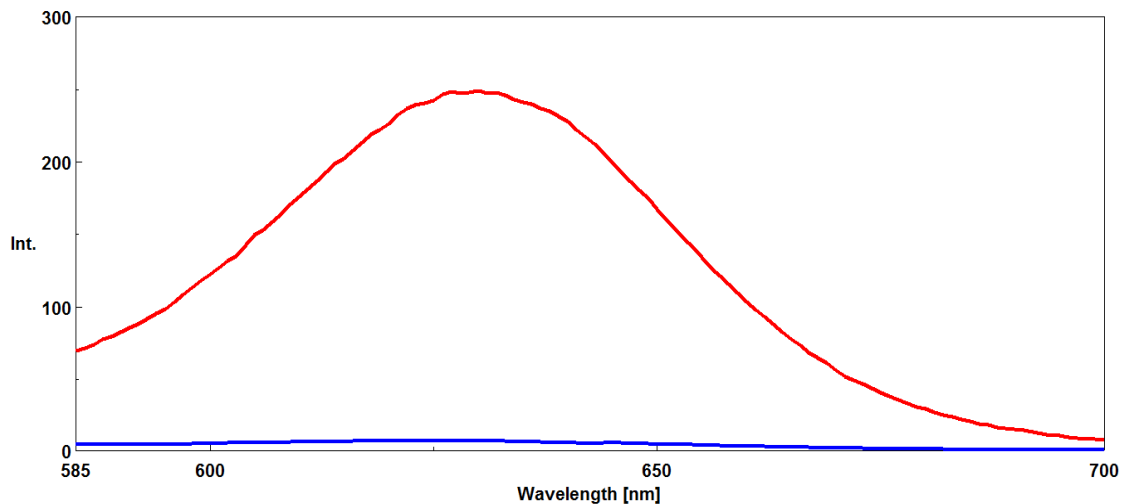


Figura 20 Estudio de fluorescencia de MePVal12 + Nile Red. La línea roja representa Nile Red con MePVal12 en agua. La línea azul representa Nile Red en agua. Excitación a 630 nm.

Finalmente, se evaluó el tamaño de las vesículas mediante medidas de DLS (*Dynamic Light Scattering*). Como se puede observar en la figura 21, se detectaron partículas con una distribución de tamaños monomodal, con un diámetro promedio de 184 nm y una desviación estándar de 76 nm. Estos datos están de acuerdo con la formación de vesículas con una polidispersión de tamaños bastante pequeña (índice de polidispersidad, Pdl, = 0.28; este valor varía entre 0 para muestras monodispersas a 1 para polidispersión extrema).

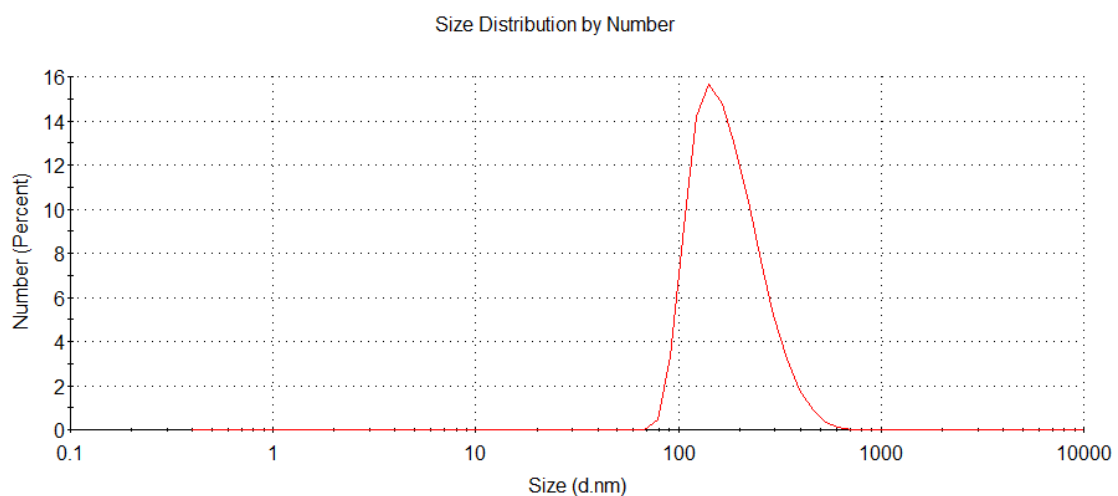


Figura 21 Análisis del tamaño de las vesículas formadas en MePVal12 por medio de DLS (*Dynamic Light Scattering*).

3.3 Estudios pendientes

Por limitaciones de tiempo, quedan pendientes algunos estudios que completarían los descritos anteriormente.

- a)** Estudio de la agregación de MePVal3. El compuesto final obtenido tenía un color marrón oscuro que indicaba la posible presencia de yodo residual. Se decidió que era necesario purificarlo antes de realizar las medidas ópticas y de DLS.
- b)** Determinación de la carga superficial de las vesículas. Estos estudios se deben realizar con el equipo de DLS, midiendo la movilidad electroforética.
- c)** Estudio mediante microscopía electrónica (TEM) de las vesículas formadas. Aunque todos los datos apuntan a la formación de vesículas, la visualización de las mismas por TEM se considera la prueba definitiva.

4 CONCLUSIONES

- La preparación de las moléculas dicatiónicas MePVal12 y MePVal3 es posible utilizando la metodología habitual de acoplamiento peptídico, obteniéndose en cantidades aproximadamente de gramos sin necesidad de purificación cromatográfica.
- Se puede deducir que la molécula PVal12 forma agregados, probablemente vesículas catiónicas al considerar las siguientes evidencias obtenidas:
 - a) Se observa una concentración crítica de agregación al examinar la turbidez de la muestra por espectroscopia UV-Vis.
 - b) Hay agregados capaces de solubilizar el colorante hidrofóbico Nile Red, tal y como demuestra los espectros de UV-Vis.
 - c) La intensidad de la fluorescencia de Nile Red aumenta notablemente en presencia de los agregados catiónicos, indicando su incorporación en las zonas hidrófobas de los mismos.
 - d) Se observan partículas monodispersas de diámetro aparente de aproximadamente unos 200 nm mediante DLS, en concordancia con la existencia de vesículas.
- Para completar el estudio, sería muy conveniente confirmar la presencia de vesículas mediante estudios de microscopía electrónica.
- Adicionalmente, queda por estudiar la agregación de MePVal3 para determinar la influencia de la longitud del separador alifático en la agregación.

5 SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1 Métodos Generales

Para la realización de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se hizo uso de un espectrómetro Bruker Avance III HD 400 MHz y un espectrómetro Agilent INOVA System 500 MHz, usando como disolvente dimetilsulfóxido a temperatura de 30°C .

El disolvente deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) presentan dos señales que sirven como referencia, las cuales son un singulete de 2.50 ppm y el cuadruplete que aparece a 39.52 ppm, de los espectros de ^1H y ^{13}C , respectivamente. Las señales fueron asignadas con la ayuda de métodos 2D (COSY y HSQC).

Para la obtención de los espectros de masas se utilizó el equipo *Mass Spectrometry triple Quadrupole Q-TOF Premier* con Electrospray y APCI acoplados (ESMS).

Los reactivos requeridos fueron los que se encuentran comercialmente, adicionalmente las reacciones que necesitaban atmósfera inerte fueron llevadas a cabo bajo una atmósfera de N_2 .

5.2 Procedimientos sintéticos

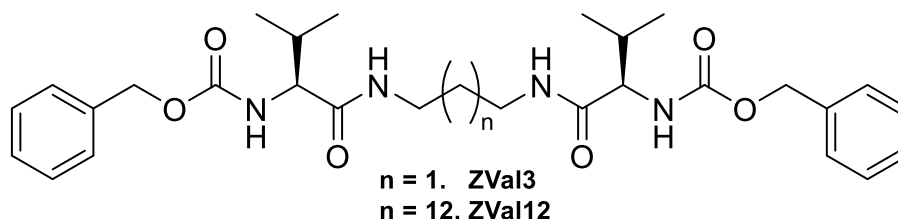


Figura 22 Estructura molecular ZVal3 y ZVal12

((Benciloxi)carbonil)-L-valinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (ZValOSu): Una solución de ácido carbobenciloxi-L-valina comercialmente disponible (ZValOH) (20 mmol) y N-hidroxisuccinimida (20 mmol, 1,0 eq.) en THF (90 ml) se añadió gota a gota bajo atmósfera de N_2 a 0°C con un embudo de goteo a una solución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (20,2 mmol, 1,01 eq.) en THF (50 ml). La mezcla se agitó adicionalmente durante 2 h a 0°C . A continuación, la solución se dejó reposar en el frigorífico durante 2 h, lo que provocó la precipitación de N,N'-diciclohexilurea. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró al vacío, y el filtrado se eliminó a presión reducida y el residuo crudo se purificó por cristalización en isopropanol para dar el respectivo éster activado. Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 98%).

benzyl ((5R,22S)-5-isopropyl-23-methyl-3,6,21-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4,7,20-triazatetracosan-22-yl)carbamate (ZVal12):

A una disolución de ZValOSu (3 g, 8,61 milimoles) en THF (60 ml) se le añadió gota a gota con agitación vigorosa 1,12-dodecanediamine (4,3 milimoles) en THF (10 ml). Luego, la mezcla de reacción pastosa se calentó a 50°C y se agitó a esta temperatura durante 16 horas. El sólido blanco resultante se filtró y se lavó secuencialmente con una disolución acuosa de HCl 0,01 M, una solución fría de KOH 0,1 M, agua y éter frío. Finalmente, el sólido se secó en estufa de vacío.

a 60 °C por 24 horas para obtener el producto ZVal12 como un sólido blanco (rendimiento 90%). El espectro de RMN coincide con el descrito en la literatura.¹²

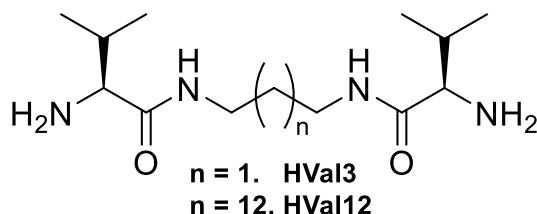


Figura 23 Estructura molecular HVal3 y HVal12

(S)-2-amino-N-(12-((R)-2-amino-3-methylbutanamido)dodecyl)-3-methylbutanamide

(HVal12) : Se colocó una solución de ZVal12 (3 g, 8,61 mmol) y una cantidad catalítica de Pd sobre carbón activado (10 % p/p) en un matraz de fondo redondo de dos bocas y se suspendió en MeOH (120 ml). El sistema se purgó dos veces y se conectó a una atmósfera de H₂. La suspensión gris pastosa se agitó durante seis horas hasta completar la reacción según TLC (MeOH:CH₂Cl₂ 1:1; ninhidrina). La suspensión negra se filtró sobre Celite®, el solvente se evaporó a presión reducida y se secó más en una bomba de vacío durante 24 h. Se obtuvo como aceite translúcido (rendimiento 98%).

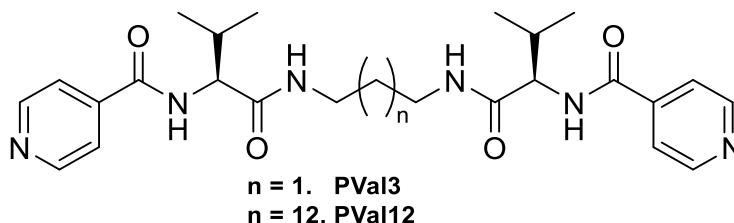


Figura 24 Estructura molecular PVal3 y PVal12

N-((S)-1-(12-((S)-2-(isonicotinamido)-3-methylbutanamido)dodecyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)nicotinamide (PVal12):

Se añadieron secuencialmente TBTU (11,19 mmol, 2,1 eq.), 4-aminometilpiridina (10,74 mmol, 2 eq.) y DIPEA (11,25 mmol, 2,1 eq.) a el sólido blanco obtenido anteriormente (5,36 mmol) en DMF (25 ml), bajo H₂ a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 24 horas. Pasado este tiempo, se añadió agua a la solución hasta la aparición de un precipitado, luego se filtró al vacío. El precipitado se lavó 3 veces más con agua destilada y unas gotas de NaOH 1M para eliminar los reactivos restantes. El precipitado se secó en estufa a 54°C.

Se obtuvo como un sólido blanco (90% de rendimiento), el espectro de protón de resonancia magnética nuclear fue consistente con el descritos en la literatura.¹³

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.70 (dd, $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H), 8.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.12 – 7.94 (m, 1H), 7.79 (dd, $J = 4.4, 1.6$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.22 – 2.91 (m, 2H), 2.21 – 2.02 (m, 1H), 1.52 – 1.33 (m, 2H), 1.29 – 1.13 (m, 8H), 0.91 (dd, $J = 6.7, 4.0$ Hz, 6H).

Para el desarrollo de MePVal3 se hizo mediante una metodología similar a la de MePVal12 descrita anteriormente, utilizando 1,3-propanodiamina en lugar de 1,12-dodecanediamine ¹¹

((2S,2'S)-(propano-1,3-diilbis(azanodiil))bis(3-metil-1-oxobutano-1,2-diil))dicarbamato de dibencilo (ZVal3): se obtuvo un sólido blanco de rendimiento del 90%.

(2S,2'S)-N,N'-(propano-1,3-diil)bis(2-amino-3-metilbutanamida) (HVal3): Se obtuvo un aceite translúcido de rendimiento del 98%.

N-((S)-1-((3-((S)-2-(isonicotinamido)-3-methylbutanamido)propyl)amino)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)nicotinamide (PVal3) : Se obtuvo un sólido blanco del 87% de rendimiento, el espectro de protón de resonancia magnética nuclear fue consistente con el descritos en la literatura.¹³

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.71 (dd, $J = 4.5, 1.5$ Hz, 2H), 8.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.08 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J = 4.5, 1.5$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.25 – 2.96 (m, 2H), 2.11 (dq, $J = 13.6, 6.7$ Hz, 1H), 1.57 (p, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.02 – 0.86 (m, 6H).

5.3 Obtención de MePVal3·I y MePVal12·I

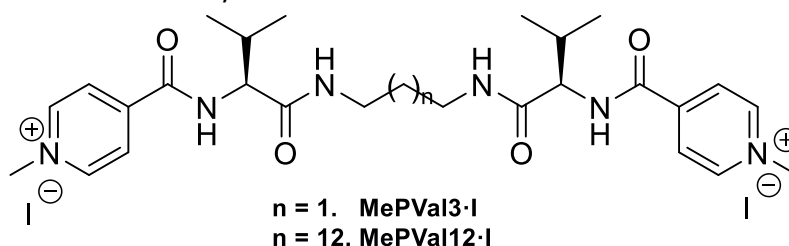


Figura 25 Estructura molecular MePVal3·I y MePVal12·I

4,4'-((3R,11S)-3,11-diisopropyl-4,10-dioxo-2,5,9,12-tetraazatridecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium) (MePVal3-I) : En un Balón de volumen de 250 mL se agrega Pval3 (1g) junto con 60mL de acetonitrilo, con ayuda de un agitador magnético disolver completamente, se adicionan 4,8 mL de Yodo metano (MeI), dejar la reacción a temperatura de 60 °C y atmosfera de N₂ por 24 horas, pasado este tiempo se concentra en el rotavapor para dejar secar a vacío por 24 horas.

Obteniéndose la sal yodada I·MePVal3, la cual fue secada y utilizada directamente en el siguiente paso. Se obtiene en forma de sólido amarillo claro (rendimiento 100%) .

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.09 (dd, J = 22.8, 7.6 Hz, 12H), 8.37 (d, J = 6.8 Hz, 8H), 8.15 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 4.41 – 4.09 (m, 17H), 3.20 – 2.85 (m, 10H), 1.62 – 1.37 (m, 5H), 0.85 (dt, J = 21.7, 10.8 Hz, 24H).

4,4'-((3R,20R)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium) (MePVal12-I) : En un Balón de volumen de 250 mL se agrega Pval12 (1g) junto con 60mL de acetonitrilo, con ayuda de un agitador magnético disolver completamente, se adicionan 2,4 mL de Yodo metano (MeI), dejar la reacción a temperatura de 60 °C y atmosfera de N₂ por 24 horas, pasado este tiempo se concentra en el rotavapor para dejar secar a vacío por 24 horas.

Obteniéndose la sal yodada I·MePVal12, la cual fue secada y utilizada directamente en el siguiente paso. Se obtiene en forma de sólido amarillo claro (rendimiento 79%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.14 (dd, J = 9.8, 7.8 Hz, 9H), 8.43 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 8.16 (t, J = 5.5 Hz, 3H), 4.47 – 4.20 (m, 12H), 3.24 – 2.88 (m, 6H), 2.18 – 2.02 (m, 5H), 1.52 – 1.15 (m, 31H), 0.92 (dd, J = 6.7, 2.7 Hz, 18H).

5.4 Obtención del producto final, MePVal3 y MePVal12

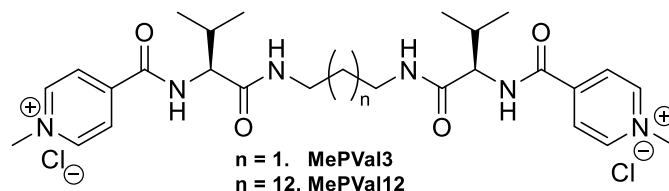


Figura 26 Estructura molecular MePVal3 y MePVal12

4,4'-((3R,11S)-3,11-diisopropyl-4,10-dioxo-2,5,9,12-tetraazatridecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium) (MePVal3): En un balón de 250mL se adiciona MePval3-I (1,7g eq. 2,2245mmoles) y 40mL de metanol en agitación hasta obtener una solución homogénea, se adiciona amberlite IRA-402 Cl-from 633 mg/mL 1.46 eq/L 52.1%Cl (1818,9 mg), se deja en agitación por 3 horas, transcurrido este tiempo se filtra y se concentra en el rotavapor , para dejar secar a vacío por 24 horas.

Se obtiene un sólido amarillo (rendimiento 91%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.14 (dd, $J = 18.2, 7.3$ Hz, 70H), 8.43 (d, $J = 6.3$ Hz, 46H), 8.19 (t, $J = 5.3$ Hz, 24H), 4.58 (s, 5H), 4.40 (s, 69H), 4.34 – 4.01 (m, 28H), 4.01 – 3.71 (m, 6H), 3.34 (s, 348H), 3.13 (tdd, $J = 17.8, 12.2, 5.9$ Hz, 47H), 2.98 (dd, $J = 30.0, 23.6$ Hz, 12H), 2.67 (s, 5H), 2.50 (s, 378H), 2.33 (s, 4H), 2.10 (ddd, $J = 80.7, 44.3, 37.5$ Hz, 32H), 1.78 – 1.25 (m, 39H), 1.25 – 1.11 (m, 12H), 1.11 – 0.71 (m, 159H), 0.83 (d, $J = 6.0$ Hz, 13H), 0.83 (d, $J = 6.0$ Hz, 17H).

4,4'-((3R,20R)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium) (MePVal12): En un balón de 250mL se adiciona MePval12-I (1,2g eq. 1,3mmoles) y 40mL de metanol en agitación hasta obtener una solución homogénea, se adiciona amberlite IRA-402 Cl-from 633 mg/mL 1.46 eq/L 52.1%Cl (1063,4 mg), se deja en agitación por 3 horas, transcurrido este tiempo se filtra y se concentra en el rotavapor , para dejar secar a vacío por 24 horas.

Se obtiene un sólido amarillo (rendimiento 96%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.35 (d, $J = 8.6$ Hz, 7H), 9.16 (d, $J = 6.3$ Hz, 14H), 8.49 (d, $J = 6.1$ Hz, 14H), 8.28 (t, $J = 5.3$ Hz, 7H), 4.41 (s, 21H), 4.34 – 4.20 (m, 7H), 3.31 (s, 71H), 3.28 – 3.01 (m, 12H), 2.95 (dd, $J = 24.4, 18.1$ Hz, 4H), 2.50 (s, 82H), 2.14 (ddd, $J = 23.5, 15.2, 8.3$ Hz, 8H), 1.40 (d, $J = 6.2$ Hz, 15H), 1.22 (s, 58H), 0.92 (dd, $J = 6.5, 3.1$ Hz, 42H).

6 ANEXOS

6.1 Espectros RMN

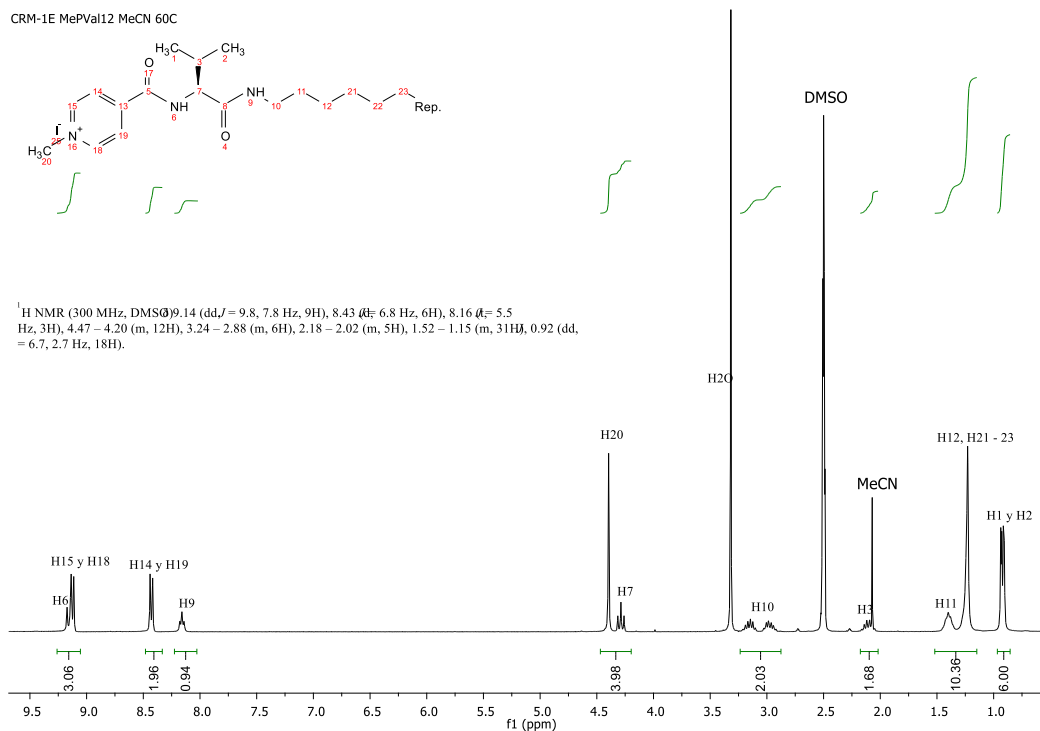


Figura 27 Espectro RMN de la molécula MePVal12-I

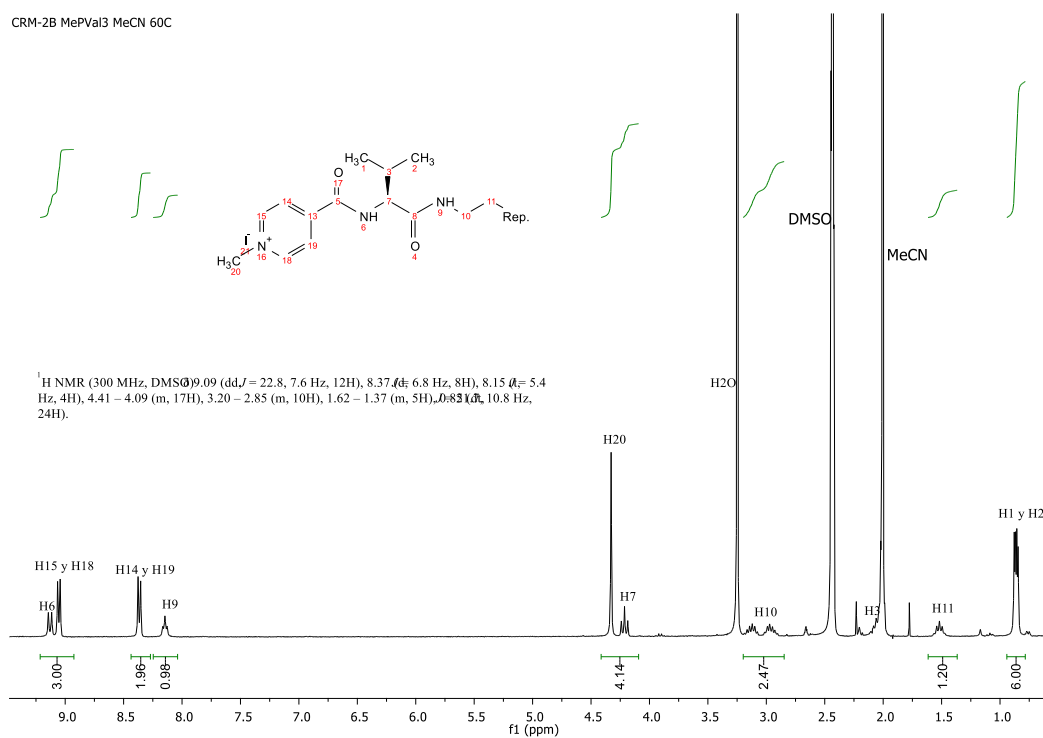


Figura 28 Espectro RMN de la molécula MePVal3-I

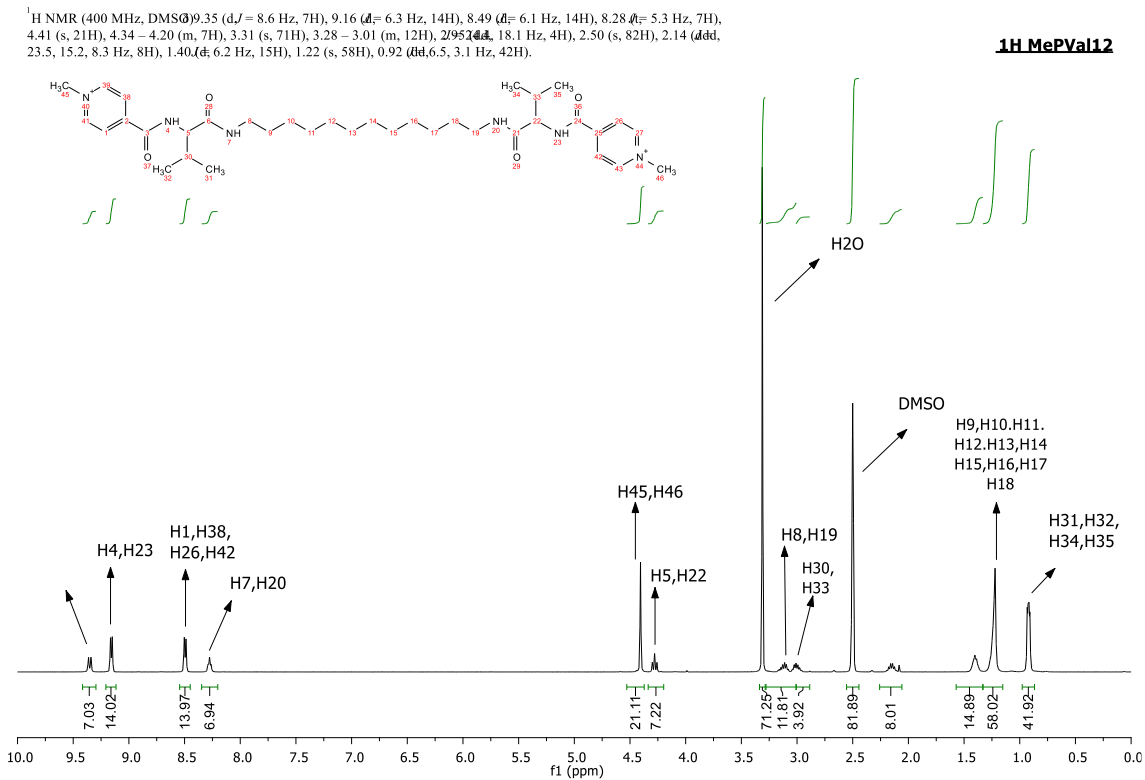


Figura 29 Espectro RMN de la molécula MePVal12

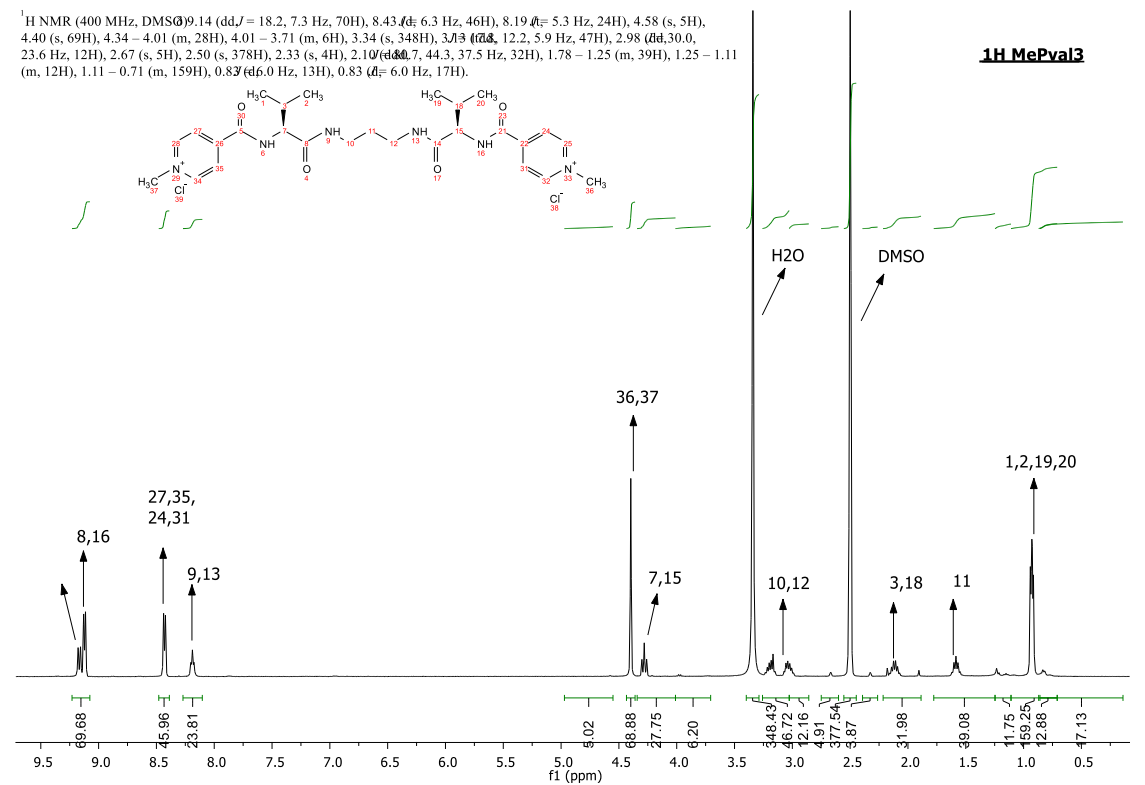


Figura 30 Espectro RMN de la molécula MePVal3

6.2 Espectro de masas

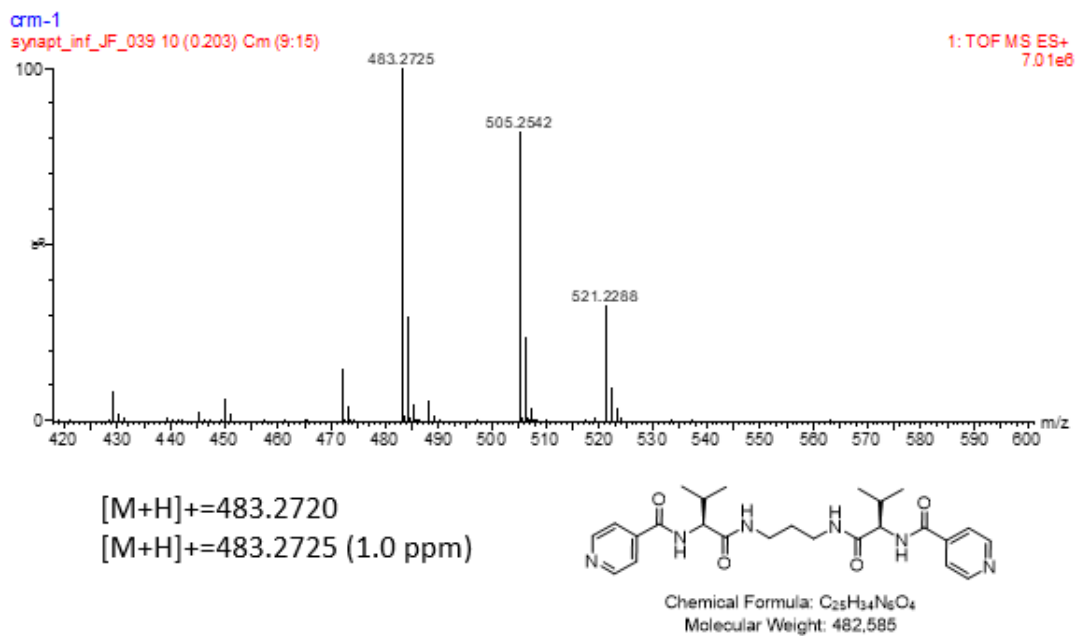


Figura 31 Espectro Masas de la molécula PVal3

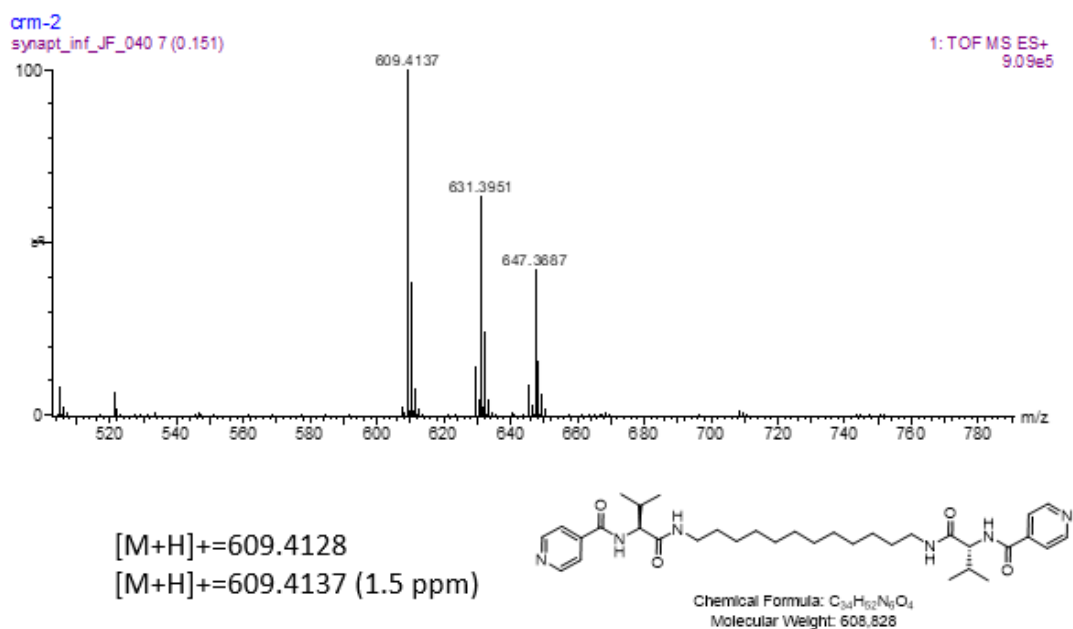


Figura 32 Espectro Masas de la molécula PVal12

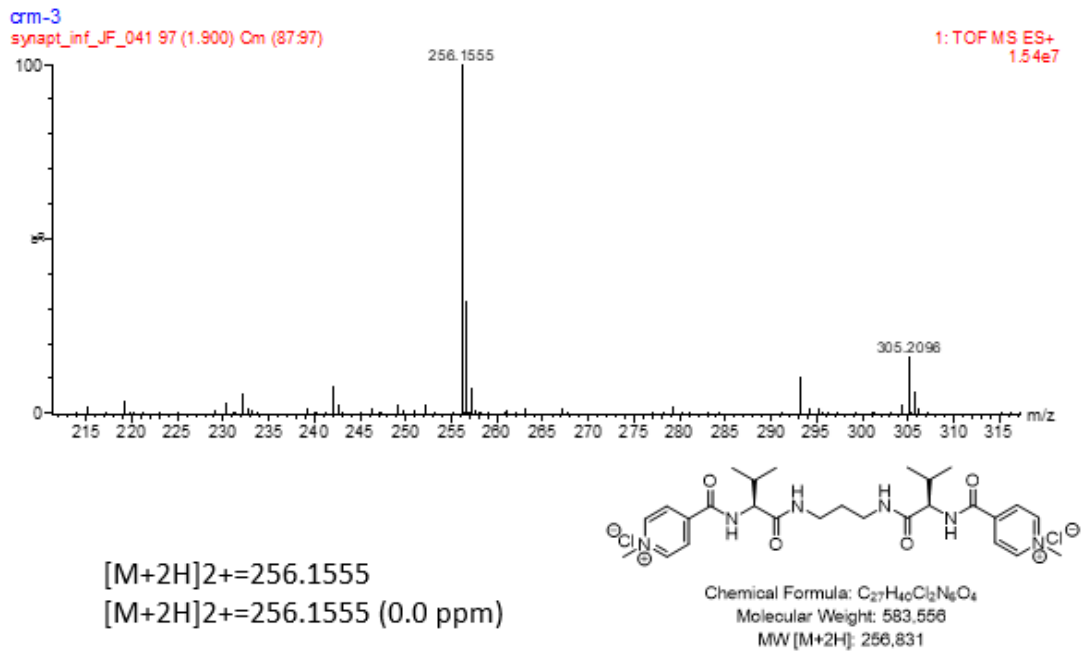


Figura 33 Espectro Masas de la molécula MePVal3

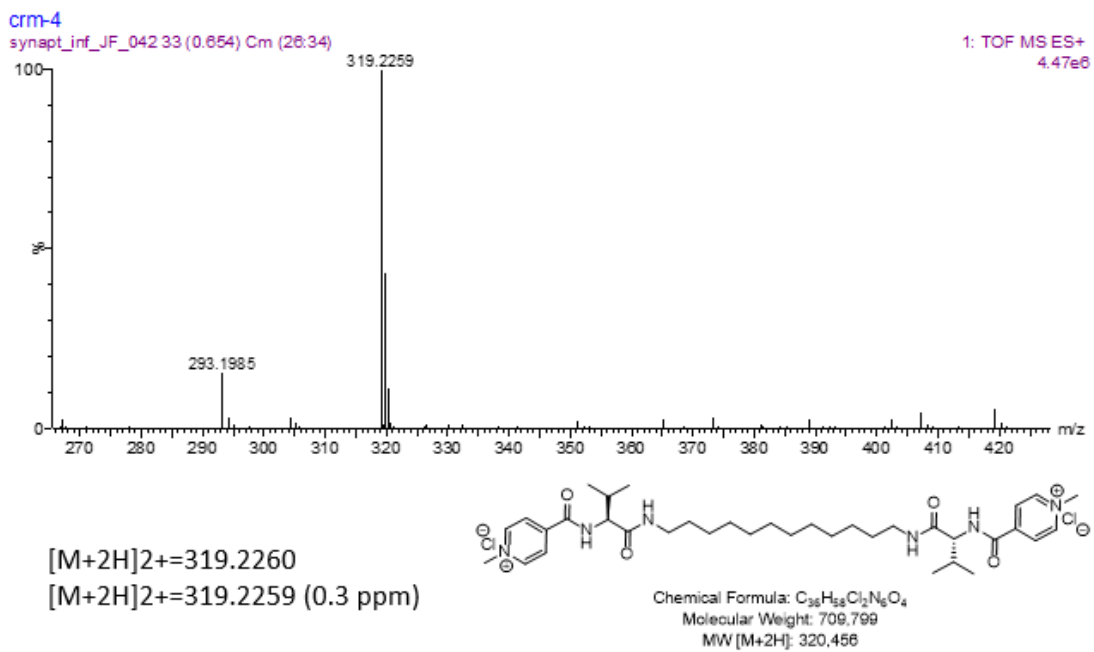


Figura 34 Espectro Masas de la molécula MePVal12

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hosta-Rigau, L., Schattling, P., Teo, B. M., Lynge, M. E., & Städler, B. (2014). Recent progress of liposomes in nanomedicine. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine*, 2(39), 6686–6691.
2. Bernal-Martínez, A. M., Angulo-Pachón, C. A., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2023). Reduction-responsive cationic vesicles from bolaamphiphiles with ionizable amino acid or dipeptide polar heads. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c01294>
3. Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of liposomes preparation: Formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics*, 14(3), 543.
4. Koynova, R., & Tenchov, B. (2009). Cationic phospholipids: structure–transfection activity relationships. *Soft Matter*, 5(17), 3187.
5. Majzoub, R. N., Ewert, K. K., & Safinya, C. R. (2016). Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 374(2072), 20150129.
6. Lee, H., Kim, H., & Lee, S.-Y. (2021). Self-assembling peptidic bolaamphiphiles for biomimetic applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(8), 3545–3572.
7. Navarro-Barreda, D., Angulo-Pachón, C. A., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2023). Reduction-triggered Disassembly of Organic Cationic Nanorods Produces a Cysteine Protease Mimic (Miravet et al.). *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 29(27), e202203764.
8. Navarro-Barreda, D., Bedrina, B., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2022). Glutathione-responsive molecular nanoparticles from a dianionic bolaamphiphile and their use as carriers for targeted delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 608(Pt 2), 2009–2017.
9. Torres-Martínez, A., Bedrina, B., Falomir, E., Marín, M. J., Angulo-Pachón, C. A., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2021). Non-polymeric nanogels as versatile nanocarriers: Intracellular transport of the photosensitizers Rose Bengal and hypericin for photodynamic therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 4(4), 3658–3669.
10. Navarro-Barreda, D., Angulo-Pachón, C. A., Bedrina, B., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2020). A dual stimuli responsive supramolecular gel provides insulin hydrolysis protection and redox-controlled release of actives. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 221(4), 1900419.
11. Angulo-Pachón, C. A., Díaz-Oltra, S., Ojeda-Flores, J. J., Falomir, E., Galindo, F., & Miravet, J. F. (2018). Self-assembled nanofibrillar networks: Boosting hydrogelation efficiency by replacement of a pyridine moiety by a quinoline one. *ChemNanoMat: Chemistry of Nanomaterials for Energy, Biology and More*, 4(8), 769–771. <https://doi.org/10.1002/cnma.201800219>

- 12.** Ewert, K. K., Scodeller, P., Simón-Gracia, L., Steffes, V. M., Wonder, E. A., Teesalu, T., & Safinya, C. R. (2021). Cationic liposomes as vectors for nucleic acid and hydrophobic drug therapeutics. *Pharmaceutics*, 13(9), 1365. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091365>
- 13.** Tsekova, D. S., Sáez, J. A., Escuder, B., & Miravet, J. F. (2009). Solvent-free construction of self-assembled 1D nanostructures from low-molecular-weight organogelators: sublimation vs. gelation. *Soft Matter*, 5(19), 3727. <https://doi.org/10.1039/b902516b>