



**TRABAJO FIN DE MÁSTER  
MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLOGÍA  
CURSO 2023/2024**

**SÍNTESIS Y ESTUDIO DE AGREGACIÓN DE  
BOLAANFÍFILOS ANIÓNICOS DERIVADOS DE  
AMINOÁCIDOS**

Águeda Alameda Cuesta

**Tutor**  
Juan Felipe Miravet Celades



## Abreviaturas

C.C.A.	Concentración crítica de agregación
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Doblete
dd	Doble doblete
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropiletilamina
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
eq.	Equivalentes
HPhe6	(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )- <i>N,N'</i> -(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)
HPhe12	(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )- <i>N,N'</i> -(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
HVal6	(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )- <i>N,N'</i> -(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide)
HVal12	(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )- <i>N,N'</i> -(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide)
m	Multiplete
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón (desplazamiento químico)
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
SucPhe6	(6 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-6,17-dibenzyl-4,7,16,19-tetraoxo-5,8,15,18-tetraazadocosanedioic acid
SucPhe12	(6 <i>S</i> ,23 <i>S</i> )-6,23-dibenzyl-4,7,22,25-tetraoxo-5,8,21,24-tetrazaoctacosanedioic acid
SucVal6	(6 <i>S</i> ,17 <i>S</i> )-6,17-diisopropyl-4,7,16,19-tetraoxo-5,8,15,18-tetraazadocosanedioic acid
SucVal12	(6 <i>S</i> ,23 <i>S</i> )-6,23-diisopropyl-4,7,22,25-tetraoxo-5,8,21,24-tetrazaoctacosanedioic acid
t	Triplete
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato

TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
THF	Tetrahidrofurano
Val	Valina
ZPheOH	((benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanine
ZValOH	((benzyloxy)carbonyl)-L-valine
ZPhe6	Dibenzyl ((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate
ZPhe12	Dibenzyl ((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate
ZVal6	Dibenzyl ((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate
ZVal12	Dibenzyl ((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate

## **Agradecimientos**

Primero quiero dar las gracias al Dr. Juan F. Miravet, el supervisor de este trabajo, por el tiempo que me ha dedicado durante estos meses. Su orientación, sus consejos y su apoyo constante han sido fundamentales para la realización de este proyecto.

Al Dr. César A. Angulo Pachón, muchas gracias por estar conmigo durante este tiempo, su paciencia y disposición para resolver mis dudas me han permitido crecer tanto profesional como personalmente. Gracias por el tiempo dedicado siempre con una sonrisa.

A todos mis compañeros de laboratorio. Sin su ayuda, sus consejos y esas charlas que tanto nos hicieron reír, este trabajo no habría sido posible. Gracias a Mireia, María Dolores y Ayman por estar siempre ahí, por compartir su conocimiento y por hacer del laboratorio un lugar genial para trabajar.

Finalmente, a los que siempre han creído en mí, mi familia y mi pareja, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme en cada nueva aventura y por vuestra paciencia y amor incondicional. Muchas gracias.



# Índice

<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Sistema de administración de fármacos basado en nanopartículas	1
1.2. Nanoportadores aniónicos	2
1.2.1. Liposomas aniónicos	2
1.2.2. Bilosomas	4
1.2.3. Polisacáridos aniónicos	6
1.3. Bolaanfífilos moleculares y trabajo previo del grupo	8
<b>2. Objetivos</b>	13
<b>3. Resultados y Discusión</b>	17
3.1. Síntesis	17
3.2. Comparación de propiedades físico-químicas de los diferentes compuestos finales	19
3.2.1. Determinación de propiedades ácido-base ( $pK_a$ )	20
3.3. Estudios de agregación	22
3.3.1. Estudios de fluorescencia	22
3.3.2. Determinación de la concentración crítica de agregación (CCA)	26
3.3.3. Estudio de la formación de nanopartículas mediante DLS	29
3.3.4. TEM	33
<b>4. Conclusiones</b>	37
<b>5. Bibliografía</b>	41

<b>6. Sección Experimental</b>	45
6.1. Métodos Generales	45
6.2. Procedimiento experimental para la síntesis de compuestos ácidos	46
6.2.1. Acoplamiento del L-aminoácido Z protegido con la diamina	47
6.2.2. Desprotección del grupo Z	49
6.2.3. Obtención de los compuestos finales	51
6.3. Determinación del $pK_a$	53
6.4. Preparación de las muestras	53
6.5. Concentración crítica de agregación por Nile Red (NR)	53
6.6. TEM	54
6.7. DLS ( <i>dynamic light scattering</i> )	54
<b>7. Anexo</b>	57
7.1. Espectros RMN	57

# Introducción



## Introducción

La nanomedicina y los nanosistemas de administración representan disciplinas científicas novedosas en constante evolución, empleando la nanoescala como herramienta de diagnóstico o para administrar agentes terapéuticos a lugares específicos de forma controlada. La nanotecnología ofrece numerosas ventajas en el tratamiento de enfermedades crónicas humanas al permitir la administración precisa de medicamentos en ubicaciones específicas y orientadas a objetivos definidos, abarcando aplicaciones destacadas como agentes quimioterapéuticos, biológicos e inmunoterapéuticos, en el tratamiento de diversas enfermedades. <sup>1</sup>

### 1.1. Sistemas de administración de fármacos basado en nanopartículas

La primera generación de terapias basadas en nanopartículas, aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), comprendía sistemas lipídicos, tales como liposomas y micelas. Estos fosfolípidos exhiben la capacidad de contener nanopartículas inorgánicas, como el oro o nanopartículas magnéticas. Dichas propiedades han estimulado un incremento en la aplicación de nanopartículas inorgánicas, especialmente en contextos vinculados con la administración de fármacos, el diagnóstico por imagen y aplicaciones terapéuticas. Algunos de los beneficios derivados del uso de la nanotecnología en la administración de fármacos, incluyen el suministro preciso de medicamentos en ubicaciones específicas y dirigidos a objetivos particulares, además las nanoestructuras tienen una circulación prolongada en la sangre, lo que permite la liberación controlada de fármacos, tratando así células enfermas con mayor eficacia y con efectos secundarios reducidos. <sup>2</sup>

Las nanopartículas optimizan la eficacia terapéutica de los sistemas de administración de fármacos de diversas maneras. En primer lugar, mejoran la biodisponibilidad y el tiempo de absorción de los fármacos, lo que se traduce en mejores resultados terapéuticos. En segundo lugar, disminuyen el tiempo de liberación de los fármacos, lo que permite una liberación controlada y sostenida. En tercer lugar, eliminan la agregación de fármacos, lo que puede mejorar su solubilidad en la sangre. En cuarto lugar, las nanopartículas pueden diseñarse para dirigirse a células o tejidos específicos, lo que permite una administración más

precisa del fármaco y reduce los efectos no deseados. Por último, las nanopartículas pueden proteger a los fármacos de la degradación enzimática o los cambios de pH, lo que mejora su estabilidad y eficacia.<sup>3</sup>

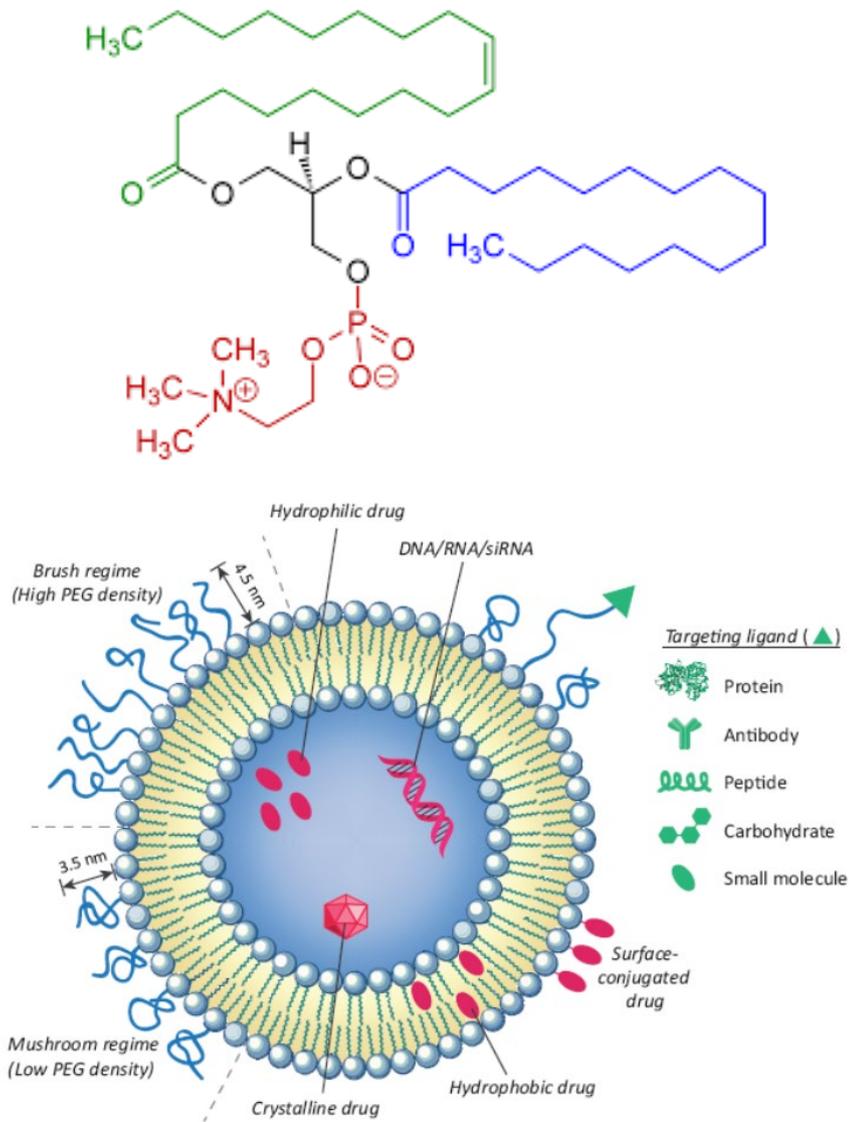
## **1.2. Nanoportadores aniónicos**

Los nanoportadores aniónicos son aquellas partículas con escala nanométrica que transportan sustancias activas, como fármacos, los cuales tienen una carga negativa. Estas nanopartículas aniónicas pueden interactuar con moléculas o tejidos específicos en el cuerpo debido a su carga eléctrica, pudiendo así tener una administración controlada y dirigida del fármaco ya que la carga negativa puede facilitar la interacción con ciertos receptores celulares los cuales pueden tener afinidad por cargas opuestas, lo que mejoraría la internalización de los nanoportadores en las células objetivo.<sup>4</sup>

### **1.2.1. Liposomas aniónicos**

Los liposomas son estructuras esféricas formados por lípidos, los cuales pueden ser de origen natural o artificial, y se caracterizan por presentar una parte polar (cabeza) y una parte hidrófoba (cola), lo cual les confiere propiedades anfifílicas. Debido a la propia estructura de los liposomas, son buenos portadores tanto de moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas. Además, su tamaño puede variar en función de la cantidad de carga que debe transportar, pudiéndose modificar también la superficie de este con pequeños péptidos de reconocimiento para poder mejorar la interacción con las proteínas de la superficie celular diana (**Figura 1**).<sup>5</sup>

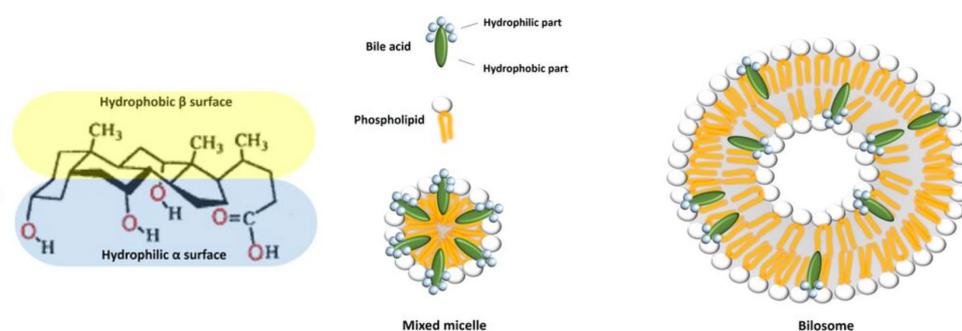
Los liposomas pueden dividirse en diferentes subtipos, liposomas catiónicos, liposomas aniónicos y liposomas neutros. Los liposomas catiónicos interactúan con glicoproteínas cargadas negativamente, lo que proporciona una mayor afinidad y tiempo de residencia en las células dianas, lo cual se traduce en una mayor administración del fármaco. Por el contrario, los liposomas aniónicos presentan una mayor estabilidad en solución lo que conduce a una menor agregación y una mayor endocitosis que los catiónicos y neutros.<sup>6</sup>



**Figura 1:** Estructura de un fosfolípido (fosfatidilcolina) y representación esquemática de un liposoma. <sup>5</sup>

### 1.2.2 Bilosomas

Los bilosomas son estructuras nanovesiculares (liposomas) estabilizados con sales biliares, lo cual les permite ser más flexibles, elásticos y ultradeformables (**Figura 2**).<sup>7</sup> La literatura nos describe dos tipos principales de bilosomas, los probilosomas, los cuales son formulaciones de polvo seco compuestos por lípidos o tensioactivos, fármacos y excipientes como el manitol, tras la hidratación, se dispersan formando así vesículas bilosómicas. Estos superan los problemas de estabilidad física encontrados en las vesículas convencionales, además de ofrecer otra serie de ventajas, son de sencillo almacenaje, administración, distribución y transporte.<sup>8</sup>



**Figura 2:** Estructura del ácido cólico (un ácido biliar) y representación esquemática de un bilosoma <sup>7</sup>

Por otro lado, están los bilosomas de superficie modificada, los cuales ofrecen diferentes ventajas como la identificación de receptores en la superficie celular y detección de ligandos. La superficie de estos bilosomas puede ser modificada por diferentes compuestos como polímeros, activadores de bordes pegilados y carbohidratos, mejorando así su capacidad de ataque contra diferentes enfermedades.<sup>9</sup>

Para la creación de los bilosomas se necesitan diferentes componentes como son las sales biliares, un surfactante no iónico, colesterol y fosfolípidos.

Las sales biliares son moléculas anfipáticas con un grupo esteroide, el cual tiene un lado hidrófilo formado por grupos hidroxilo y un lado hidrófobo con grupos metilo. La composición de estas sales biliares hace que no sean tóxicas, son biológicamente

compatibles además de ser tensioactivos diferentes a los convencionales ya que presentan una polaridad plana, al contrario de los convencionales los cuales presentan cola y cabeza. La función principal de las sales biliares es la capacidad de emulsionar y solubilizar las grasas produciendo la formación de micelas mixtas, también actúan como agentes potenciadores de la permeabilidad, ayudando así a mejorar la biodisponibilidad oral de los fármacos lipofílicos, favoreciendo así el paso a través de las membranas biológicas. Mediante la introducción de sales biliares en la membrana vesicular de los bilosomas, se proporciona un efecto estabilizador y resistente a los de los ácidos biliares presentes en el tracto gastrointestinal, además de facilitar la absorción a través de los vasos sanguíneos hacia la circulación sistémica.<sup>10</sup>

El agregar un surfactante no iónico a la preparación de vesículas hace que tenga una mayor compatibilidad, estabilidad y presente menor toxicidad que sus homólogos aniónicos o catiónicos. Este tensioactivo no iónico presenta segmentos polares y no polares con una alta actividad interfacial, lo que conlleva a una menor irritación hemolítica y una menor toxicidad en la superficie de la célula. Presentando además diversas funciones como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y potenciadores de la permeabilización. Por último, los surfactantes no iónicos tienden a formar vesículas bicapa en lugar de formar micelas.<sup>11</sup>

La incorporación del colesterol a los bilosomas afecta a las propiedades de la membrana, como la agregación, el tamaño y forma, la permeabilidad de los iones y la elasticidad, esto es debido a que es una molécula anfifílica, donde los tres grupos  $\beta$ -hidroxilo se orientan hacia la superficie acuosa. El uso del colesterol reduce la fuga de sustancias solubles al agua ya que disminuye la fluidez de la membrana de la vesícula, mejorando así la rigidez y estabilidad de la bicapa.<sup>10</sup>

La naturaleza anfifílica de los fosfolípidos hace que la vesícula presente propiedades humectantes, emulsionantes y de autoensamblaje, debido a la composición de esta molécula ya que contiene una cola hidrófoba con un grupo fósforo con cadenas acilo y una cabeza hidrófila unida a un alcohol.<sup>11</sup>

### 1.2.3 Polisacáridos aniónicos

Los polisacáridos son polímeros constituidos por monosacáridos los cuales se unen mediante enlaces glucosídicos, los cuales poseen una biocompatibilidad y biodegradabilidad inherentes, lo cual le confiere una gran importancia a la hora de considerarlos un material para aplicaciones biomédicas ya que pueden ser fácilmente aceptados por células y/o tejidos. Además, según la literatura de estos últimos años, se les considera un buen biomaterial ya que logran la encapsulación celular, tienen un bajo costo, una facilidad de procesamiento y presentan un funcionamiento adecuado con la interacción del tejido cercano.<sup>12</sup>

Dentro de estos polímeros podemos encontrar polisacáridos de interés con funciones nanoportadoras como son el alginato, el ácido hialurónico (HA), el sulfato de condroitina (CoS), el sulfato dextrano, la carragenina (CG) y la heparina.

#### Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico natural extraído de algas pardas, este biopolímero presenta grupos carboxilo finales (**Figura 3**), clasificándose, así como un mucoadhesivo aniónico. Se utiliza principalmente para encapsular y administrar fármacos en sistemas de liberación controlada. Presenta una alta capacidad para formar hidrogeles en presencia de cationes divalentes, debido a su biocompatibilidad, flexibilidad mecánica y actividad reticulante, por lo que lo convierte en un buen candidato para crear cápsulas cargadas de fármacos.<sup>12</sup>

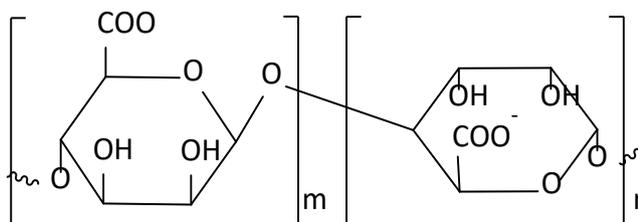
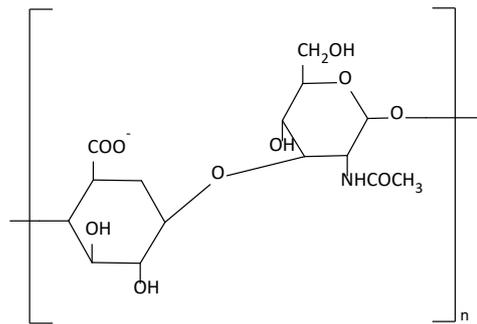


Figura 3: Estructura química del alginato

### Ácido hialurónico

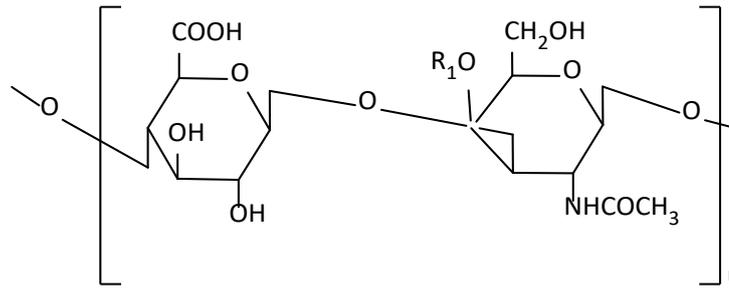
El ácido hialurónico es un polisacárido aniónico natural debido a la presencia de un grupo carboxilo en su estructura (**Figura 4**), este proviene de la matriz extracelular, el líquido sinovial de las articulaciones, el cordón umbilical, la piel y el vítreo del ojo. Gracias a su hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, fácil modificación y baja citotoxicidad, presenta extensas aplicaciones biomédicas. El HA de alto peso molecular posee propiedades inmunosupresoras, antiinflamatorias, antiangiogénicas y son capaces de prevenir la proliferación celular.<sup>12</sup>



**Figura 4:** Estructura química del ácido hialurónico

### Sulfato de condroitina

El sulfato de condroitina es una componente estructural del cartílago, el cual es capaz de proporcionar resistencia a la compresión. Estructuralmente es un glicosaminoglicano sulfatado compuesto por unidades de disacáridos repetidos los cuales tiene grupos azufre en diferentes posiciones de carbono (**Figura 5**). Dado que se trata de un polisacárido aniónico, puede reaccionar con facilidad con polisacáridos catiónicos dando lugar a nanopartículas capaces de liberar fármacos en dianas específicas. Este polisacárido se ha utilizado como agente terapéutico para enfermedades articulares como la artrosis y enfermedades cardiovasculares, debido a las propiedades de anticoagulación, antiinflamación, antiapoptótica, antioxidación y antitumoral que presenta.<sup>12</sup>



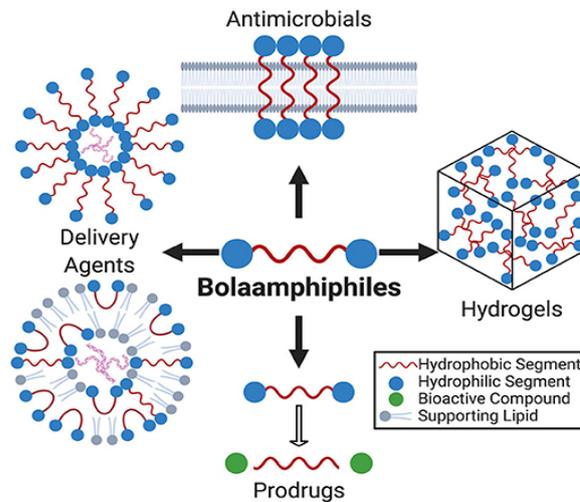
**Figura 5:** Estructura química del sulfato de condroitina  $R_1=SO_3H$

### 1.3 Bolaanfífilos moleculares y trabajo previo en el grupo

Los bolaanfífilos son moléculas con dos cabezas polares separadas por una cadena hidrofóbica. Este diseño permite la formación de estructuras de autoensamblaje en soluciones acuosas, como micelas o nanopartículas, estas propiedades están influenciadas por factores como el pH, la concentración, temperatura, la naturaleza de los extremos hidrofílicos y la región hidrofóbica.<sup>13</sup>

Los bolaanfífilos se utilizan en la entrega controlada de fármacos, ya que sus nanoestructuras pueden encapsular y liberar medicamentos de manera controlada, además, su biocompatibilidad y capacidad para atravesar membranas biológicas los hace ideales para aplicaciones médicas.<sup>13</sup>

La **Figura 6** proporciona las diversas aplicaciones de los bolaanfífilos, destacando su versatilidad y potencial en el ámbito de la biomedicina y la biotecnología.<sup>14</sup>



**Figura 6:** Diferentes usos de los bolaanfífilos <sup>14</sup>

En el centro de la imagen, se muestra la estructura básica de los bolaanfífilos, que se caracterizan por tener un segmento hidrofóbico (representado en rojo) flanqueado por dos segmentos hidrofílicos (representados en azul). Esta estructura dual permite que los bolaanfífilos se autoensamblen en diversas conformaciones útiles para distintas aplicaciones biomédicas. <sup>14</sup>

En la parte izquierda de la imagen, se presenta la capacidad de los bolaanfífilos para formar micelas, que actúan como agentes de entrega. Estas micelas encapsulan compuestos bioactivos (indicados en verde), protegiéndolos y facilitando su liberación controlada en sitios específicos del organismo. Esta propiedad es especialmente valiosa para la administración de medicamentos, ya que mejora la biodisponibilidad y la estabilidad de los fármacos, al tiempo que reduce sus efectos secundarios. <sup>14</sup>

En la parte superior, se destaca el uso de los bolaanfífilos en aplicaciones antimicrobianas. Al integrarse en las membranas celulares, los bolaanfífilos pueden alterar la estructura y la funcionalidad de las membranas bacterianas, conduciendo a la desestabilización y muerte de las células microbianas. Esta característica es particularmente importante en el contexto de la resistencia a los antibióticos, ya que ofrece una alternativa eficaz para combatir infecciones resistentes a los tratamientos tradicionales. <sup>14</sup>

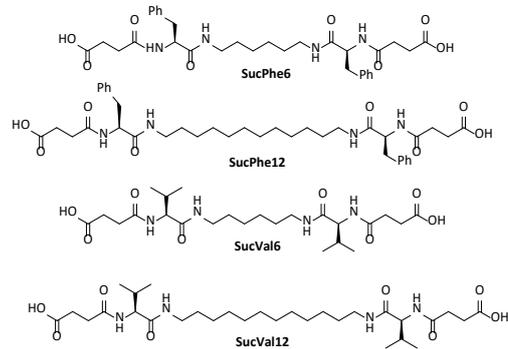


# Objetivos



## Objetivos

- Síntesis y caracterización de cuatro compuestos de estructura bolaanfílica aniónica con ácidos carboxílicos como grupo terminal, conteniendo en su estructura los aminoácidos fenilalanina o valina. Se pretende utilizar como separador unidades de seis y doce átomos metilenos para modular la hidrofobicidad de los compuestos.



- Determinación del pKa de los compuestos sintetizados mediante técnicas de valoración potenciométrica
- Estudiar la agregación de estos compuestos mediante las técnicas de fluorescencia, DLS (*Dynamic Light Scattering*) y microscopía electrónica (TEM).

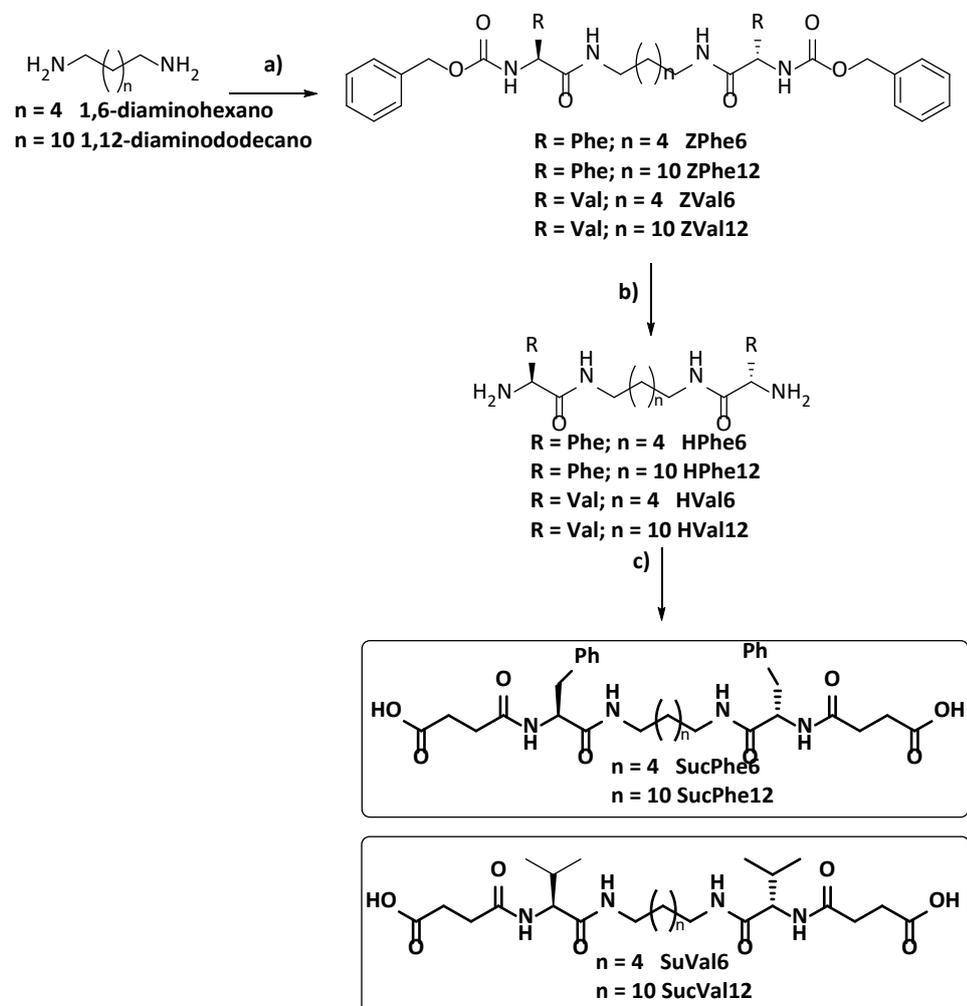


## **Resultados y Discusión**



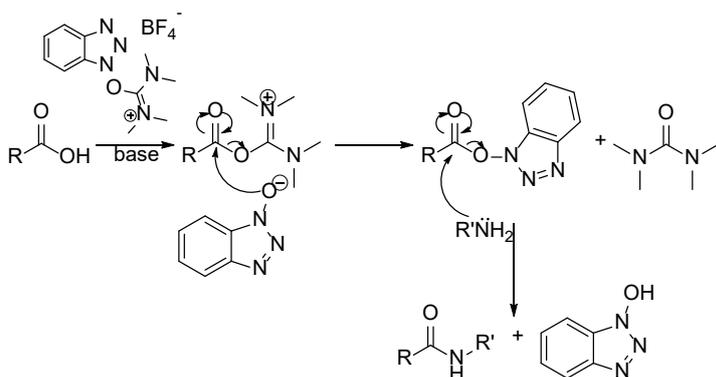
## Resultados y Discusión

## 3.1 Síntesis

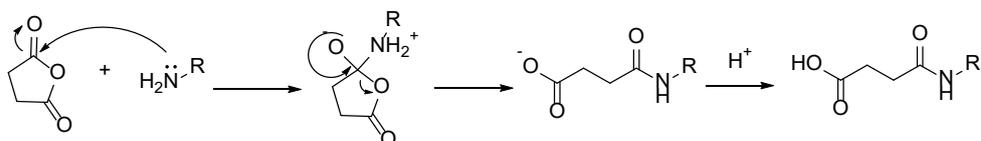


**Esquema 1:** Reactivos y condiciones: a) ZPheOH o ZValOH, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 66%; b)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t.a., 3 – 6h, 76%; c) Anhídrido succínico,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , THF, t.a., 16 h, 84 %.

La síntesis descrita en el **Esquema 1** está basada en la metodología para preparar moléculas relacionadas que viene utilizándose en el grupo. Como se puede observar, la primera reacción es el acoplamiento de la diamina con el L-aminoácido Z protegido mediante la activación con el TBTU (mecanismo en el **Esquema 2**). El segundo paso es la desprotección del grupo Z. Por último, hay un segundo acoplamiento con el anhídrido succínico para dar el producto final (**Esquema 3**).



**Esquema 2:** Mecanismo de formación de enlace amida promovido por TBTU



**Esquema 3:** Mecanismo de la reacción entre una amina y el anhídrido succínico

Para comprobar la correcta formación de cada compuesto final, se realizó un RMN de protón. En la **Figura 7** se muestra como ejemplo el obtenido para el compuesto SucPhe12.

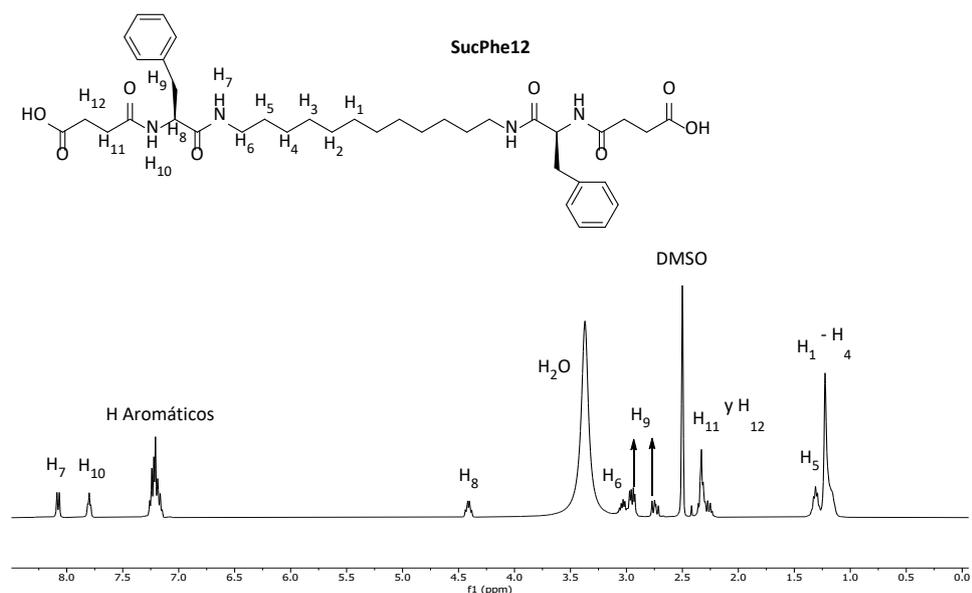


Figura 7: Espectro 1H RMN SucPhe12 en DMSO-d<sub>6</sub>

### 3.2 Comparación de propiedades físico-químicas de los diferentes compuestos finales

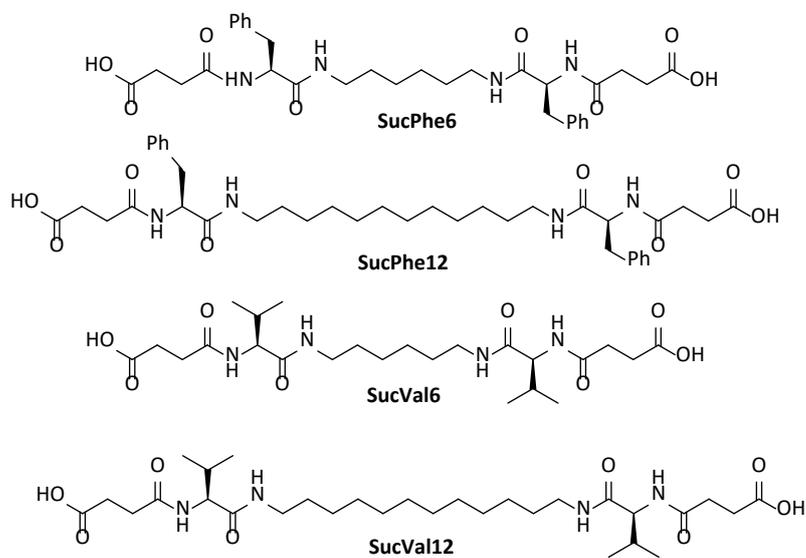


Figura 8: Estructuras de los compuestos finales

### 3.2.1. Determinación de propiedades ácido-base (pKa)

Se realizó una valoración potenciométrica para la determinación de las constantes de acidez de ambos compuestos. Las constantes se obtuvieron mediante ajuste iterativo de los datos experimentales con los teóricos con el programa HYPERQUAD. Los valores obtenidos de pKa se muestran en la tabla siguiente.

Tabla I: Valores obtenidos de pKa

Compuesto	pKa1	pKa2
SucVal6	4.0	5.5
SucVal12	6.6	8.3
SucPhe6	4.7	8
SucPhe12	7.1	7.2

Con dichos valores de pKa se construyeron con el programa Hyss2009 los diagramas de distribución de especies que se pueden ver en la **Figura 9**.

Como se puede observar en la **Figura 9**, para el compuesto SucVal6, la especie doblemente protonada (AH<sub>2</sub>) predomina por debajo de pH 4, mientras que la especie desprotonada (A) es mayoritaria por encima de pH 7. Entre pH 5 y 7, se obtiene una mezcla de las tres especies, con la monoaniónica (AH) siendo la menos abundante.

En el caso de SucVal12, la especie doblemente protonada es dominante por debajo de pH 4. A pH mayores a 7, predomina la especie completamente desprotonada (dianiónica). En el rango de pH 4 a 7, también se observa una mezcla de las tres especies, con la monoaniónica como minoritaria.

Para SucPhe6, a pH 5 predomina la especie doblemente protonada. A pH superiores a 7 la especie dianiónica se vuelve mayoritaria. Entre pH 5 y 7 se obtiene una mezcla de las tres posibles especies, con la monoaniónica en menor proporción.

Por último, el compuesto SucPhe12 muestra una predominancia de la especie doblemente protonada a pH 5. La especie dianiónica es mayoritaria por encima de pH 7 y entre pH 5 y 7 se obtiene una mezcla de las tres posibles especies, siendo la monoaniónica la menos presente.

Con estos datos se puede observar que SucVal6 y SucPhe6 presentan un comportamiento similar, donde la especie doblemente protonada es predominante a pH bajos ( $\approx 3-5$ ), la especie monoaniónica es mayoritaria a pH intermedios ( $\approx 5-7$ ) y la especie desprotonada domina a pH altos ( $\approx 7-9$ ). En contraste, aunque SucVal12 y SucPhe12 exhiben un patrón de distribución similar al anterior, las transiciones entre las especies ocurren a valores de pH ligeramente más bajos, con AH<sub>2</sub> predominando a pH bajos ( $\approx 3-4$ ), AH siendo mayoritaria a pH intermedios ( $\approx 4-7$ ) y A como la especie principal a pH altos ( $\approx 7-9$ ).

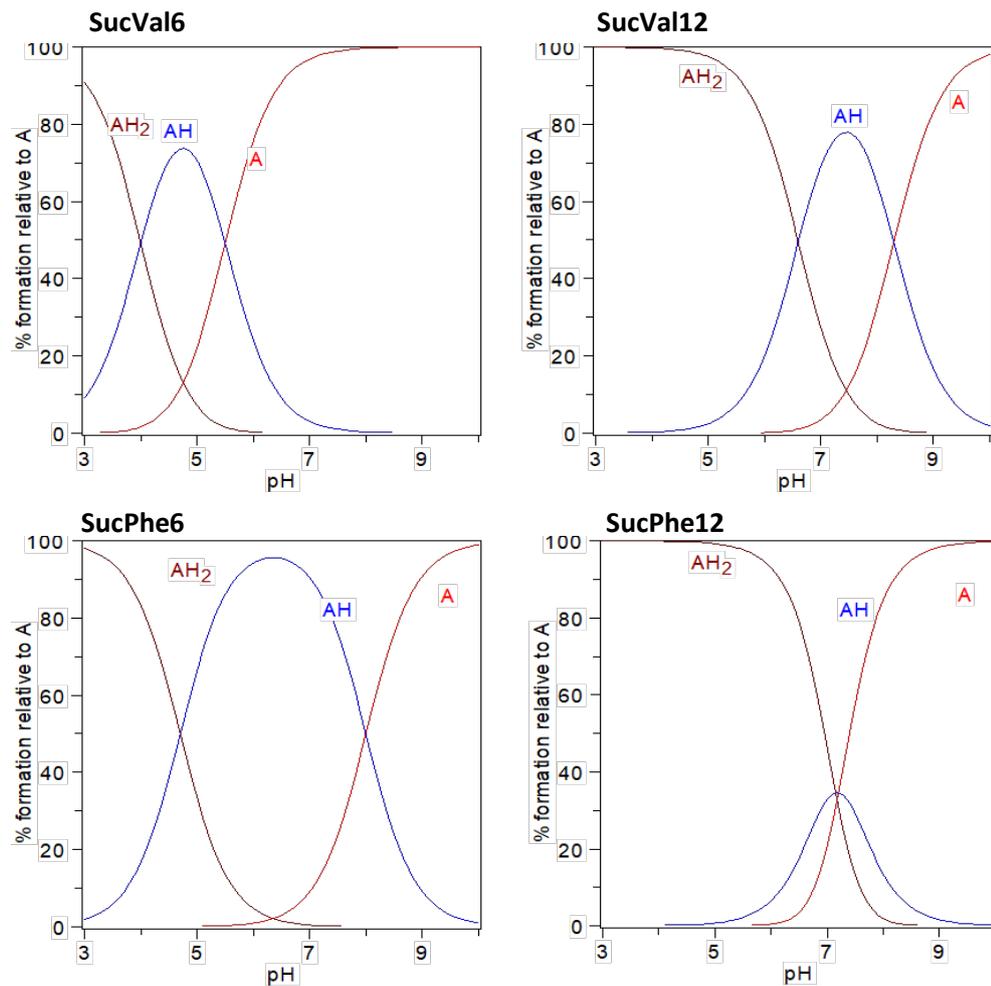


Figura 9: Diagrama de distribución de especies de los compuestos finales

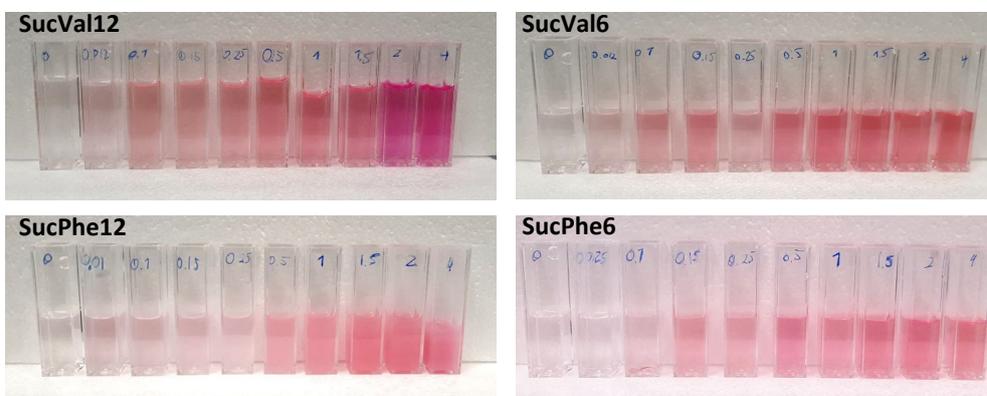
### 3.3. Estudios de agregación

#### 3.3.1 Estudio de fluorescencia

Después de sintetizar los diferentes compuestos finales, se realizó una prueba de concepto para determinar si los diferentes compuestos podían agregarse en un medio tamponado con TRIS a pH 9 y tener la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas. Para ello se utilizó como sonda el Rojo de Nilo (NR), un colorante lipófilo que tiene afinidad por los lípidos y puede penetrar fácilmente las membranas celulares y las estructuras lipídicas.

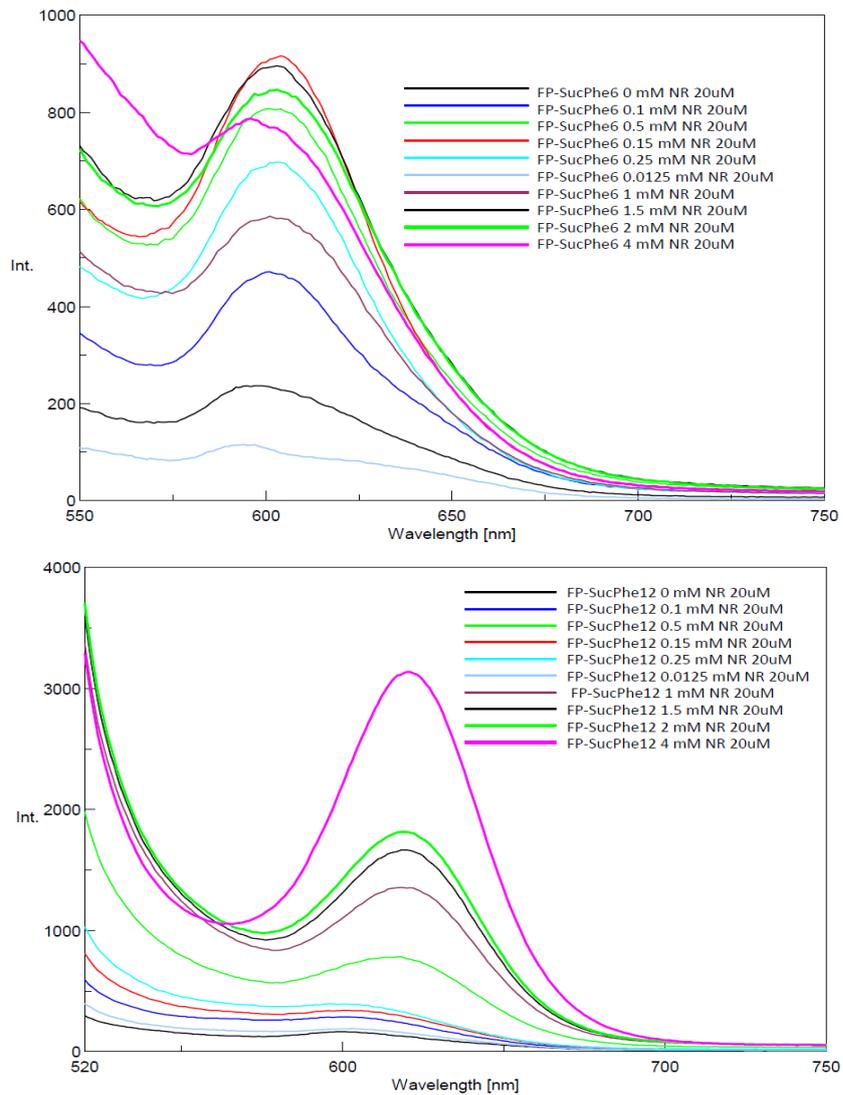
El NR no es muy fluorescente en la mayoría de los disolventes polares, como las soluciones acuosas o tamponadas. Sin embargo, cuando se encuentra en un entorno lipófilo o no polar, como el interior de la estructura bolaanfílica sintetizada, se vuelve intensamente fluorescente.

De esta forma se prepararon distintas concentraciones de cada compuesto (desde 0.0125 hasta 4 mM) junto con una solución stock de NR de 20  $\mu$ M disueltas en 2 mL de tampón Tris 0.1M, pH 9. La **Figura 10** muestra la encapsulación de los compuestos en presencia de NR. Las distintas concentraciones de compuesto se reflejan en el aumento de la intensidad de coloración roja, indicando la interacción y encapsulación efectiva del colorante en un entorno lipofílico.

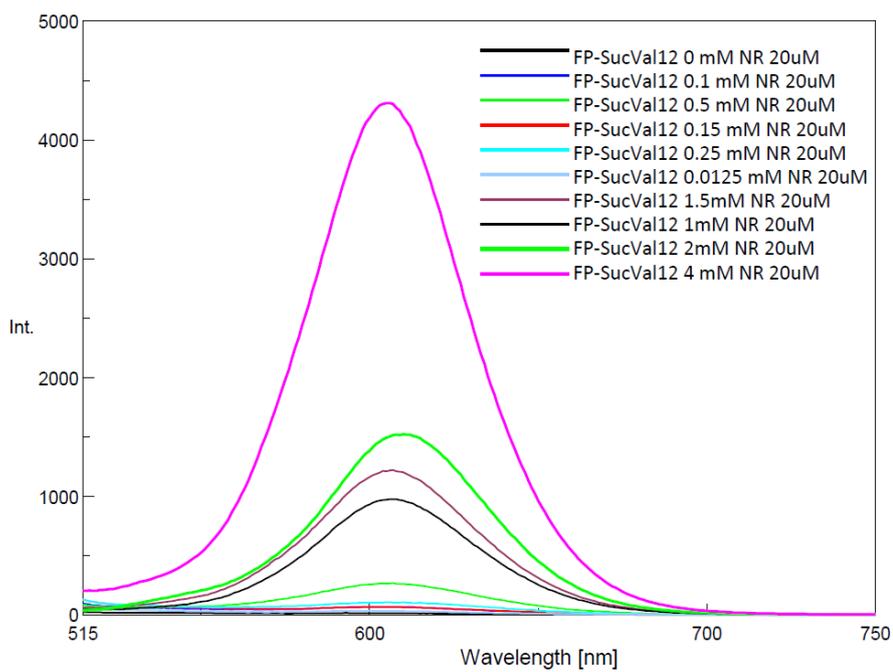
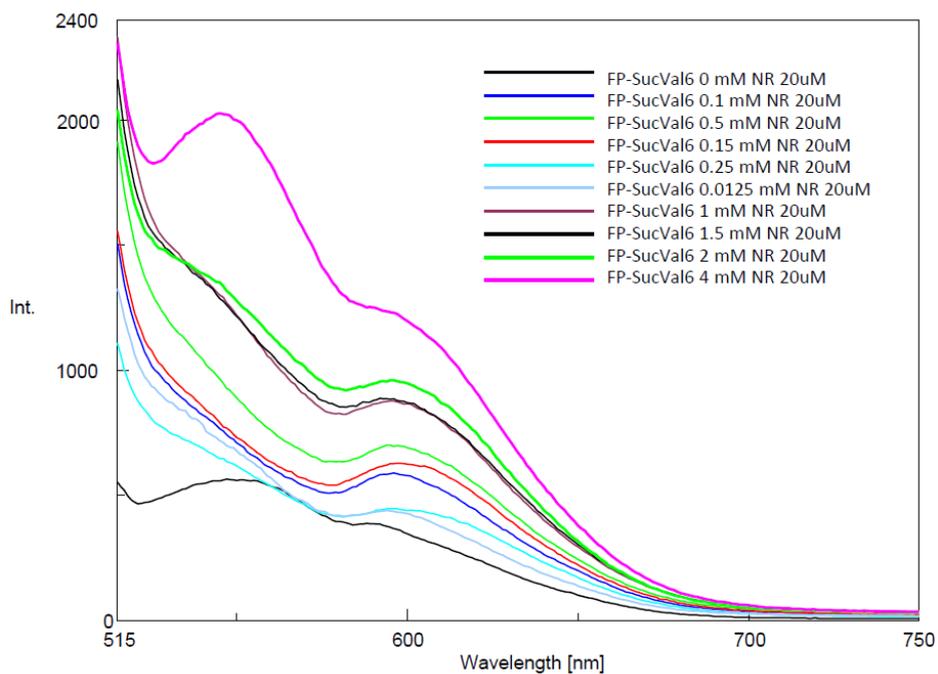


**Figura 10:** Cubetas utilizadas en la evaluación de la encapsulación de los compuestos finales en presencia de NR. Se evaluaron las distintas concentraciones (0, 0.0125, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 mM)

Después de confirmar la encapsulación del NR mediante observación visual de los cambios de coloración, se procedió a realizar mediciones de fluorescencia para obtener una caracterización más detallada de la interacción entre el compuesto sintetizado y la sonda. Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia para diferentes concentraciones de compuesto en presencia de una concentración constante de NR, como se puede observar en la **Figura 11** para los compuestos finales con fenilalanina y en la **Figura 12** para los compuestos con valina.



**Figura 11:** Estudio de fluorescencia para los compuestos SucPhe6 y SucPhe12



**Figura 12:** Estudio de fluorescencia para los compuestos SucVal6 y SucVal12

Los espectros de fluorescencia para los compuestos SucPhe6 y SucPhe12, presentados en la **Figura 11**, muestran como la intensidad de fluorescencia varía con la concentración del compuesto en presencia de NR. Para ambos compuestos, se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta su concentración. En concentraciones bajas (0-0.1mM), la fluorescencia es débil, indicando una menor encapsulación del NR. Sin embargo, a concentraciones más altas, 1mM y superiores, la fluorescencia se intensifica significativamente, lo que sugiere una mayor interacción y encapsulación del NR en el entorno lipofílico proporcionado por los compuestos. La mayor intensidad de fluorescencia se observa a 4mM, lo que destaca la eficacia de estos compuestos para encapsular moléculas lipofílicas.

Al comparar los resultados de los compuestos SucPhe6 y SucPhe12, se observa un comportamiento similar en ambos casos, ya que la intensidad aumenta con la concentración del compuesto. No obstante, hay diferencias notables en la magnitud de la fluorescencia entre los dos compuestos. SucPhe12 muestra una intensidad más alta en general, lo que sugiere una capacidad de encapsulación de NR ligeramente superior en comparación con SucPhe6. Este comportamiento podría estar relacionado con las diferencias estructurales entre los dos compuestos que afectan a su interacción con la sonda.

En cuanto a la **Figura 12**, en ambas gráficas, se observa que la intensidad de fluorescencia aumenta con la concentración de los compuestos. En el caso del compuesto SucVal6 se observa un desplazamiento gradual del máximo de emisión al aumentar la concentración, fenómeno que no ocurre en el caso de SucVal12. Este desplazamiento podría indicar la transición progresiva entre diferentes tipos de estructuras agregadas al aumentar la concentración de SucVal6. También se puede observar que la intensidad de fluorescencia es mayor en SucVal12 en comparación con SucVal6, lo que sugiere que SucVal12 podría ser más efectivo en la encapsulación de sustratos hidrofóbicos como resultado de su mayor hidrofobicidad.

### 3.3.2 Determinación de la concentración crítica de agregación (CCA)

Para evaluar el rango de concentraciones donde forman agregados los diferentes compuestos, se determinó el valor de concentración crítica de agregación. La CCA es un parámetro clave que indica la mínima concentración a la cual las moléculas de un compuesto comienzan a agregarse y formar estructuras estables como vesículas o micelas. Para ello, con los datos de intensidad y concentración obtenidos en la fluorescencia, a una misma longitud de onda, se realizaron distintos gráficos de cada uno de los compuestos finales para poder determinar la CCA.

En la **Figura 13**, se puede observar que para SucPhe6 la intensidad de fluorescencia aumenta con la concentración hasta aproximadamente 0.2mM. Después de este punto, la intensidad se estabiliza, indicando que la CCA para SucPhe6 es alrededor de 0.25mM. En la gráfica inferior, para SucPhe12, se observa que la concentración se presenta en escala logarítmica. La intensidad de fluorescencia aumenta rápidamente a partir de una concentración logarítmica de -1. Esto indica que la CCA para SucPhe12 se encuentra en un valor cercano a 0.5mM.

La diferencia en la CCA entre ambos compuestos sugiere que SucPhe12 requiere una concentración más alta para iniciar el proceso de autoensamblaje en comparación con SucPhe6. Esto puede ser debido a las variaciones en la estructura molecular y las interacciones intermoleculares que influyen en la estabilidad y formación de los agregados.

La **Figura 14** muestra dos gráficas que representan el estudio de CCA para los compuestos SucVal6 y SucVal12. En la gráfica superior para SucVal6, la intensidad de fluorescencia permanece casi constante hasta aproximadamente una concentración de 0.25mM. A partir de este punto, la intensidad aumenta significativamente, lo que indica que la CCA para SucVal6 es cercana 0.25mM. En la gráfica inferior, para SucVal12, la intensidad de fluorescencia también es estable hasta cerca de 0.25mM, siendo este el valor aproximado de CCA.

Ambos compuestos muestran una CCA similar, alrededor de 0.25mM. Esto sugiere que ambos tienen una tendencia comparable a autoensamblarse en estructuras supramoleculares a esta concentración. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia más alta observada en SucVal12 podría indicar una diferencia en la eficiencia de formación de agregados o en el tamaño y estructura de estos.

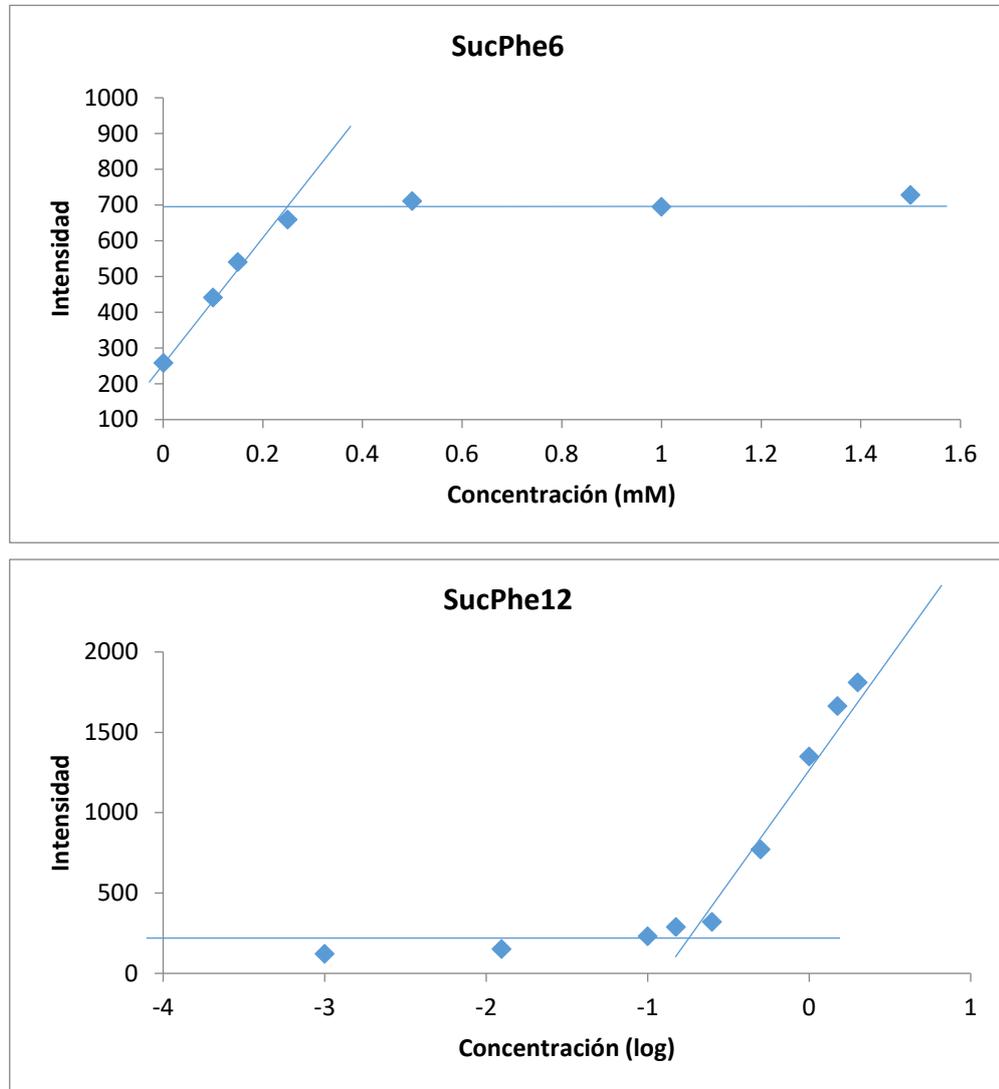


Figura 13: Estudio de CCA para los compuestos SucPhe6 y SucPhe12

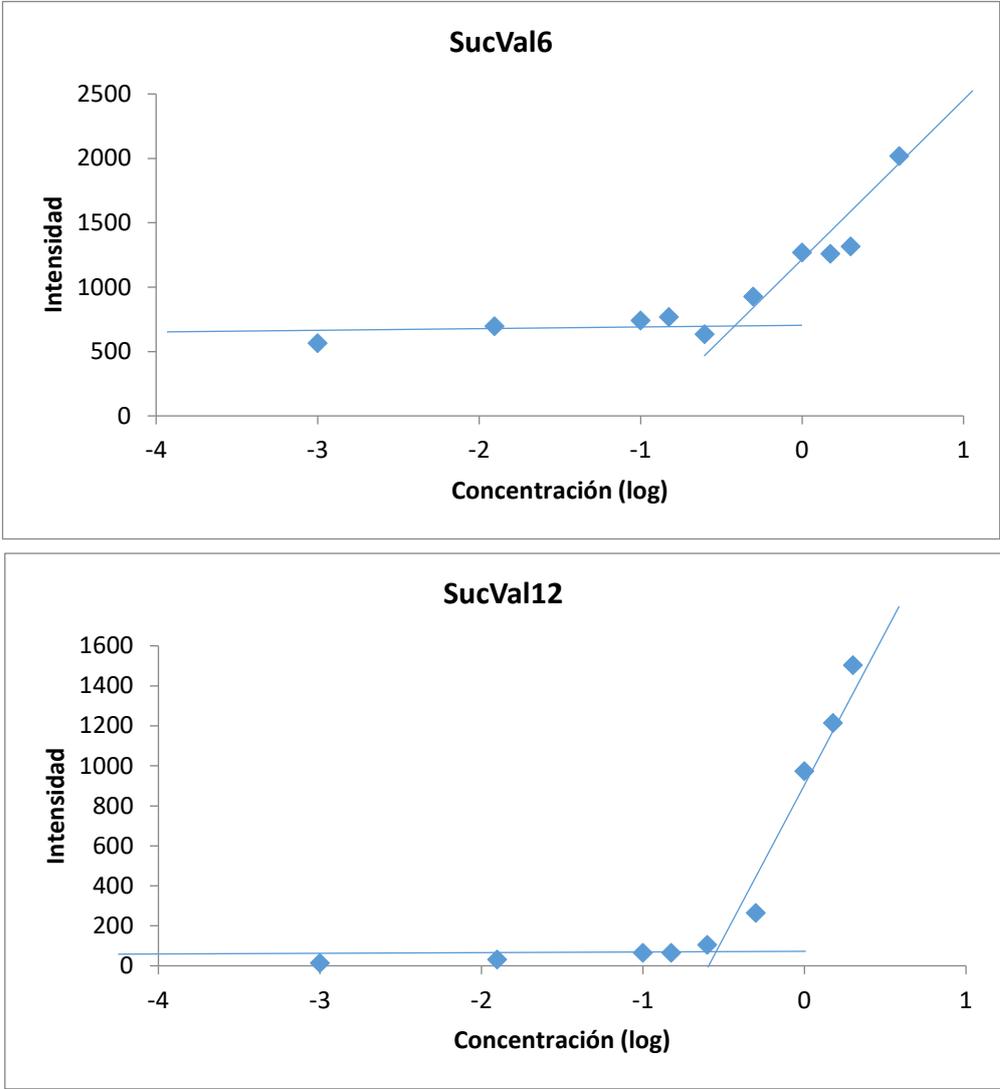


Figura 14: Estudio de CCA para los compuestos SucVal6 y SucVal12

### 3.2.4. Estudio de la formación de nanopartículas mediante DLS

Se realizó un análisis DLS para determinar el tamaño de las vesículas formadas. Esta técnica analiza la dispersión de la luz de la muestra para obtener la velocidad de difusión de las partículas. A partir de eso, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, se puede calcular un diámetro considerando partículas esféricas.

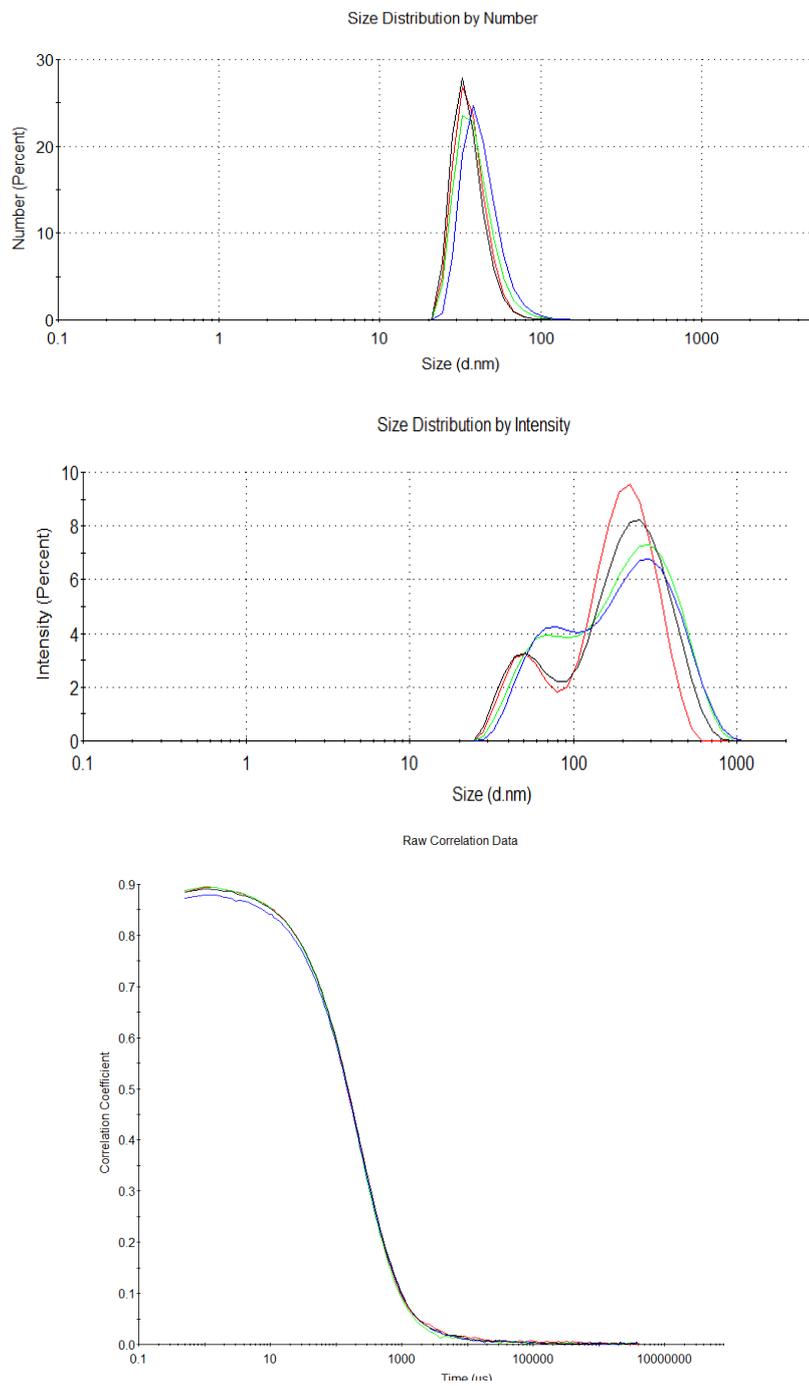
$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Siendo  $d_H$  el diámetro hidrodinámico (m),  $k$  la constante de Boltzman (J/K),  $T$  la temperatura absoluta (K),  $\eta$  la viscosidad del disolvente (kg/m·s) y  $D$  el coeficiente de difusión (m<sup>2</sup>/s).

Tras la medida en el equipo DLS de una disolución de cada compuesto final en tampón TRIS, las distribuciones de tamaño obtenidas se representaron gráficamente indicando en el eje vertical de porcentaje de partículas con un determinado diámetro y en el horizontal el diámetro. En las gráficas se muestra la superposición de las cuatro medidas que se realizaron para cada una de las muestras. También se incluyen las figuras de los diagramas de correlación que se utilizan como base para el cálculo de la distribuciones de tamaño mostradas. Una buena media de DLS requiere que los diferentes correlogramas sean superponibles y muestren un aspecto sigmoidal.

En el caso del compuesto SucVal12 en la **Figura 15** se puede observar que el tamaño medio de partícula a una concentración de 4mM es de 160 nm.

La distribución de las partículas del compuesto SucVal6 se representan en la **Figura 16**, donde se puede observar que el tamaño medio de partícula a una concentración de 4mM es de 190 nm.



**Figura 15:** Distribución de tamaño y correlograma de SucVal12

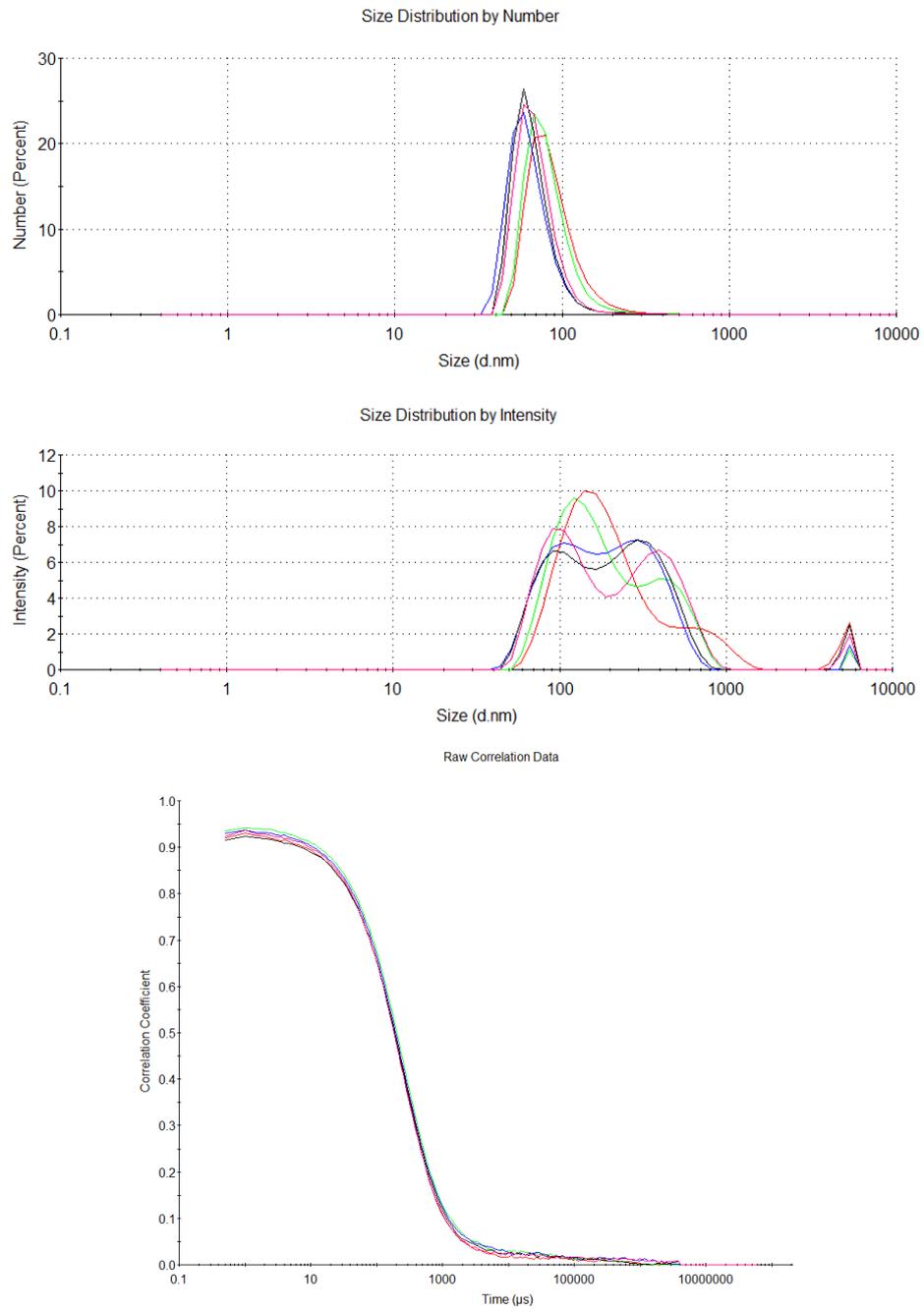
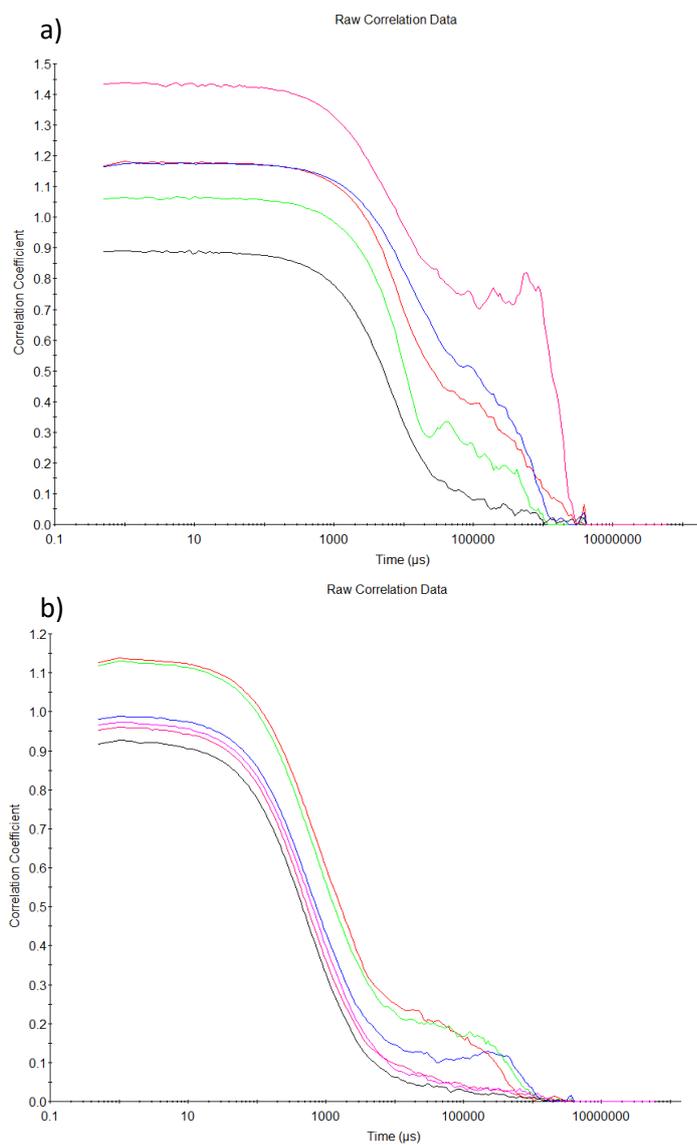


Figura 16: Distribución de tamaño y correlograma de SucVal6

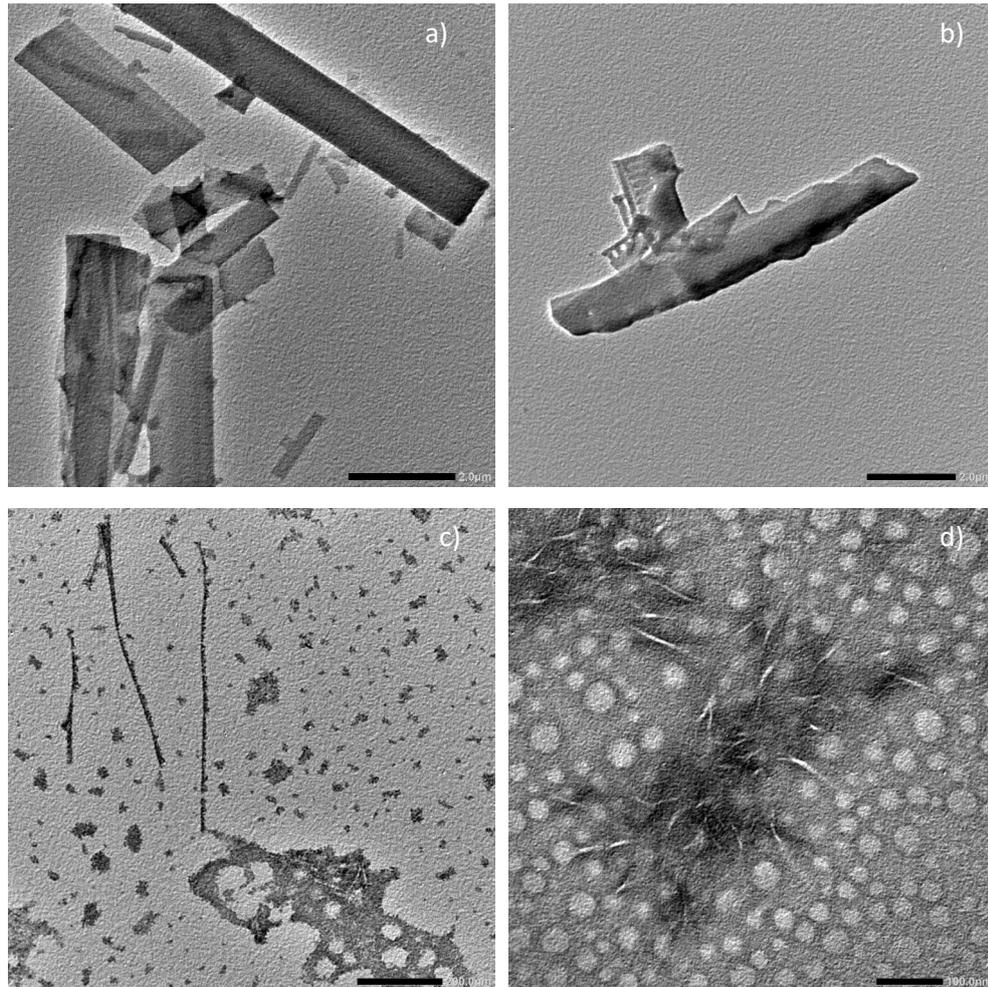
Para los compuestos SucPhe12 y SucPhe6 no se obtuvieron buenos resultados de tamaño medio de partícula lo cual se puede observar en la **Figura 17**, donde se representan los correlogramas de ambos compuestos y se observa una gran dispersidad entre las diferentes medidas, lo que lleva a la conclusión de que ambos compuestos no forman partículas uniformes.



**Figura 17:** Correlogramas de a) SucPhe12, b) SucPhe6

## 3.2.2. TEM

Con la finalidad de observar la morfología de los diferentes agregados, se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se observó que cada compuesto se comportaba de manera muy diferente, lo cual se puede ver en la **Figura 18**, donde el compuesto SucPhe12 crea cristales planos, el compuesto SucPhe6 formas amorfas. Por otro lado, tanto el compuesto SucVal6 como SucVal12 forman vesículas que tienden a unirse, creando fibras.



**Figura 18:** Imágenes TEM de los diferentes compuestos finales, a) SucPhe12, b) SucPhe6, c) SucVal6 y d) SucVal12



## **Conclusiones**



## Conclusiones

- La síntesis de los compuestos bolaanfílicos fue exitosa, obteniéndose productos con estructuras esperadas y rendimientos aceptables.
- La valoración potenciométrica permitió determinar con precisión el pKa de los compuestos sintetizados.
- Los valores obtenidos son consistentes con la estructura y naturaleza de los compuestos ácidos, lo que valida la metodología utilizada.
- Los estudios mediante fluorescencia y DLS mostraron que los compuestos presentan diferentes comportamientos de agregación.
- Los compuestos SucVal6 y SucVal12 formaron vesículas que tienden a unirse creando fibras, mientras que SucPhe6 y SucPhe12 presentaron cristales planos y agregados amorfos, respectivamente.



# **Bibliografía**



## Bibliografía

- (1) Patra, J. K.; Das, G.; Fraceto, L. F.; Campos, E. V. R.; Rodriguez-Torres, M. D. P.; Acosta-Torres, L. S.; Diaz-Torres, L. A.; Grillo, R.; Swamy, M. K.; Sharma, S.; Habtemariam, S.; Shin, H.-S. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16* (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (2) Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- (3) Afzal, O.; Altamimi, A. S. A.; Nadeem, M. S.; Alzarea, S. I.; Almalki, W. H.; Tariq, A.; Mubeen, B.; Murtaza, B. N.; Iftikhar, S.; Riaz, N.; Kazmi, I. Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials* **2022**, *12* (24), 4494. <https://doi.org/10.3390/nano12244494>.
- (4) Lamson, N. G.; Berger, A.; Fein, K. C.; Whitehead, K. A. Anionic Nanoparticles Enable the Oral Delivery of Proteins by Enhancing Intestinal Permeability. *Nat. Biomed. Eng.* **2019**, *4* (1), 84–96. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0465-5>.
- (5) Neves, L. F.; Duan, J.; Voelker, A.; Khanal, A.; McNally, L.; Steinbach-Rankins, J.; Ceresa, B. P. Preparation and Optimisation of Anionic Liposomes for Delivery of Small Peptides and cDNA to Human Corneal Epithelial Cells. *J. Microencapsul.* **2016**, *33* (4), 391–399. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1202343>.
- (6) Çağdaş, M.; Sezer, A. D.; Bucak, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*; Sezer, A. D., Ed.; InTech, 2014. <https://doi.org/10.5772/58459>.
- (7) Pavlović, N.; Goločorbin-Kon, S.; Đanić, M.; Stanimirov, B.; Al-Salami, H.; Stankov, K.; Mikov, M. Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1283. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01283>.
- (8) Haritha P, H.; Lakshmi Pk, L. Probilosomes: A Novel Bile Salt Containing Nanocarrier for Enhancing Oral Bioavailability. *Int. J. Pharm. Investig.* **2020**, *10* (1), 49–53. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2020.1.9>.
- (9) Zafar, A.; Alruwaili, N. K.; Imam, S. S.; Hadal Alotaibi, N.; Alharbi, K. S.; Afzal, M.; Ali, R.; Alshehri, S.; Alzarea, S. I.; Elmowafy, M.; Alhakamy, N. A.; Ibrahim, M. F. Bioactive Apigenin Loaded Oral Nano Bilosomes: Formulation Optimization to Preclinical Assessment. *Saudi Pharm. J.* **2021**, *29* (3), 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.02.003>.
- (10) Nayak, D.; Rathnanand, M.; Tippavajhala, V. K. Unlocking the Potential of Bilosomes and Modified Bilosomes: A Comprehensive Journey into Advanced

- Drug Delivery Trends. *AAPS PharmSciTech* **2023**, *24* (8), 238. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02696-4>.
- (11) Kumar, G. P.; Rajeshwarrao, P. Nonionic Surfactant Vesicular Systems for Effective Drug Delivery—an Overview. *Acta Pharm. Sin. B* **2011**, *1* (4), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.09.002>.
- (12) Sood, A.; Gupta, A.; Agrawal, G. Recent Advances in Polysaccharides Based Biomaterials for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* **2021**, *2*. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100067>.
- (13) Navarro-Barreda, D.; Bedrina, B.; Galindo, F.; Miravet, J. F. Glutathione-Responsive Molecular Nanoparticles from a Dianionic Bolaamphiphile and Their Use as Carriers for Targeted Delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2022**, *608*, 2009–2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.10.142>.
- (14) Hughes, J. R.; Miller, A. S.; Wallace, C. E.; Vemuri, G. N.; Iovine, P. M. Biomedically Relevant Applications of Bolaamphiphiles and Bolaamphiphile-Containing Materials. *Front. Chem.* **2021**, *8*, 604151. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.604151>.

# **Sección Experimental**



## Sección Experimental

### 6.1. Métodos Generales

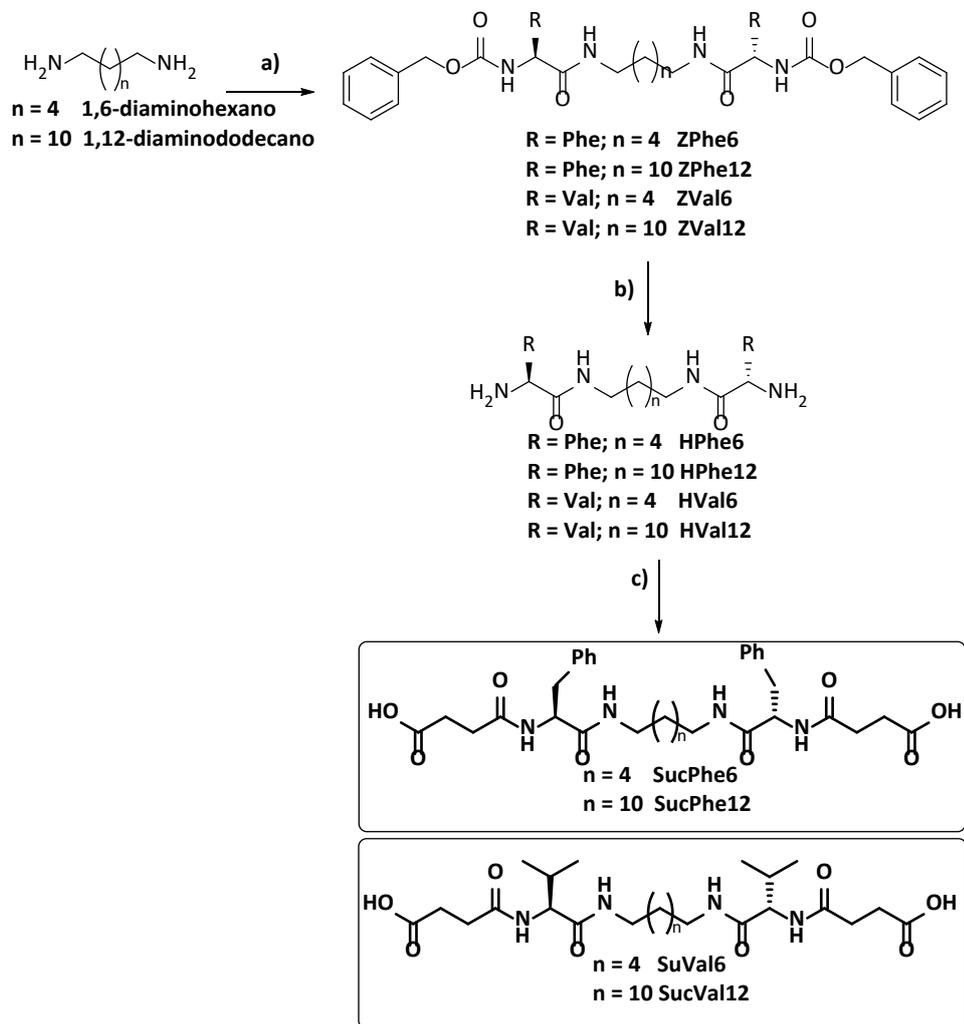
Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  fueron realizados con un espectrómetro Bruker Avance III HD 400 MHz y HD 300 MHz, así como un espectrómetro Agilent INOVA System 500 MHz, empleando dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente a una temperatura de 30°C. Las señales del disolvente deuterado (DMSO- $d_6$ ) que se toman como referencia son, el singulete de 2.50 ppm y el septuplete que aparece a 39.52 ppm, de los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Las señales fueron asignadas con la ayuda de métodos 2D (COSY y HSQC).

El espectro de masas se obtuvo mediante *Mass Spectrometry triple Quadrupole Q-TOF Premier* con Electrospray y APCI acoplados (ESMS).

Las reacciones que requerían atmósfera inerte se llevaron a cabo bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$ . Los reactivos disponibles comercialmente fueron utilizados tal como fueron recibidos, sin ninguna purificación adicional.

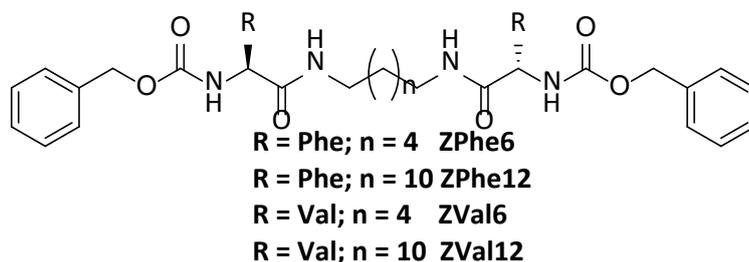
Las propiedades de fluorescencia se determinaron utilizando un fluorómetro JASCO FP-8300, el cual estaba equipado con un accesorio Peltier. Las mediciones se realizaron a temperatura controlada de 25 °C para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados.

## 6.2. Procedimiento experimental para la síntesis de compuestos ácidos



**Esquema 4:** Reactivos y condiciones: a) ZPheOH o ZValOH, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 66%; b)  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, t.a., 3 – 6h, 76%; c) Anhídrido succínico,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , THF, t.a., 16 h, 84 %.

## 6.2.1. Acoplamiento del L-aminoácido Z protegido con la diamina



A una disolución de la diamina comercial (1,6-diamino hexano o 1,12-diamino dodecano) (2 mmol) en cloroformo (120 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se le añadió secuencialmente: el L-aminoácido Z protegido comercial (ZValOH o ZPheOH), el TBTU (5 mmol, 2.1 eq.) y la DIPEA (5 mmol, 2.1 eq.). La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el disolvente de la mezcla se eliminó bajo presión reducida y el residuo crudo se lavó primero con HCl 0.1 M (200 mL), luego con NaOH (200 mL), se realiza un tercer lavado con salmuera (200mL) y finalmente con agua destilada (100 mL). El sólido obtenido se secó en estufa de vacío durante 16 h a 50°C.

Dibenzyl ((2*S*,2'*S*)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate (**ZVal6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 47%):

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.87 (s, 1H), 7.44 – 7.25 (m, 5H), 7.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.11 – 4.91 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.00 (ddd, *J* = 66.8, 33.4, 27.3 Hz, 2H), 1.92 (dd, *J* = 13.3, 6.5 Hz, 1H), 1.30 (d, *J* = 51.6 Hz, 4H), 0.81 (t, *J* = 16.1 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 171.4, 156.5 (C=O), 137.6 (C), 128.8 (x2), 128.2 (x2), 128.1 (CH), 65.8 (CH<sub>2</sub>), 60.9 (CH), 38.8, 30.7, 29.4, 26.5 (CH<sub>2</sub>), 19.7, 18.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 583.3496; found: 583.3497 [M + H<sup>+</sup>].

Dibenzyl ((2*S*,2'*S*)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate (**ZVal12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 44%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 7.85 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.32 (dt, *J* = 11.0, 4.4 Hz, 5H), 7.19 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.87 – 3.68 (m, 1H), 3.20 – 2.88 (m, 2H), 1.91 (dq, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 1.29 (d, *J* = 44.0 Hz, 10H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 170.9, 156.1 (C=O), 137.1 (C), 128.3 (x2), 127.7 (x2), 127.6 (CH), 65.3 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH), 38.4, 30.2, 29.0, 28.7, 26.3 (CH<sub>2</sub>), 19.2, 18.3 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 667.4435; found: 667.4431 [M + H<sup>+</sup>].

Dibenzyl ((2*S*,2'*S*)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate (**ZPhe6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 75%):

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 7.96 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.14 (m, 10H), 4.94 (s, 1H), 4.25 – 4.14 (m, 1H), 3.03 (dd, *J* = 14.4, 7.0 Hz, 1H), 2.97 – 2.71 (m, 2H), 1.33 (s, 2H), 1.18 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 171.1, 155.7 (C=O), 138.1, 137.0 (C), 129.1 (x2), 128.2 (x2), 128.0 (x2), 127.7(x2), 127.5, 127.4 (CH), 65.1 (CH<sub>2</sub>), 56.3 (CH), 38.4, 37.7, 28.90, 26.0 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 679.3496; found: 679.3498 [M + H<sup>+</sup>].

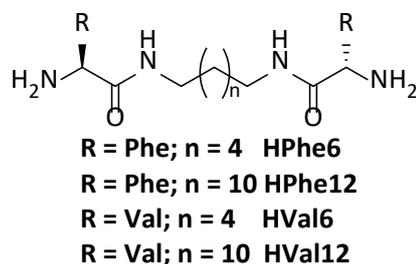
Dibenzyl ((2*S*,2'*S*)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate (**ZPhe12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 98%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 7.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.14 (m, 10H), 4.94 (s, 2H), 4.19 (td, *J* = 9.3, 4.8 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 10.5, 5.9 Hz, 1H), 2.96 – 2.70 (m, 1H), 1.34 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.22 (s, 8H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 171.1, 155.7 (C=O), 138.1, 137.1 (C), 129.2 (x2), 128.3 (x2), 128.0 (x2), 127.6 (x2), 127.4, 126.2 (CH), 65.1 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH), 38.5, 37.8, 29.0, 28.9, 28.7, 26.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>46</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: 763.4436; found: 763.4435 [M + H<sup>+</sup>].

## 6.2.2. Desprotección del grupo Z



Se pesaron 200 mg del catalizador de Pd/C (10% en peso) y el compuesto Z-amino protegido (**ZVal6**, **ZVal12**, **ZPhe6** o **ZPhe12**). Seguidamente, fueron suspendidos en MeOH (50 mL) y se agitaron bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. La mezcla de reacción fue luego filtrada a través de Celite®, y el solvente fue removido bajo presión reducida para obtener la amina respectiva.

(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide) (**HVal6**): Se obtuvo una cera beige (rendimiento 83%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7.80 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.05 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.91 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.89 – 1.77 (m, 1H), 1.42 – 1.34 (m, 2H), 1.26 (q, *J* = 3.5 Hz, 2H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6):** δ 174.6 (C=O), 60.5 (C), 38.6 (CH<sub>2</sub>), 32.1 (CH), 29.6, 26.6 (CH<sub>2</sub>), 20.0, 17.7 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 337.2103; found: 337.2100 [M + Na<sup>+</sup>].

(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide) (**HVal12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 82%):

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7.74 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.04 (m, *J* = 13.1, 6.8 Hz, 2H), 2.88 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.82 (m, *J* = 6.9, 5.2 Hz, 1H), 1.39 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.23 (s, 9H), 0.85 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6):** δ 174.3 (C=O), 60.06 (C), 38.2 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (C), 29.2, 29.0 (x2), 28.7, 26.3 (CH<sub>2</sub>), 19.5, 17.1 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for C<sub>22</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 399.3698; found: 399.3702 [M + H<sup>+</sup>].

(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide) (**HPhe6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 77%):

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7.83 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.29 – 7.13 (m, 5H), 3.01 (m, *J* = 12.9, 6.7 Hz, 2H), 2.92 – 2.59 (m, 2H), 1.31 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.20 – 1.06 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6):** δ 173.8 (C=O), 138.6 (C), 129.2 (x2), 128.0 (x2), 126.0 (CH), 56.2 (C), 41.1, 38.2, 29.0, 26.0 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 411.3760; found: 411.2765 [M + H<sup>+</sup>].

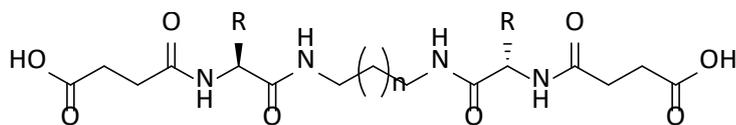
(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide) (**HPhe12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 64%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7.74 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.34 – 7.09 (m, 5H), 3.45 – 3.35 (1H, multiplicidad no calculada debido a que solapa con señal del agua), 2.97 (tdd, *J* = 18.7, 13.2, 6.2 Hz, 3H), 2.60 (dd, *J* = 13.3, 7.9 Hz, 1H), 1.60 (s, 2H), 1.40 – 1.07 (m, 10H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6):** δ 174.0 (C=O), 138.8 (C), 129.3 (x2), 128.0 (x2), 126.0, 56.32 (CH), 41.3, 38.3, 29.1, 29.0, 28.8, 26.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 495.3699; found: 495.33699 [M + H<sup>+</sup>].

## 6.2.3. Obtención de los compuestos finales



**R = Phe; n = 4 SucPhe6**

**R = Phe; n = 10 SucPhe12**

**R = Val; n = 4 SucVal6**

**R = Val; n = 10 SucVal12**

Una solución de la amina respectiva (1 mmol, **HVal6**, **HVal12**, **HPhe6** o **HPhe12**) en THF (60 mL) fue tratada a temperatura ambiente bajo  $N_2$  con  $K_2CO_3$  sólido (10 mmol, 7 eq.), luego se añadió gota a gota una solución de anhídrido succínico comercialmente disponible (6 mmol, 4 eq.) en THF (40 mL) con un embudo de adición. La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la solución se concentró bajo presión reducida y el residuo crudo se disolvió en agua (100 mL); luego se agregó ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta observar la formación de un precipitado blanco para alcanzar un pH de 4. El sólido blanco obtenido se filtró bajo vacío, y el residuo se lavó con agua (30 mL). El compuesto se secó bajo presión reducida a 50 °C durante la noche.

(6*S*,17*S*)-6,17-diisopropyl-4,7,16,19-tetraoxo-5,8,15,18-tetraazadocosanedioic acid (**SucVal6**): Se obtuvo una cera beige (rendimiento 98%):

**$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12.13 (s, 1H), 7.88 (dd,  $J = 10.4, 5.4$  Hz, 4H), 4.08 (dd,  $J = 9.0, 6.9$  Hz, 1H), 3.14 – 2.89 (m, 2H), 2.48 – 2.32 (m, 2H), 2.02 - 1.92 (m, 2H), 1.41 – 1.20 (m, 4H), 0.87 – 0.78 (m, 4H).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  173.5, 171.0, 170.7 (C=O), 57.8 (C), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 30.4 (CH), 29.9, 29.2, 28.8, 26.0, 19.2, 18.1 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: 573.3924; found: 513.2927 [M – H<sup>-</sup>].

(6S,23S)-6,23-diisopropyl-4,7,22,25-tetraoxo-5,8,21,24-tetrazaooctacosanedioic acid (**SucVal12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 89%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 7.92 – 7.82 (m, 2H), 4.07 (dt, *J* = 9.1, 6.8 Hz, 1H), 3.17 – 2.87 (m, 2H), 2.50 – 2.32 (m, 4H), 1.93 (m, 1H), 1.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.23 (s, 9H), 0.87 – 0.67 (m, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 174.4, 171.5, 171.2 (C=O), 58.3 (CH), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 30.9 (CH), 30.4, 29.8, 29.5 (x2), 29.3, 29.2, 26.8 (CH<sub>2</sub>), 19.7, 18.6 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: 597.3863; found: 597.3868 [M – H<sup>-</sup>].

(6S,17S)-6,17-dibenzyl-4,7,16,19-tetraoxo-5,8,15,18-tetraazadocosanedioic acid (**SucPhe6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 67%):

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.11 (m, 5H), 4.40 (m, *J* = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 3.13 – 2.95 (m, 2H), 2.74 (dd, *J* = 13.6, 9.2 Hz, 1H), 2.35 – 2.13 (m, 5H), 1.30 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 174.1, 171.0, 170.7 (C=O), 138.1 (C), 129.1 (x2), 128.0 (x2), 126.1 (CH), 54.2 (C), 38.5, 37.7, 30.1, 29.3, 28.9, 26.0 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: 609.2931; found: 609.3210 [M + H<sup>-</sup>].

(6S,23S)-6,23-dibenzyl-4,7,22,25-tetraoxo-5,8,21,24-tetrazaooctacosanedioic acid (**SucPhe12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 83%):

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.21 (dq, *J* = 17.1, 8.2 Hz, 5H), 4.42 (dd, *J* = 8.7, 5.6 Hz, 1H), 3.09 – 3.00 (m, 1H), 2.98 – 2.69 (m, 3H), 2.38 – 2.23 (m, 4H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.22 (s, 5H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*6)**: δ 173.85, 170.82, 170.70 (C=O), 137.97 (C), 129.09 (x2), 128.0 (x2), 126.2 (CH), 54.1 (C), 38.5, 37.9, 30.0, 29.9, 29.1 (x2), 28.8, 28.7, 26.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS**: *m/z*: calcd for C<sub>38</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: 693.3863; found: 693.3862 [M – H<sup>-</sup>].

### 6.3. Determinación del $pK_a$

Las valoraciones potenciométricas para determinar constante ácido-base se llevaron a cabo a 298 K. En un experimento típico, se valoraron 7 mL de solución básica del derivado del diácido correspondiente (20 mg) en NaOH (0.05 M) con una disolución normalizada de HCl 0.1 M disponible comercialmente y agitando vigorosamente. El ácido se añadió con una bomba de jeringa NE-300 "Just Infusion" TM (0,033 mL/min, diámetro interior 14.57 mm) utilizando una jeringa de 10 mL de SGE Analytical Science que tenía conectada una aguja de acero inoxidable cono Luer Lock 0,7 mm x 300 mm. El pH se monitorizó cada ocho segundos (en un pHmetro S220 Seven Compact, Mettler Toledo).

Las constantes termodinámicas para las especies en solución se pudieron calcular con HYPERQUAD utilizando datos de titulación previos al inicio de la agregación experimental. Para evaluar el producto de solubilidad de los derivados de ácidos, la valoración se detuvo cuando se observó un precipitado sólido. Luego, el producto de solubilidad se calculó iterativamente con HYSS2009, ajustando su valor para que coincidiera con el pH calculado y experimental.

### 6.4. Preparación general de las muestras

Se evaporaron 224, 160, 160 y 28  $\mu$ L de soluciones madre de mm, 4,4, 4 y 0.5 mM de SucVal6, SucPhe6, SucVal12 y SucPhe12 respectivamente en MeOH en viales por separado a bajo vacío. Los sólidos resultantes se resuspendieron luego en 2 mL de una disolución tampón de Tris 0.1 M (para DLS y TEM, el tampón se filtró a través de un filtro de malla de acetato de celulosa de 0.45  $\mu$ m). La mezcla se sonicó durante aproximadamente 15 minutos hasta obtener una solución.

### 6.5. Concentración crítica de agregación por Nile Red (NR)

La concentración crítica de agregación se determinó por fluorescencia utilizando NR como sonda. Se prepararon diversas concentraciones de cada compuesto (desde 0.0125 hasta 4 mM para SucVal6; desde 0.0125 hasta 4 mM para SucVal12; desde 0.0125 hasta 4 mM para SucPhe6; desde 0.0125 hasta 4 mM para SucPhe12) evaporando la cantidad deseada del compuesto de las soluciones madre en metanol, junto con 200  $\mu$ L de una solución stock de NR de 20  $\mu$ M en etanol. La

mezcla se disolvió luego en 2 mL de tampón Tris 0.1M y se sonicó durante aproximadamente cinco minutos. Las soluciones de NR se excitaban a 495 nm, y el espectro de emisión se registraba de 515 nm a 750 nm. La relación de intensidad del pico (yyy nm) se representó frente a las concentraciones de diácidos usados.

## **6.6. TEM**

Las imágenes de transmisión electrónica fueron obtenidas usando un microscopio JEOL 2100 con pistola termoiónica LaB6 200 kV y equipado con una cámara CCD de alta resolución Gatan Orius. Las muestras de TEM fueron preparadas sobre gradillas de cobre *Formvar/Carbon film on 200 mesh*. Una gota de disolución con nanopartículas fue aplicada directamente sobre la gradilla, dejando reposar un minuto. Seguidamente, el exceso de agua fue cuidadosamente removido por capilaridad usando un trozo de papel de filtro. Finalmente, para tinter las muestras, se puso una gota de acetato de uranilo al 1% en agua sobre la gradilla durante dos minutos, el exceso de tinte fue igualmente removido por capilaridad con papel de filtro y se secaron al aire antes de la observación.

## **6.7. DLS (*Dynamic light scattering*).**

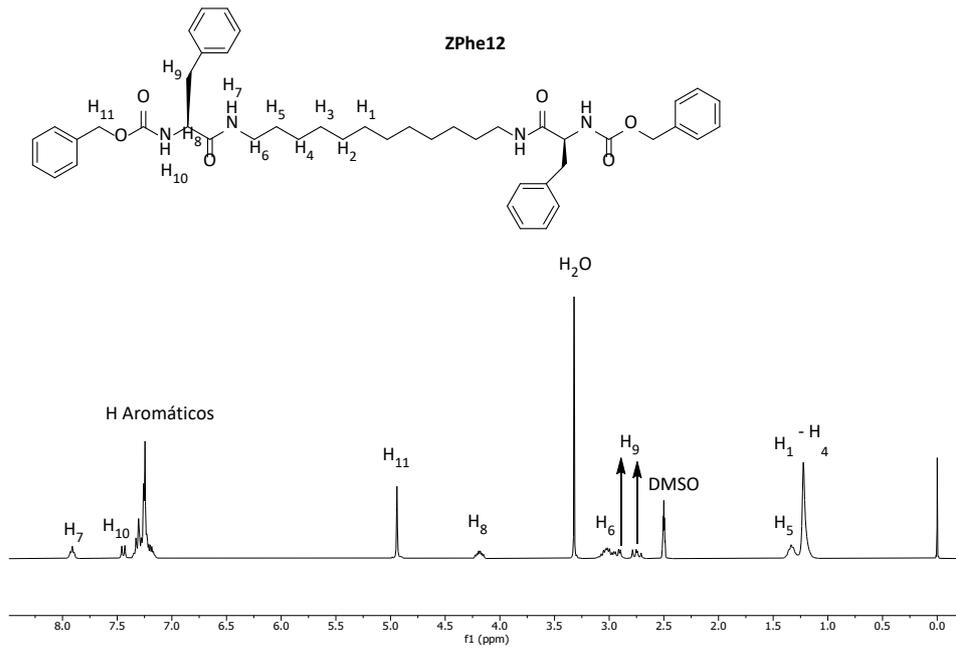
Las medidas de tamaño de las nanopartículas se realizaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), se usó un Zetasizer Nano ZS (Malvern). Los análisis se llevaron a cabo usando un láser de He-Ne laser (633 nm) con un ángulo de dispersión de 1731. Se usó el modo de optimización y atenuación automática para todas las muestras, las medidas de las suspensiones de nanopartículas se hicieron con cubetas de plástico óptico (PMMA), marca Hellma Analytics de 3 mL de capacidad y 10 mm de paso óptico. Todas las lecturas se realizaron a 25°C. El tamaño de la partícula se reportó como un promedio de seis mediciones.

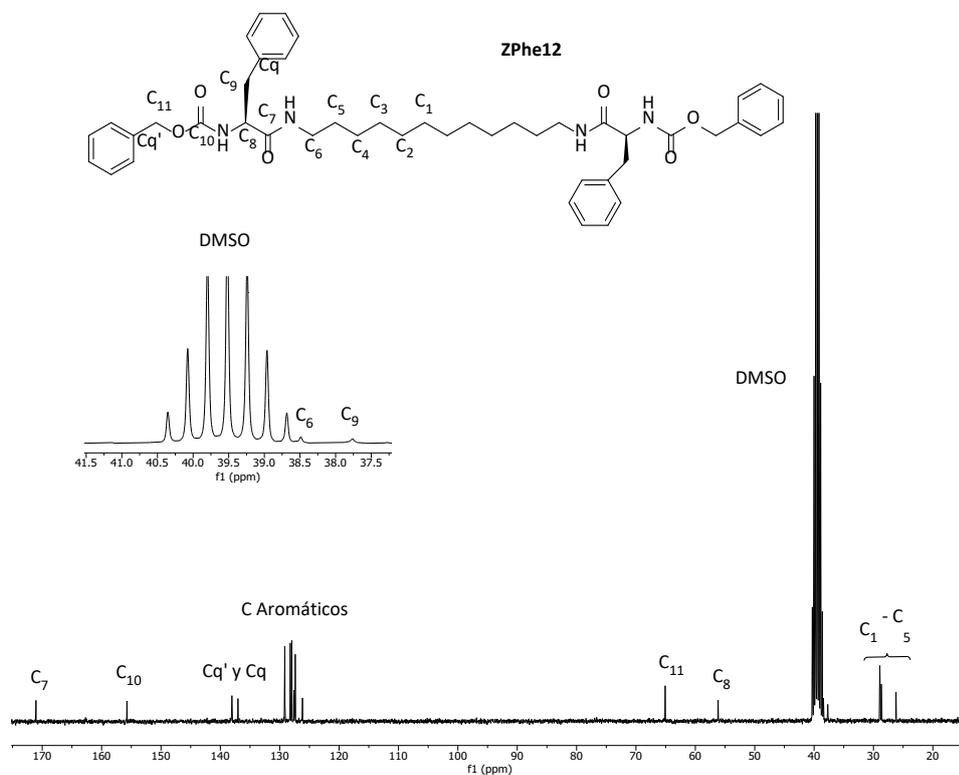
**ANEXO**



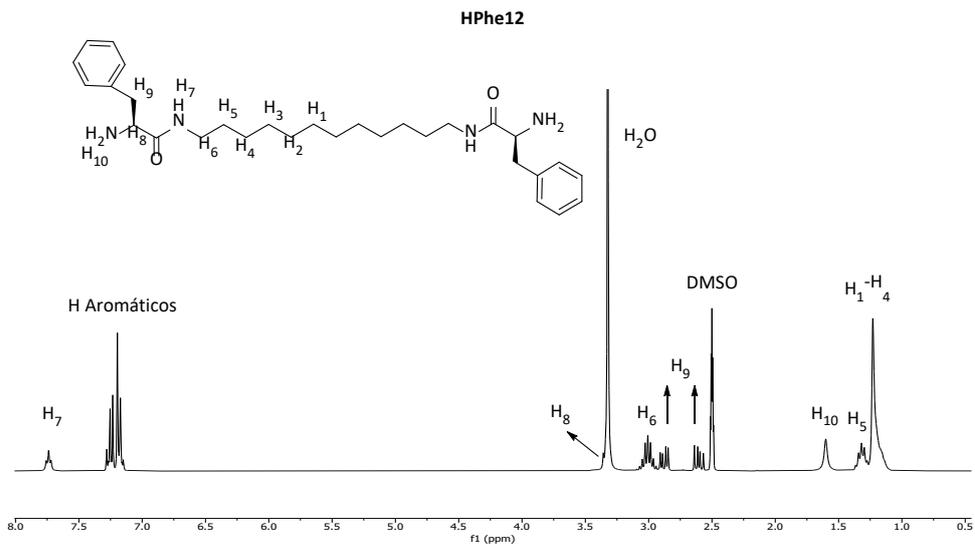
## Anexo

## 7.1. Espectros RMN

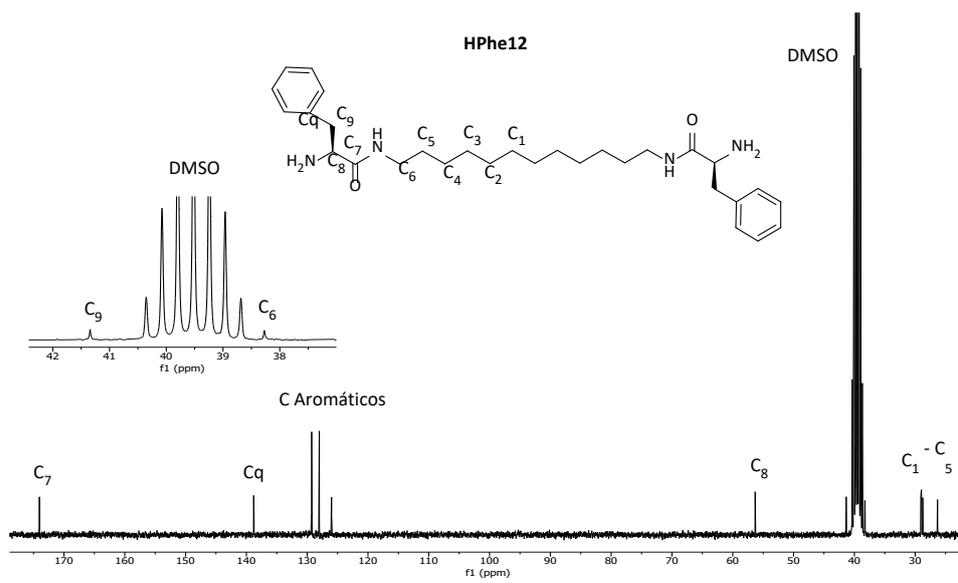
Figura 19: Espectro  $^1\text{H}$  RMN ZPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$



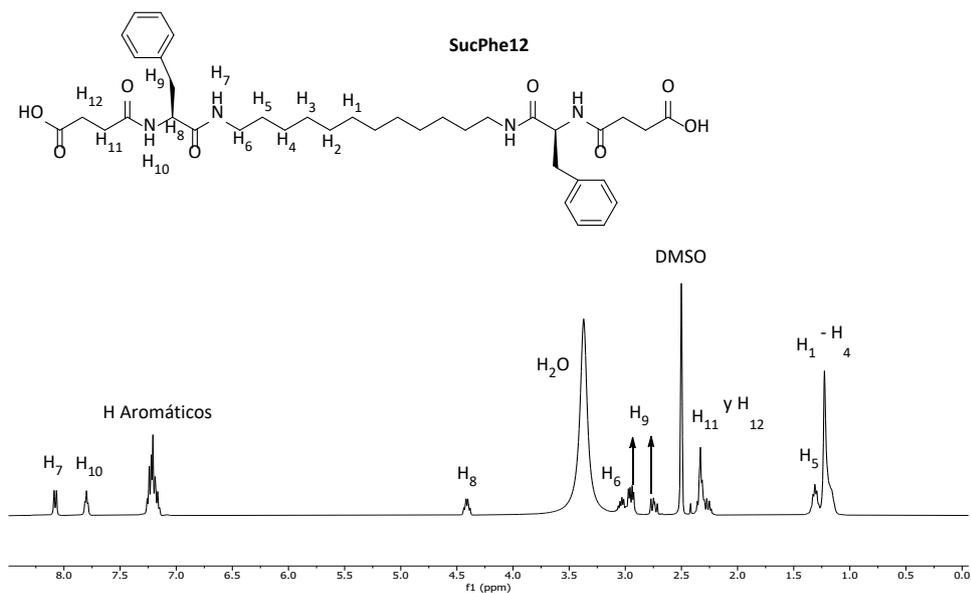
**Figura 20:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN ZPhe12 en DMSO- $d_6$  con la zona del disolvente deuterado ampliada



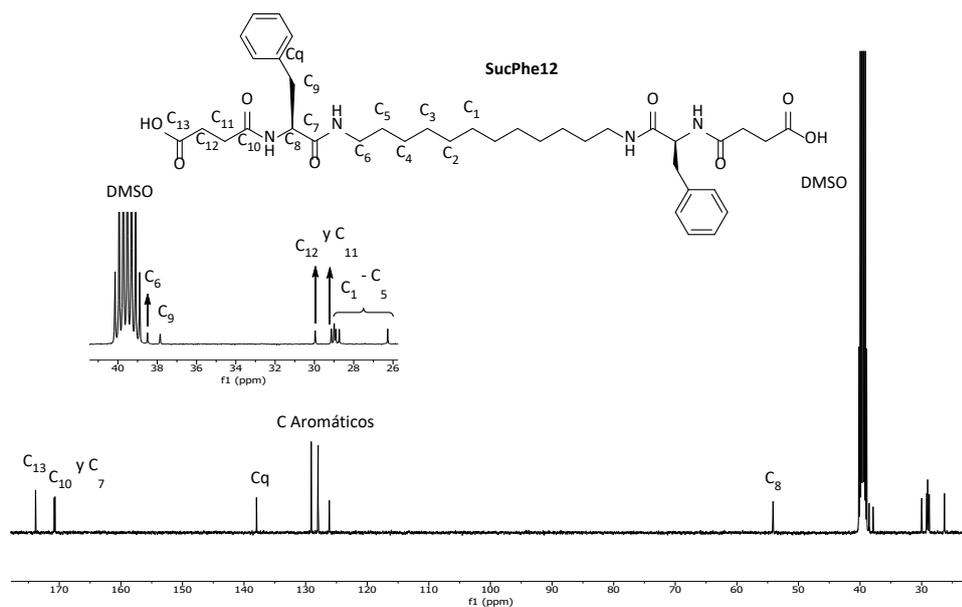
**Figura 21:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN HPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$



**Figura 22:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$  con la zona del disolvente deuterado ampliada



**Figura 23:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN SucPhe12 en DMSO- $d_6$



**Figura 24:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN SucPhe12 en DMSO- $d_6$  con la zona del disolvente deuterado, carbonos alifáticos y carbonilo ampliada

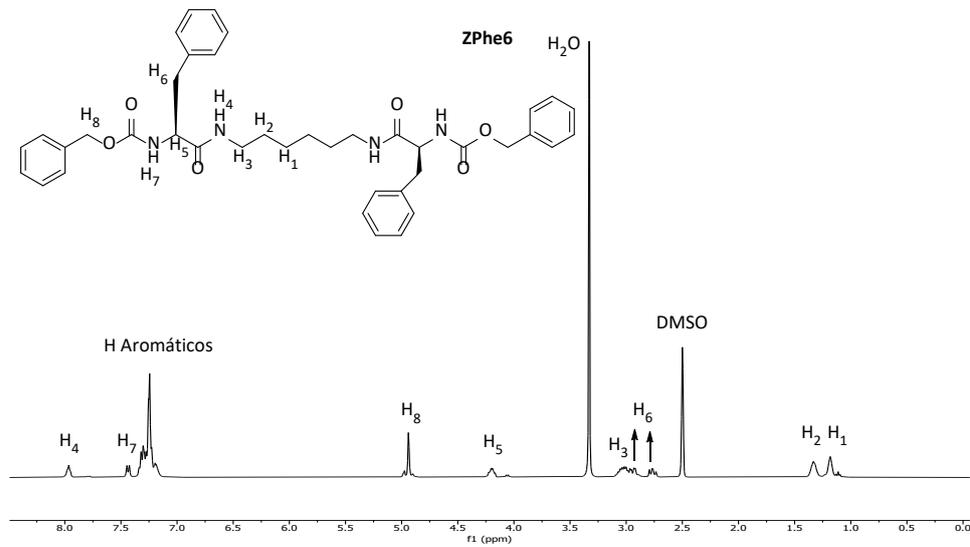


Figura 25: Espectro <sup>1</sup>H RMN ZPhe6 en DMSO-*d*<sub>6</sub>

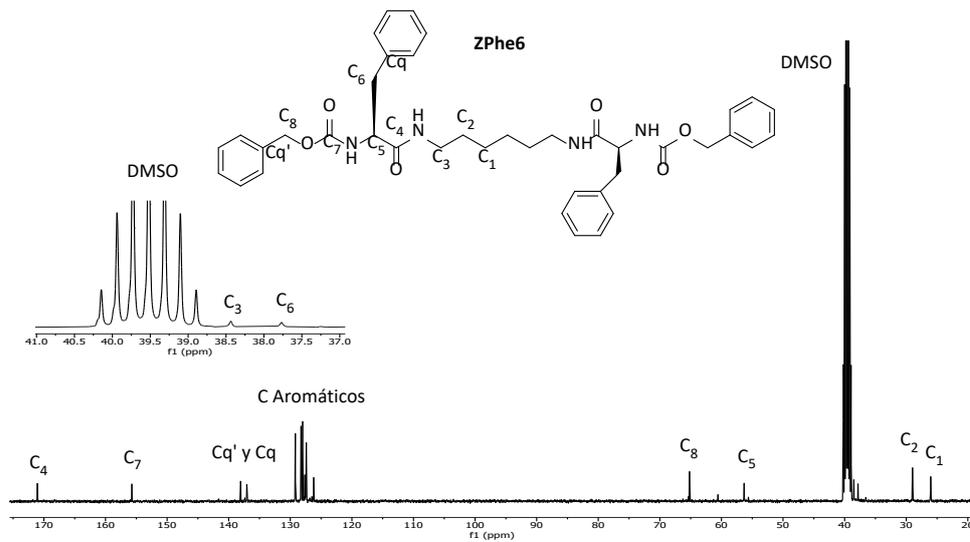
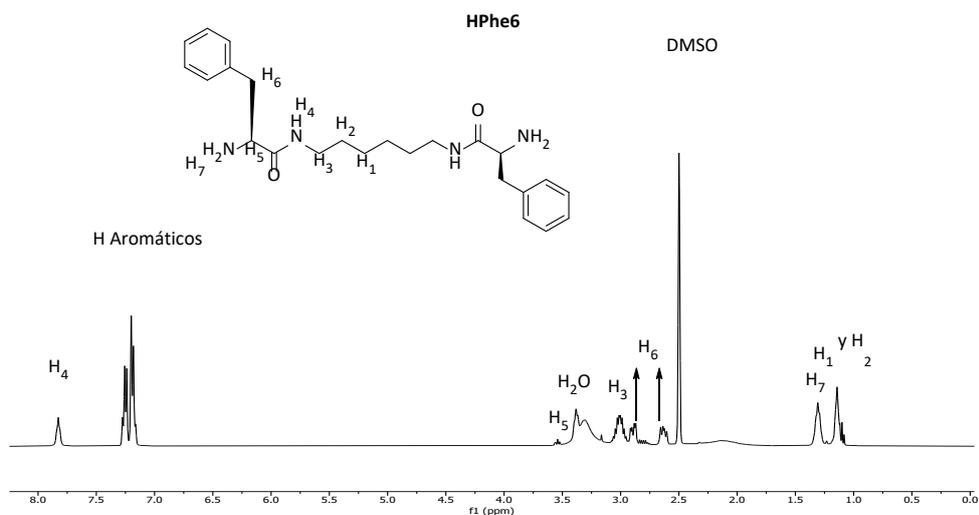
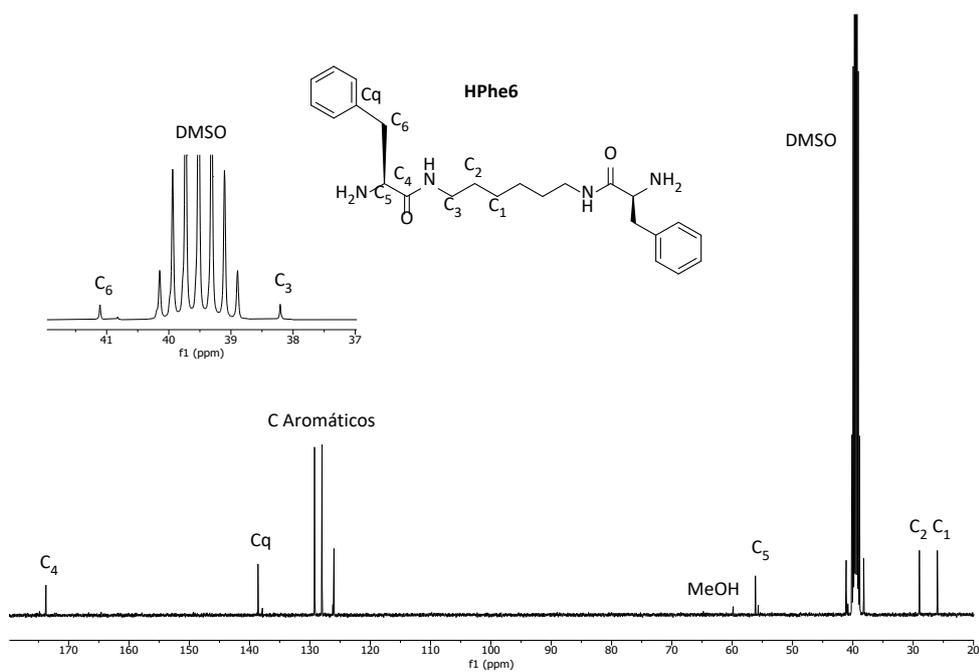


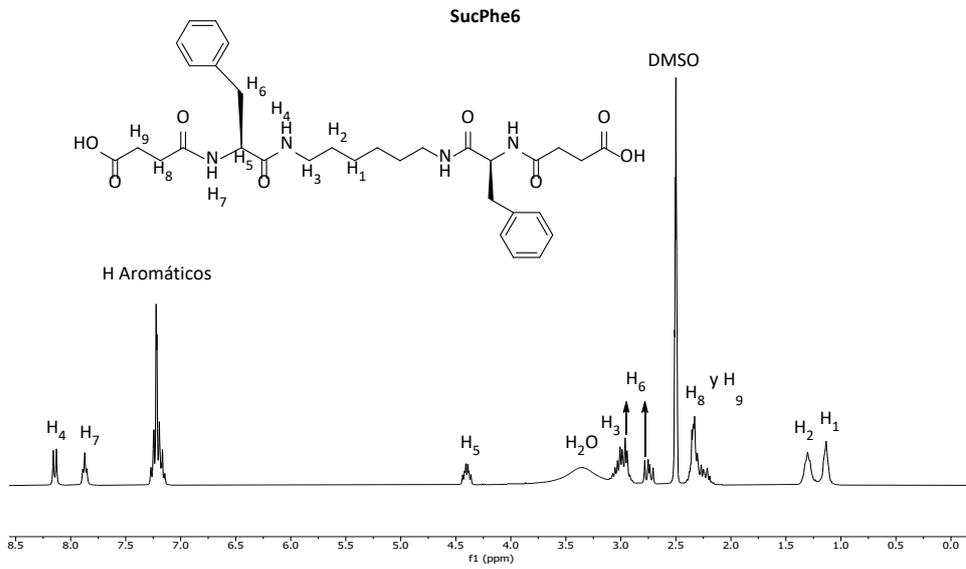
Figura 26: Espectro <sup>13</sup>C RMN ZPhe6 en DMSO-*d*<sub>6</sub> con la zona del disolvente deuterado ampliada



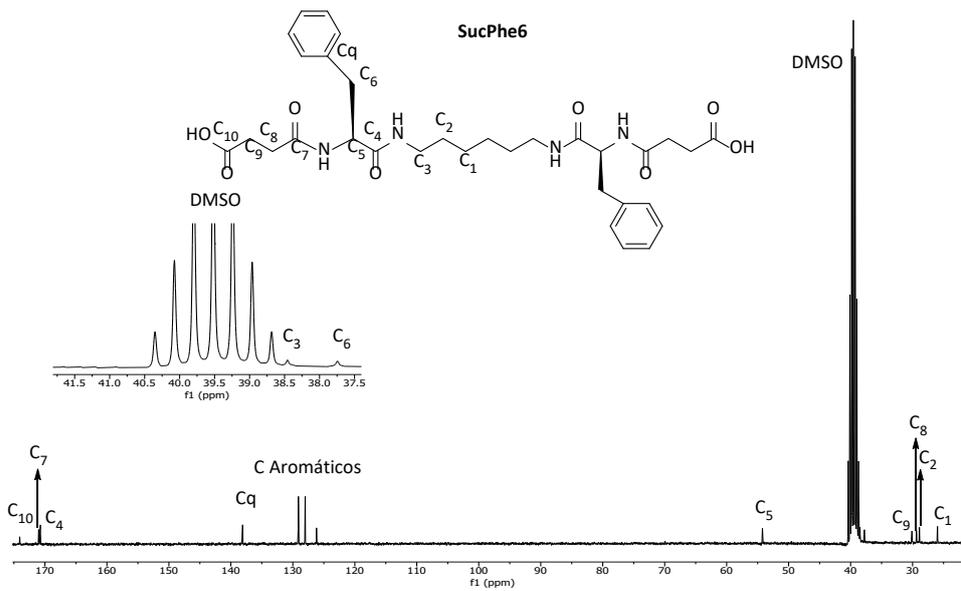
**Figura 27:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN HPhe6 en DMSO- $d_6$



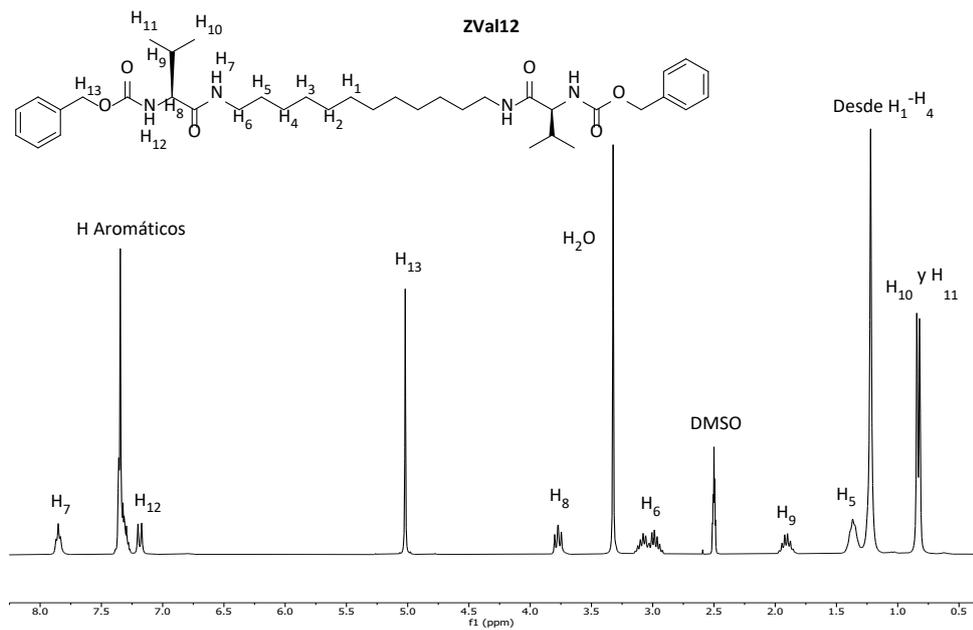
**Figura 28:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HPhe6 en DMSO- $d_6$  con la zona del disolvente deuterado ampliada



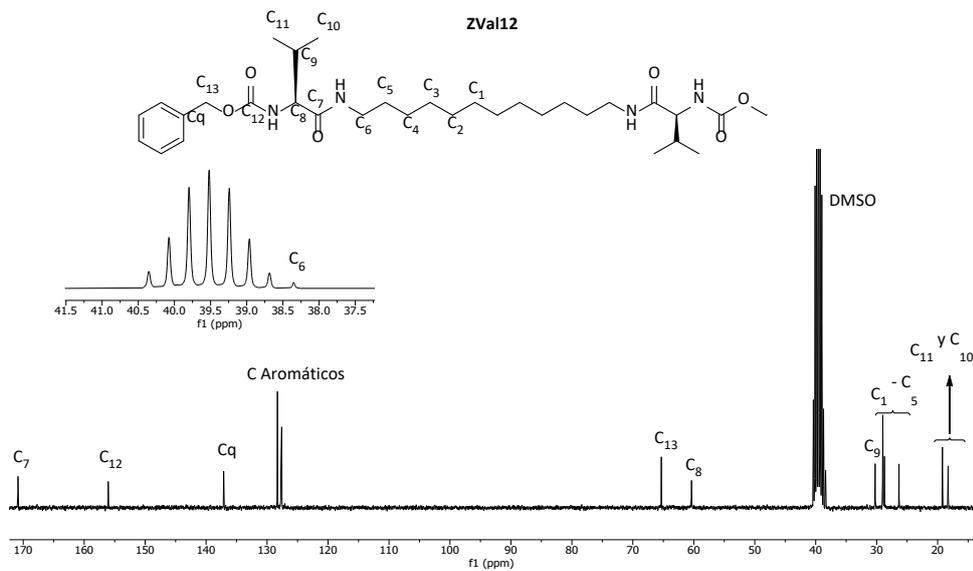
**Figura 29:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN SucPhe6 en DMSO- $d_6$



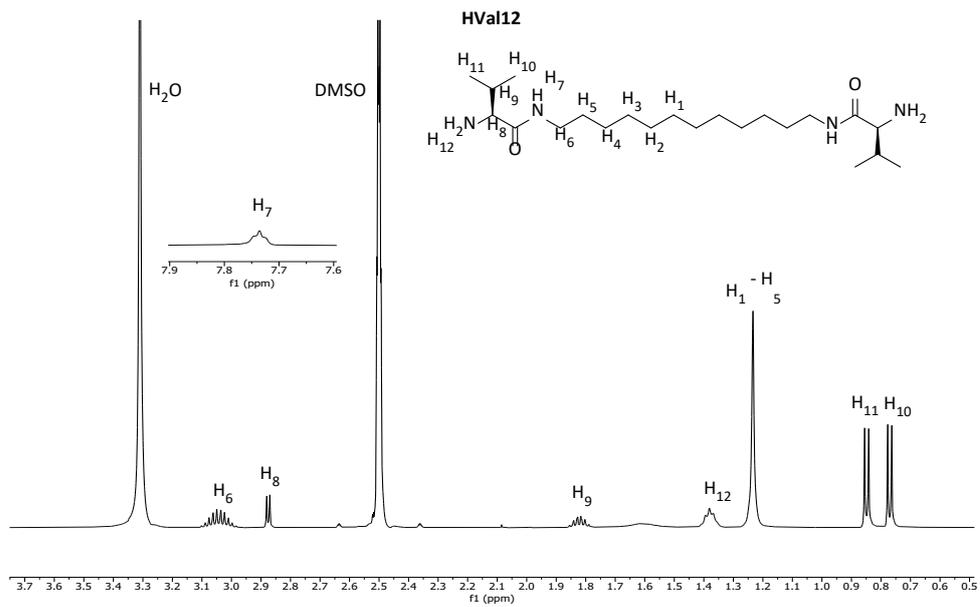
**Figura 30:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HPhe6 en DMSO- $d_6$  con la zona del disolvente deuterado ampliada



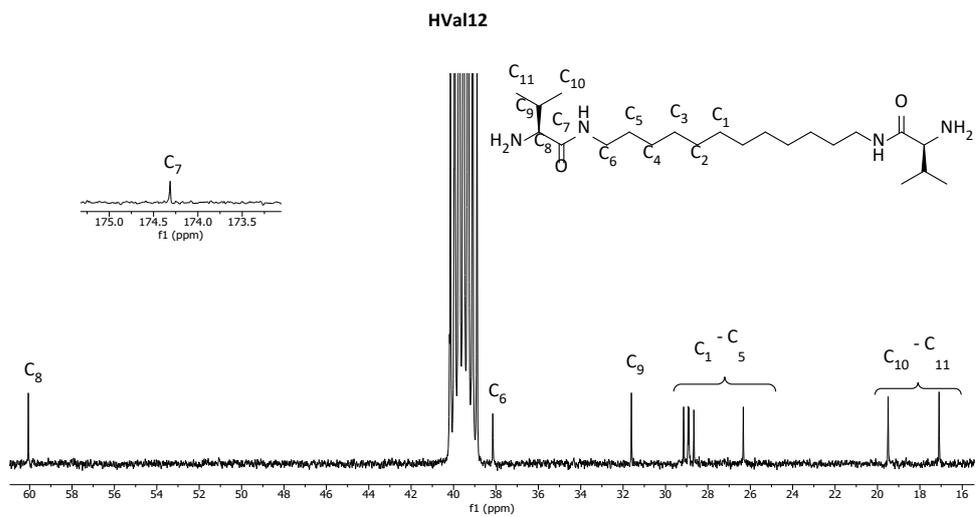
**Figura 31:** Espectro <sup>1</sup>H RMN ZVal12 en DMSO-d<sub>6</sub>



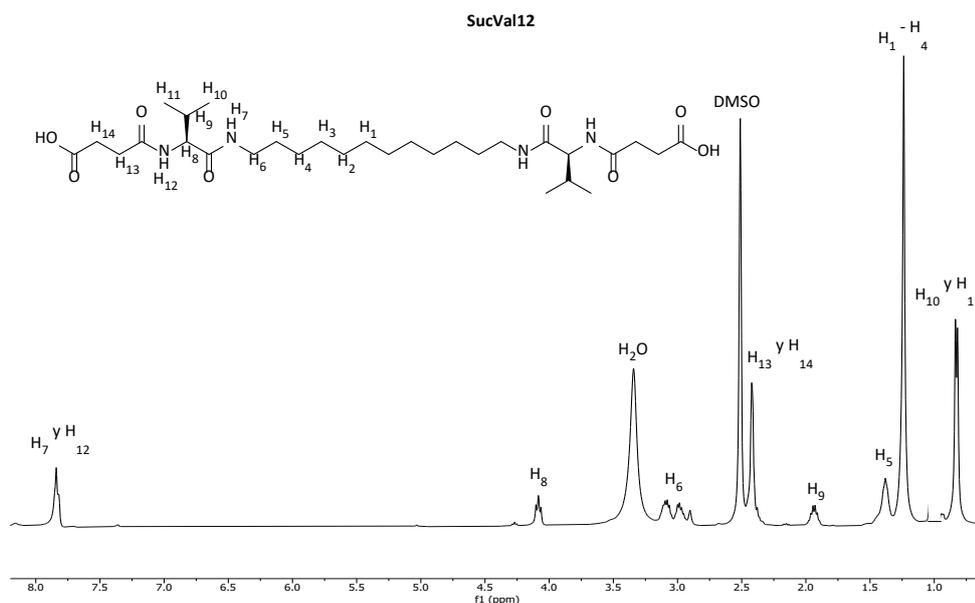
**Figura 32:** Espectro <sup>13</sup>C RMN ZVal12 en DMSO-d<sub>6</sub> con la zona del disolvente deuterado ampliada



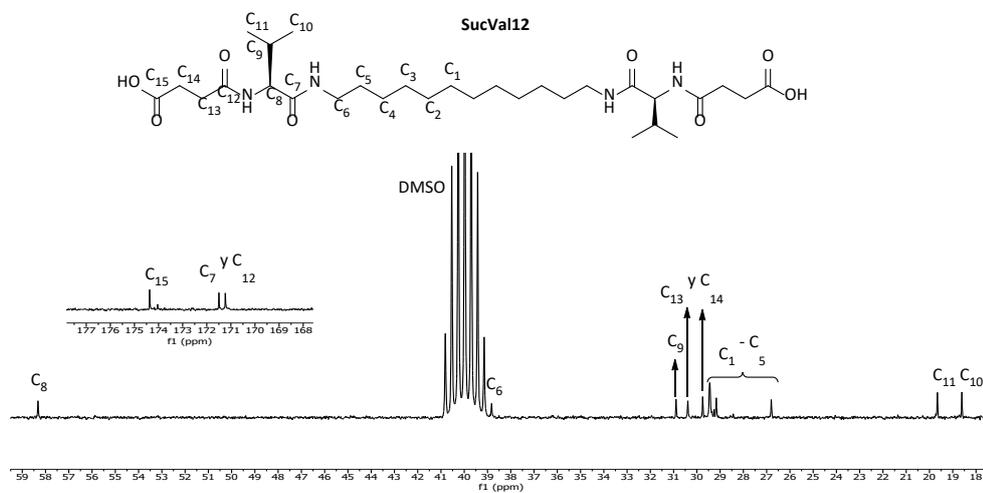
**Figura 33:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN HVal12 en DMSO- $d_6$



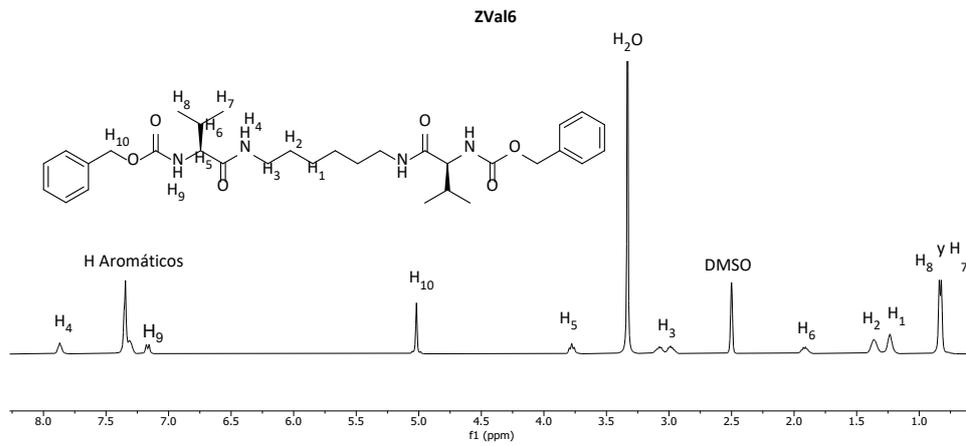
**Figura 34:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HVal12 en DMSO- $d_6$  con la zona de la amida ampliada



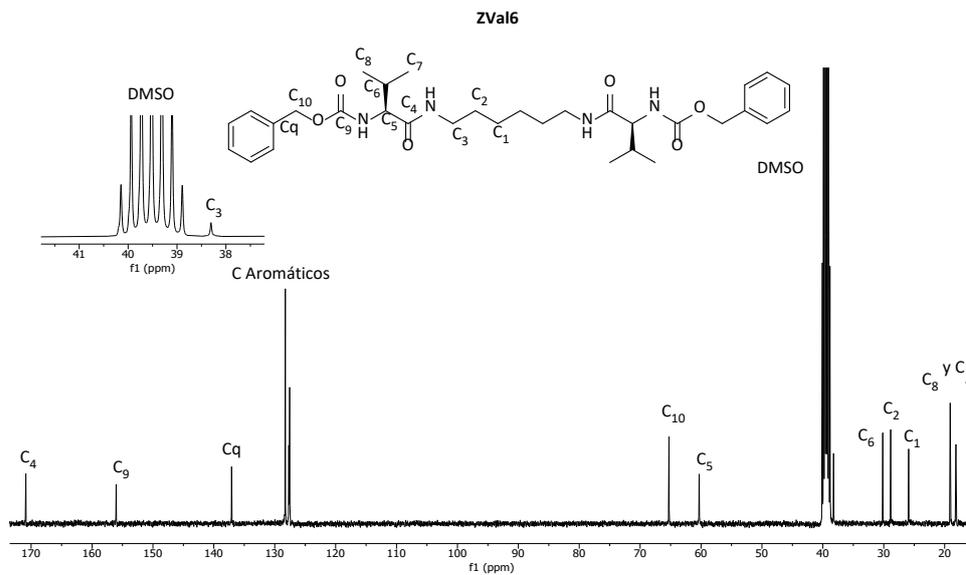
**Figura 35:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN SucVal12 en  $\text{DMSO-}d_6$



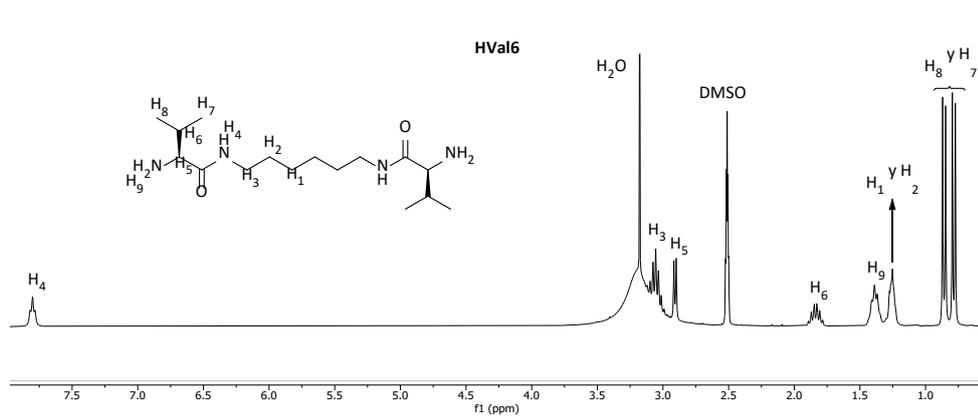
**Figura 36:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN SucVal12 en  $\text{DMSO-}d_6$  con la zona de los carbonilos ampliada



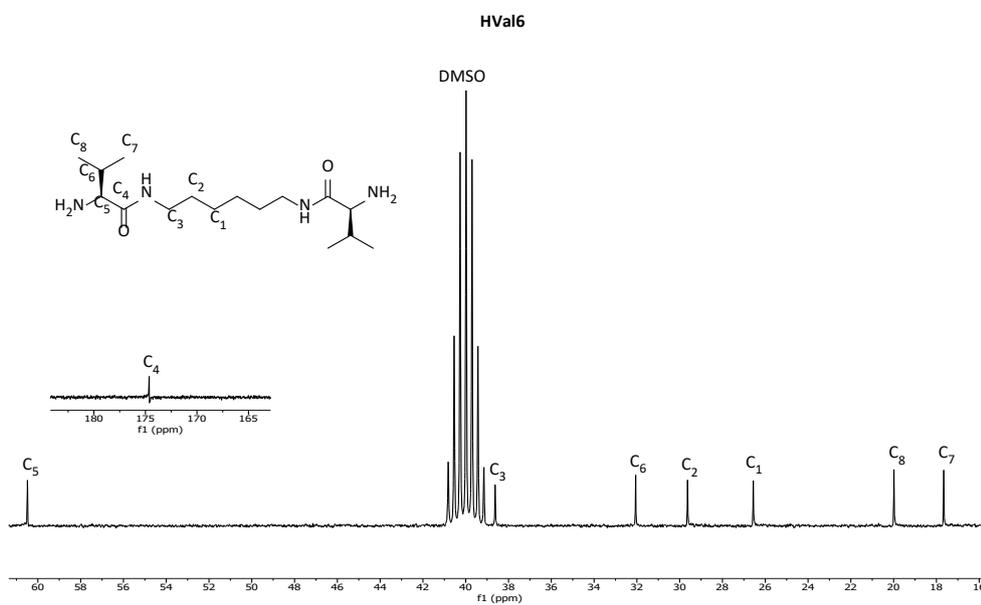
**Figura 37:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN ZVal6 en  $\text{DMSO-}d_6$



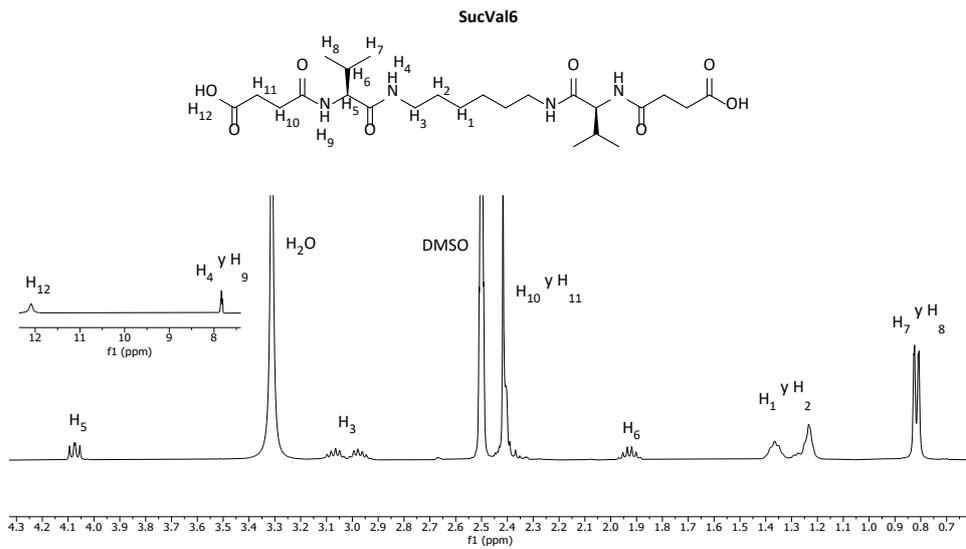
**Figura 38:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HVal12 en  $\text{DMSO-}d_6$  con la zona del disolvente deuterado ampliada



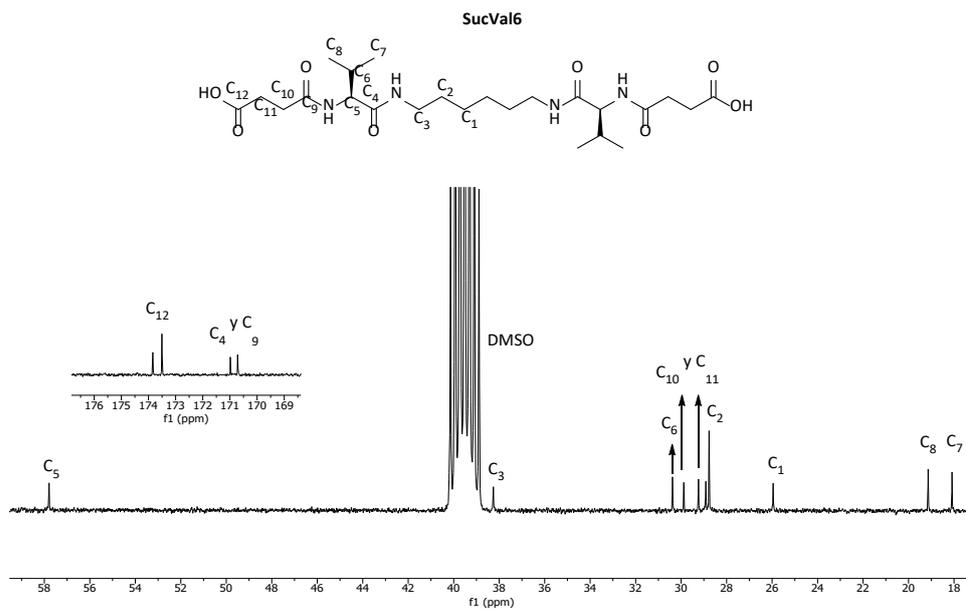
**Figura 39:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN HVal6 en  $\text{DMSO-}d_6$



**Figura 40:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN HVal6 en  $\text{DMSO-}d_6$  con la zona del carbonilo ampliada



**Figura 41:** Espectro  $^1\text{H}$  RMN SucVal6 en DMSO- $d_6$



**Figura 42:** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN SucVal6 en DMSO- $d_6$  con la zona de los carbonilos ampliada

