



**UNIVERSITAT  
JAUME·I**

Trabajo Final de Máster

# **NUEVOS BOLAANFÍFILOS CATIÓNICOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS: DESARROLLO, COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN Y POTENCIAL COMO NANOTRANSPORTADORES**

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales

Departamento de Química Inorgánica y Orgánica

Grupo de Química Supramolecular

**María Dolores García Valiente**

Castelló de la Plana, Julio 2024



## Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a Dr. Juan F. Miravet, supervisor de este trabajo, por su dedicación y el tiempo que me ha brindado durante estos meses. Su orientación ha sido fundamental para la realización de este proyecto. También quiero agradecer a Dr. César A. Angulo Pachón, por su invaluable ayuda en el laboratorio. Su conocimiento, paciencia y constante apoyo han sido esenciales para el desarrollo de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio, por haberme acogido y ayudado siempre que lo he necesitado con una sonrisa.

A los profesores del máster y al coordinador, Pedro Miguel Carda, por haberme enseñado temas tan interesantes y permitirme adentrarme en el mundo de la química médica, un campo que me ha apasionado profundamente.

A todos aquellos que he conocido este año en el máster, por haber hecho de este un año inolvidable.

A mi familia, amigos y pareja, por acompañarme durante todo el proceso. Por apoyarme y creer en mí siempre, por motivarme a seguir siempre que lo he necesitado, no habría sido posible sin vosotros. Muchas gracias.

A todos vosotros, mis más sinceros agradecimientos.

## Abreviaturas

%	Tanto por cien
°C	Grados centígrados
½	Un medio
δ	Desplazamiento químico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aprox.	Aproximadamente
Ar	Arilo
ARN	Ácido ribonucleico
a.u.	Unidades arbitrarias
CAC	<i>Critical aggregation concentration</i>
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CL	Lípidos catiónicos
clogP	Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua calculado
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
DIPEA	<i>N,N-Diisopropylethylamine</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DOTAP	<i>1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride</i>
DOTMA	<i>N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-NNN-trimethylammonium chloride</i>
ESMS	<i>Electrospray mass spectrometry</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
h	Hora
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond connectivity</i>
HPhe12	<i>(2S,2'S)-N,N'-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)</i>

HPhe6	<i>(2S,2'S)-N,N'-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
HVal12	<i>(2S,2'S)-N,N'-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide)</i>
HVal6	<i>(2S,2'S)-N,N'-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide)</i>
Hz	Hercios
kV	Kilovoltios
m	Multiplete
MePyPhe12-Cl/	<i>4,4'-((3S,20S)-3,20-dibenzyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-</i>
MePyPhe12	<i>tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride</i>
MePyPhe12-I	<i>4,4'-((3S,20S)-3,20-dibenzyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-</i>
	<i>tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide</i>
MePyPhe6-Cl/	<i>4,4'-((3S,14S)-3,14-dibenzyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-</i>
MePyPhe6	<i>tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride</i>
MePyPhe6-I	<i>4,4'-((3S,14S)-3,14-dibenzyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-</i>
	<i>tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide</i>
MePyVal12-Cl/	<i>4,4'-((3S,20S)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-</i>
MePyVal12	<i>tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride</i>
MePyVal12-I	<i>4,4'-((3S,20S)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-</i>
	<i>tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide</i>
MePyVal6-Cl/	<i>4,4'-((3S,14S)-3,14-diisopropyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-</i>
MePyVal6	<i>tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride</i>
MePyVal6-I	<i>4,4'-((3S,14S)-3,14-diisopropyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-</i>
	<i>tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide</i>
MHz	Megahercios
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
NA	Ácidos nucleicos
NR	<i>Nile Red</i>
PCL	Policaprolactona
Pd/C	Paladio sobre carbono
PLA	Ácido poliláctico

PLGA	Ácido láctico-co-glicólico
ppm	Partes por millón
PyPhe12	<i>N,N'-((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediy))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))diisonicotinamide</i>
PyPhe6	<i>N,N'-((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))diisonicotinamide</i>
PyVal12	<i>N,N'-((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediy))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))diisonicotinamide</i>
PyVal6	<i>N,N'-((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))diisonicotinamide</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBTU	<i>2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate</i>
td	Triplete de dobletes
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
ThT	Tioflavina T
UJI	Universitat Jaume I
Z/Cbz	<i>Benzyloxycarbonyl</i>
ZPhe12	<i>Dibenzyl((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediy))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate</i>
ZPhe6	<i>Dibenzyl((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate</i>
ZPheOH	<i>((Benzyloxy)carbonyl)-L-phenylalanine</i>
ZVal12	<i>Dibenzyl((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediy))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate</i>
ZVal6	<i>Dibenzyl((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate</i>
ZValOH	<i>((Benzyloxy)carbonyl)-L-valine</i>

## Índice

Abreviaturas .....	i
Introducción .....	2
Sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnologías .....	2
Nanotransportadores catiónicos .....	4
Liposomas catiónicos.....	4
Vesículas catiónicas de bolaanffilos .....	6
Bolaanffilos catiónicos preparados en el grupo .....	8
Objetivos.....	12
Resultados y Discusión .....	14
Síntesis.....	14
Estudio de agregación .....	17
TEM.....	21
Estudio de formación de nanopartículas mediante DLS .....	23
Evaluación de la interacción de los compuestos con ADN.....	25
Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de levaduras .....	28
Conclusiones.....	31
Sección Experimental .....	33
Métodos Generales .....	33
Síntesis de MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6. ....	34
Procedimiento general para el acoplamiento de los aminoácidos con las diaminas. ....	34
Procedimiento general para la desprotección del grupo carbobenzoiloxi de los aminoácidos. ....	37
Procedimiento general para el acoplamiento entre las aminas y el ácido isonicotínico. ....	40
Procedimiento general para la metilación del nitrógeno aromático. ....	42
Procedimiento general para la preparación de los compuestos finales (intercambio del yoduro por cloruro). ....	45
Fluorescencia y absorbancia .....	48
TEM.....	48
DLS (Dynamic light scattering).....	48
Preparación general de las muestras .....	49
Concentración crítica de agregación por Nile Red (NR) .....	49

Interacción de los compuestos con el ADN .....	49
Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	50
Bibliografía.....	52
Anexo.....	57
Espectros RMN .....	57



# Introducción

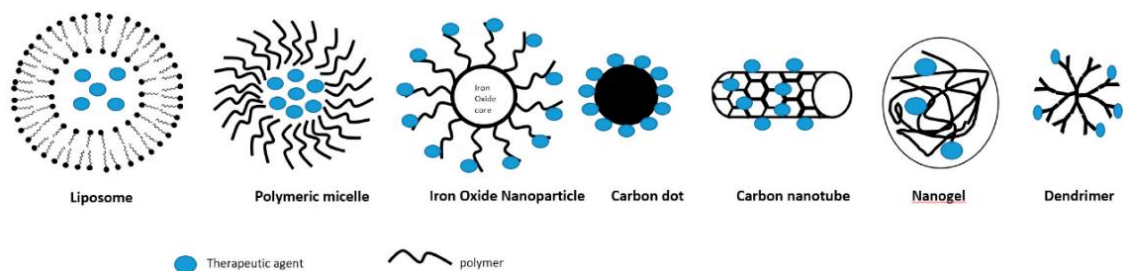
## Introducción

### Sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnologías<sup>1</sup>

La nanotecnología, especialmente en sus aplicaciones en medicina, se encuentra en continua investigación, debido a que mediante el trabajo a nanoescala se puede controlar la liberación de fármacos o agentes de imágenes, obteniendo una orientación y administración óptimas.<sup>2</sup>

En el caso de los sistemas de administración de fármacos asistidos por nanotransportadores, el pequeño tamaño de estos permite a los medicamentos llegar a áreas enfermas superando ciertas barreras biológicas.<sup>3</sup> Mediante el uso de distintas estructuras y materiales de tamaño nanométrico, los nanotransportadores ayudan tanto a proteger de la degradación aquellos productos terapéuticos que se degradan fácilmente como a aumentar la biodisponibilidad de los medicamentos poco solubles.<sup>4</sup> De hecho, los nanotransportadores presentan unas superficies modificables capaces de estabilizarlos y funcionalizarlos para provocar que respondan a diferentes estímulos mejorando de esta manera la eficacia terapéutica y usándolos por tanto en diferentes aplicaciones biomédicas.<sup>5</sup>

Son muchas las necesidades clínicas que requieren diferentes tipos de sistemas de administración de fármacos, por lo que el desarrollo de varios nanotransportadores es imprescindible para cumplir con los requisitos específicos. Estos se pueden clasificar según sus composiciones y estructuras, encontrando liposomas, micelas poliméricas, nanopartículas de óxido de hierro, puntos de carbono, nanotubos de carbono, nanogeles y dendrímeros<sup>5,6</sup> (ver Figura 1.1).

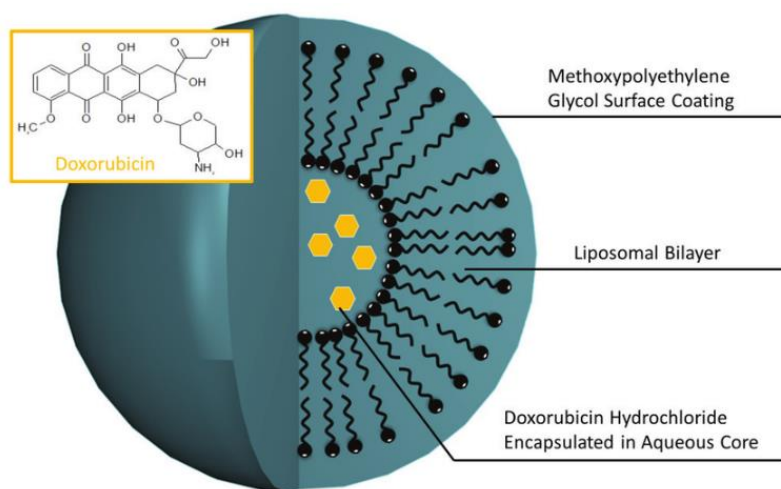


**Figura 1.1.** Esquema de algunos nanotransportadores.<sup>1</sup>

En esta introducción se comentan principalmente dos tipos de nanotransportadores, concretamente, los liposomas y las micelas poliméricas biodegradables.

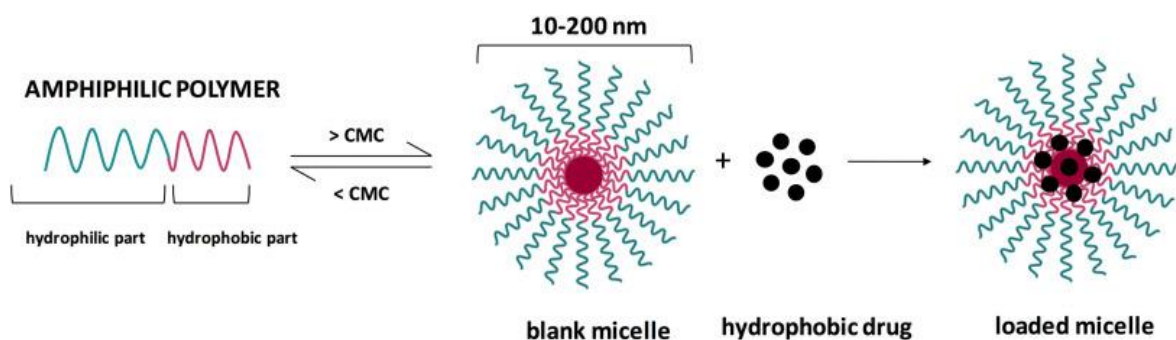
Un liposoma (del griego lipos, grasa, y somas, cuerpo) es una vesícula esférica con una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos y colesterol. Por lo tanto, los liposomas consisten en conjuntos cerrados de bicapas de lípidos con una estructura capaz de acomodar carga en tres sitios distintos, su interior (hidrófilo), dentro de la bicapa (hidrófobo) y en la interfaz (anfifílico); de ahí su uso para administrar proteínas y terapias de moléculas pequeñas (ver Figura 1.2).<sup>7,8</sup>

Los liposomas son nanoportadores autoensamblados biocompatibles, fácilmente modificables y capaces de transportar grandes cargas útiles de fármacos, que permiten atrapar compuestos lipófilos e hidrófilos tanto en la membrana lipídica como en el núcleo acuoso, respectivamente.<sup>9</sup> Debido a su capacidad de mejorar la eficacia terapéutica mediante la estabilización de la carga útil y la absorción del tejido específico, los transportadores liposomales se están utilizando con gran frecuencia como nanotransportadores para la administración de fármacos, dominando entre todas las presentaciones de fármacos asistidos por nanoportadores autorizados por la FDA. Son los más utilizados en la terapia contra el cáncer, administrándose la mayoría por vía intravenosa.<sup>10</sup> Un ejemplo de estos sería el Doxil, un fármaco liposomal que contiene el agente anticancerígeno clorhidrato de doxorubicina<sup>11</sup> (ver Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Representación del fármaco liposomal Doxil conteniendo el anticancerígeno clorhidrato de doxorubicina.<sup>12</sup>

Por otro lado, las micelas poliméricas son un tipo de nanovesícula autoensamblada con un núcleo hidrófobo capaz de encapsular fármacos de baja solubilidad y una capa exterior hidrofílica (ver Figura 1.3). Estas son preferiblemente utilizadas con polímeros biodegradables, pues las hacen más favorables debido a los efectos tóxicos que provocan las nanopartículas metálicas.<sup>13</sup> Algunos de estos polímeros biodegradables pueden ser el ácido poliláctico (PLA), el poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), la policaprolactona (PCL) o sus modificaciones y/o combinaciones. Por ejemplo, micelas poliméricas derivadas de PLGA se utilizaron como co-transportadores del fotosensibilizador IR-768 en el tratamiento del melanoma.<sup>14</sup>



**Figura 1.3.** Representación esquemática de micelas poliméricas.<sup>15</sup>

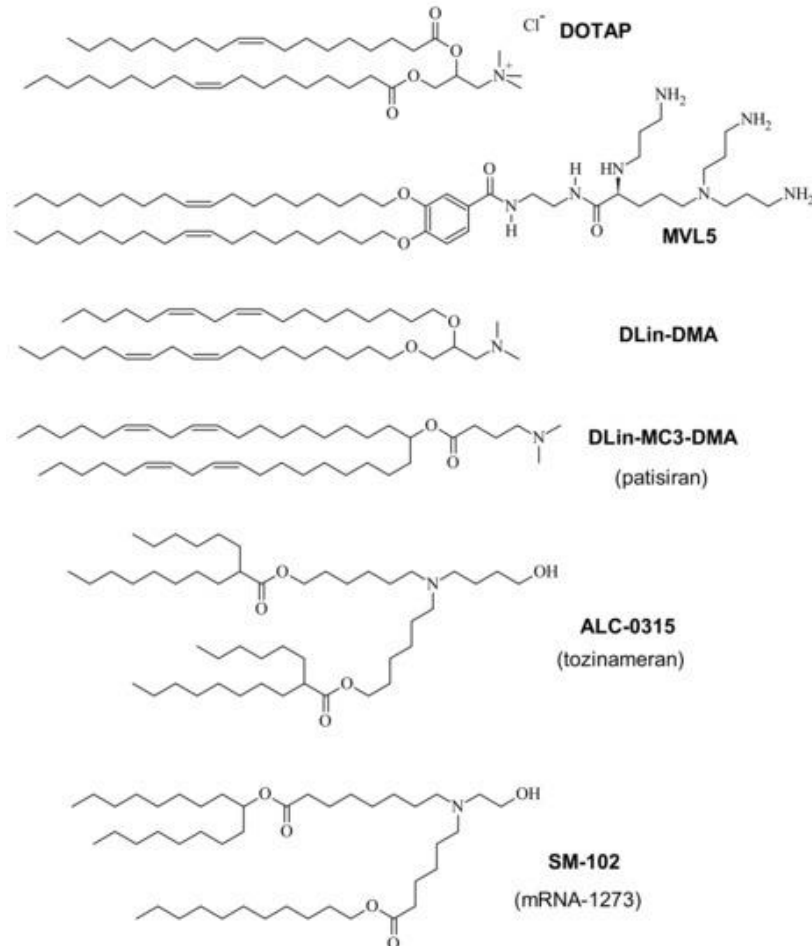
## Nanotransportadores catiónicos

### Liposomas catiónicos<sup>16</sup>

Los liposomas catiónicos (CL) se utilizan principalmente para la administración de ácidos nucleicos (NA), pues son capaces de formar simultáneamente complejos con NA cargados negativamente y unirse a los grupos sulfato aniónicos de proteoglicanos de la superficie celular en células de mamíferos,<sup>17</sup> dando lugar tanto a la absorción por las células como a la expresión del ADN y el ARN. En cuanto a la estructura dominante para los complejos CL-ADN, esta consiste en un modelo de “cuentas de cuerda” de hebras de ADN decoradas con CL adheridas.<sup>18</sup>

Cabe destacar que los complejos CL-NA forman espontáneamente una variedad de nuevas estructuras autoensambladas con distintas relaciones estructura-actividad. En la siguiente figura se muestran algunas estructuras de lípidos catiónicos que han sido aprobados por la

Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para formulaciones de nanopartículas.<sup>19-21</sup>



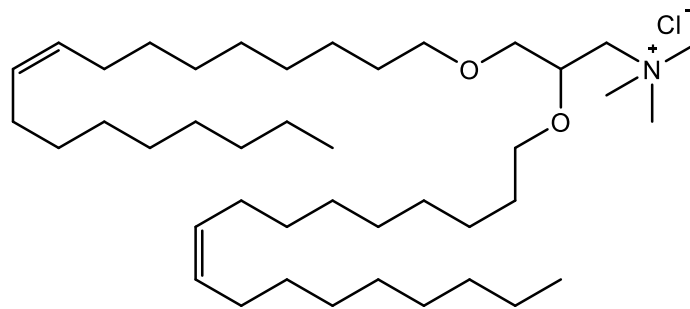
**Figura 1.4.** Estructuras de algunos lípidos ionizables.<sup>16</sup>

El uso de vectores basados en CL para la administración in vitro de NA o en terapia génica se debe a que mejora la eficacia tanto in vitro como in vivo. La mejora se fundamenta en dos principales razones: la protección que los complejos con CL le proporcionan a los NA de la degradación y que los complejos CL-ADN diseñados para tener una relación de cargas lípido/ADN mayor que 1 se adsorberían electrostáticamente en células aniónicas de mamíferos, conduciendo a una unión celular y absorción más eficientes.<sup>22</sup>

Es decir, los liposomas catiónicos son portadores eficaces de una variedad de terapias, teniendo como objetivo el desarrollo de portadores de NA basados en CL optimizados para

una gran variedad de aplicaciones médicas. Para conseguirlo es importante una buena comprensión integral de la estructura de estos vectores y sus interacciones con las membranas celulares y los componentes que conducen a la liberación y actividad de las NA dentro de la célula. Además, es imprescindible tener en cuenta que los lípidos actúan como componentes de un conjunto de muchas moléculas a la hora de estudiar la administración de fármacos o las relaciones estructura-actividad de los lípidos para la NA basada en CL. Mediante la modificación de los lípidos constituyentes se puede variar tanto la estructura de sus autoensamblajes CL-NA, con distintas fases cristalinas líquidas, como la relación de estas estructuras con su eficacia para la administración.

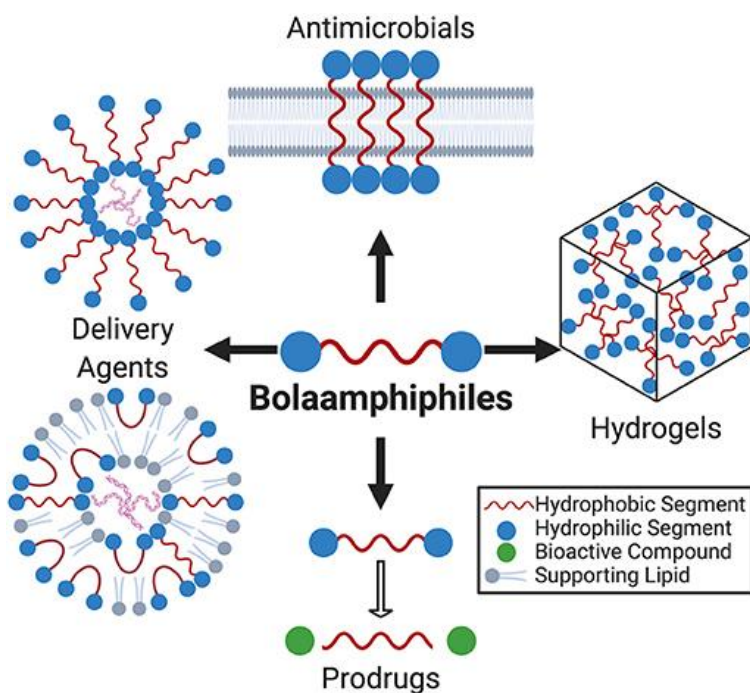
En un ejemplo de la utilización de liposomas catiónicos para transporte de ADN se utilizó el liposoma catiónico DOTMA (ver Figura 1.5) junto a un derivado galactosilado para conseguir la expresión génica de un plásmido en el hígado.<sup>23</sup>



**Figura 1.5.** Estructura química del DOTMA.

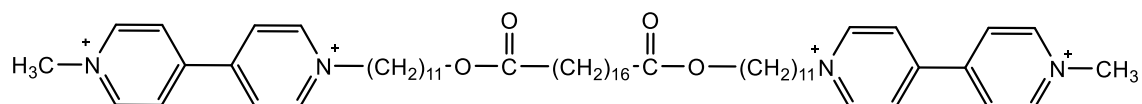
### Vesículas catiónicas de bolaanfífilos<sup>24</sup>

Las moléculas bolaanfílicas consisten en un esqueleto hidrofóbico, como por ejemplo una cadena alquílica, y dos grupos hidrofílicos polares a ambos extremos (ver Figura 1.6). Estas moléculas presentan un muy buen comportamiento de autoensamblaje en agua. Las vesículas son capaces de formarse con una membrana lipídica monocapa, no como las membranas lipídicas bicapa formadas en liposomas convencionales, proporcionando una estabilidad térmica mejorada. Los compuestos bolaanfífilos presentan diversas aplicaciones, entre las que se encuentran su uso como antimicrobianos, agentes de transporte, formación de hidrogeles o profármacos.



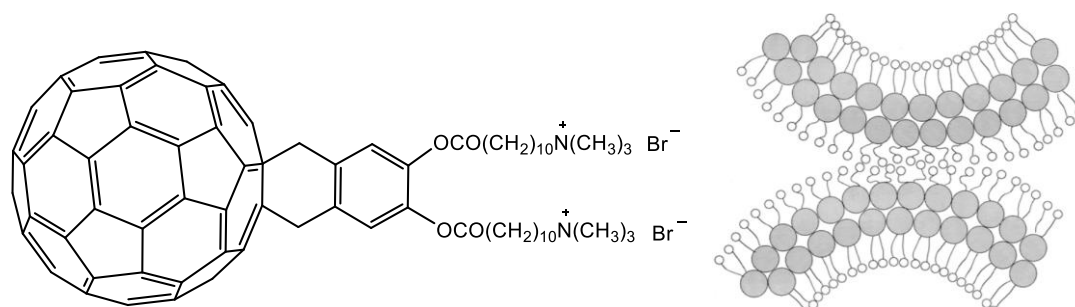
**Figura 1.6.** Representación esquemática de una molécula bolaanfílica y sus aplicaciones.<sup>25</sup>

Son relativamente pocas las vesículas catiónicas bolaanfílicas descritas en la literatura. Por ejemplo, se han descrito bolaanfílicos que presentan como grupo terminal catiónico el bis(paraquat)<sup>26</sup> (ver Figura 1.7).



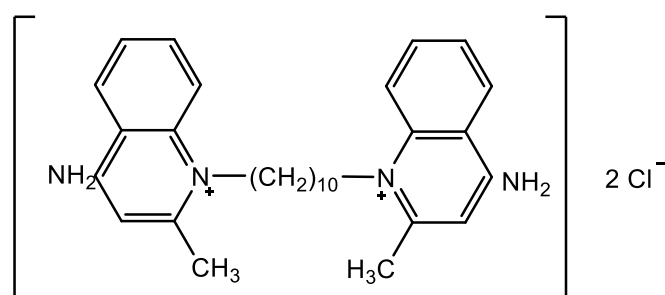
**Figura 1.7.** Estructura de un bolaanfílico con grupos terminales bis(paraquat).<sup>26</sup>

En otro ejemplo, se prepararon bolaanfílicos con grupo terminal trimetilamonio y que contenían una unidad de fullereno<sup>27</sup> (ver Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Estructura de un bolaanfífilo con grupos terminales trimetilamonio y modelo de asociación en vesículas.<sup>27</sup>

En un último ejemplo, se descubrió que el decualinio forma agregados tipo liposoma en medio acuoso, que se denominan DQAsomas. Estas vesículas de decualinio se complejan con ADN y son capaces de provocar su transfección en células<sup>28</sup> (ver Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Estructura química del cloruro de decualinio.<sup>28</sup>

### Bolaanfífilos catiónicos preparados en el grupo<sup>24</sup>

El grupo ha publicado recientemente un artículo describiendo nueve compuestos bolaanfífilicos con una unidad central derivada de cistamina y una unidad terminal compuesta por aminoácidos (tres de los compuestos) o dipéptidos (seis de ellos). Se utilizaron L-fenilalanina, L-valina y L-triptófano como componentes principales, debido a que sus cadenas laterales no ionizables e hidrofóbicas promueven la agregación en un medio acuoso (ver Figura 1.10).

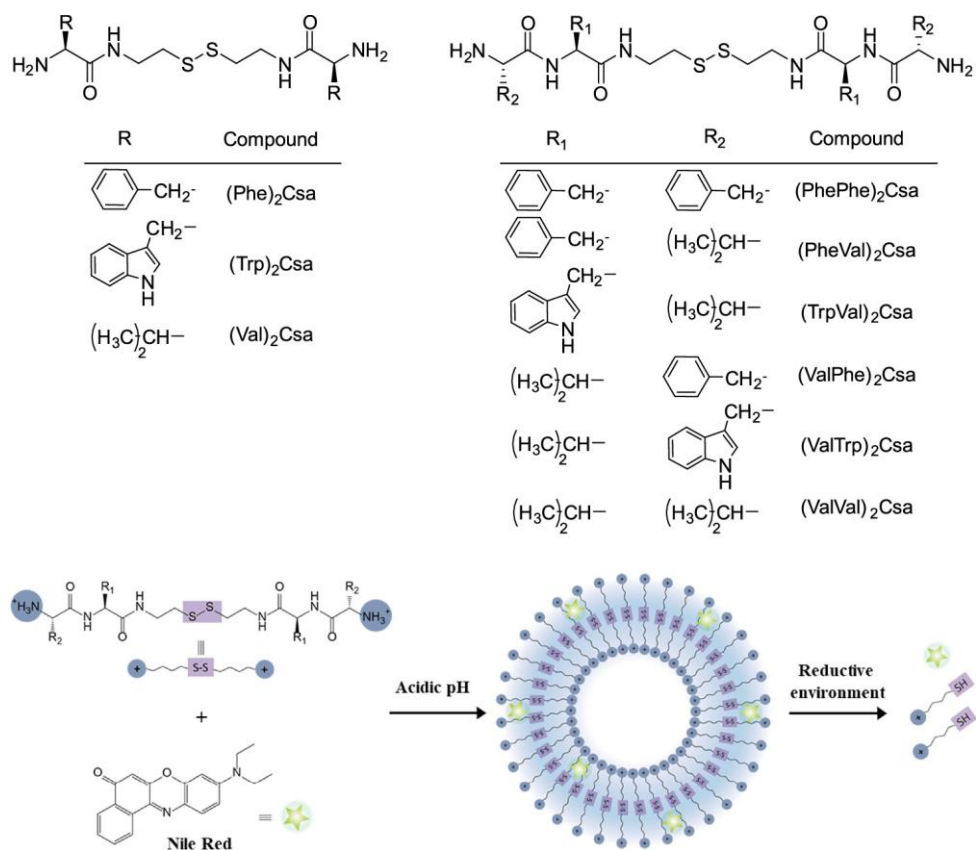
El análisis de estos compuestos reveló que la estructura bolaanfífilica es eficaz para formar vesículas catiónicas en un medio ácido acuoso. La adición de unidades terminales dipeptídicas



en los bolaanfífilos favorece la formación de vesículas en comparación con las unidades de un solo aminoácido, gracias a su mayor naturaleza hidrofóbica. Los aminoácidos aromáticos e hidrófobos facilitan el proceso de agregación, lo que conduce a la formación de vesículas catiónicas.

Se utilizó el análisis de fluorescencia de pireno para evaluar las concentraciones de inicio de agregación de estas moléculas, excepto en las que contienen L-triptófano fluorescente. Además, se demostró que las vesículas con polidispersidad de diámetro mejorada se pueden obtener mediante extrusión a través de un filtro de 200 nm. La espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  comprobó la sensibilidad de las vesículas a la reducción. También se usó el rojo del Nilo como sonda para demostrar la incorporación de moléculas hidrofóbicas en las vesículas y su capacidad de respuesta a la reducción.

Entre las principales ventajas de estos sistemas se encuentran su robustez y estabilidad en condiciones ácidas, como el ambiente gástrico, lo que los hace adecuados como transportadores para el suministro gastrointestinal. Así, las vesículas bolaanfílicas presentan una alternativa viable para el transporte farmacéutico. En contraste, los liposomas formados por la agregación de fosfolípidos comunes tienen enlaces éster con baja resistencia al pH ácido del estómago y a la degradación enzimática.<sup>29,30</sup>

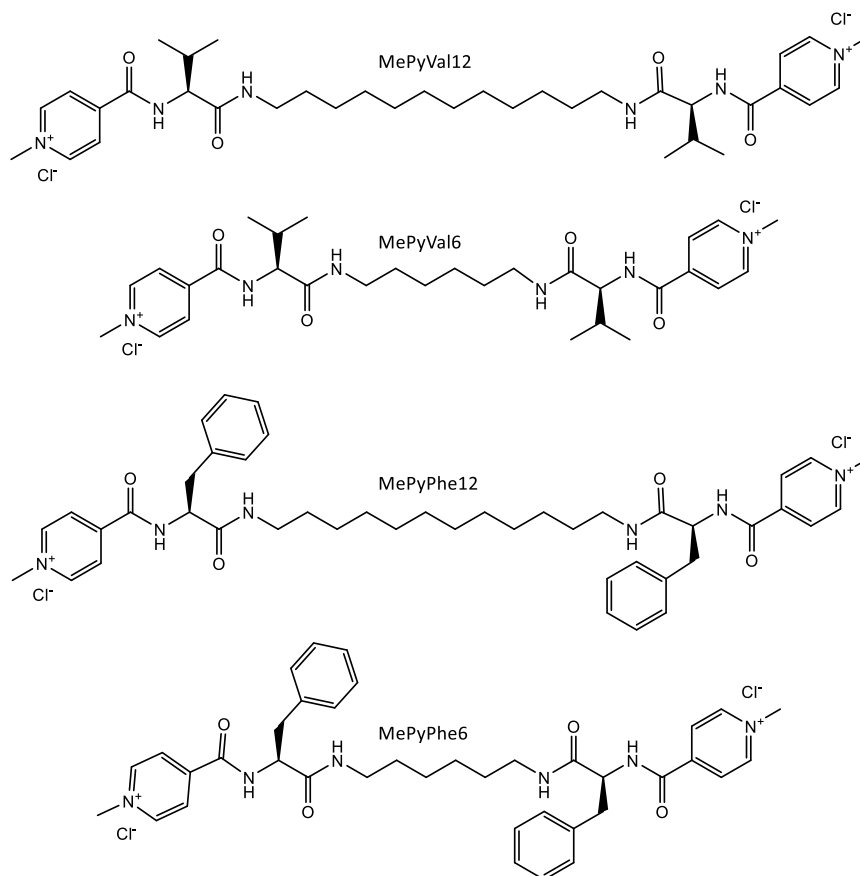


**Figura 1.10.** Estructuras de algunos bolaanfífilos y representación pictórica del desmontaje debido a la formación y reducción de vesículas.<sup>24</sup>

# Objetivos

## Objetivos

- Síntesis y caracterización de nuevos bolaanfífilos catiónicos: MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6.



**Figura 2.1.** Estructura de los distintos compuestos sintetizados MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6.

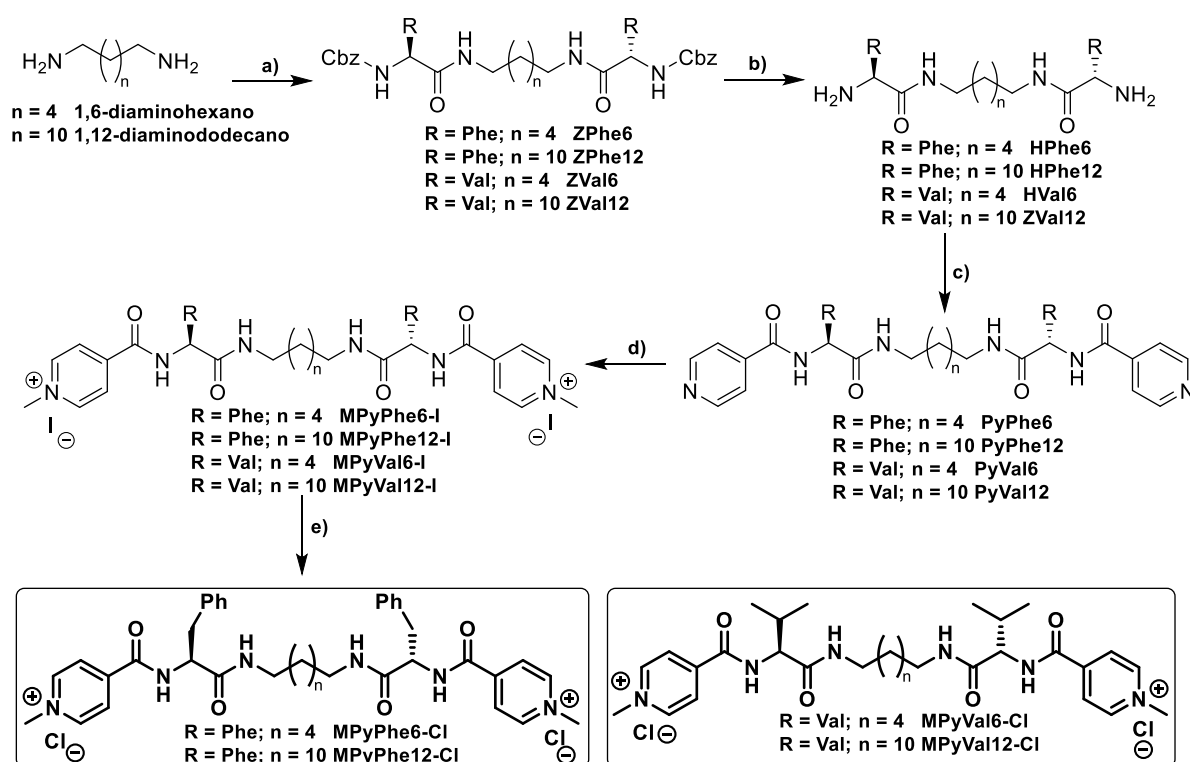
- Estudio del comportamiento de agregación de los distintos compuestos mediante técnicas de fluorescencia y DLS.
- Observación de la morfología de las vesículas o agregados formados en las diferentes moléculas mediante TEM.
- Evaluación de la capacidad de interacción de los distintos compuestos con ADN.
- Evaluación del potencial de los compuestos como nanotransportadores o antimicrobianos mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento de levaduras.

# **Resultados y Discusión**

## Resultados y Discusión

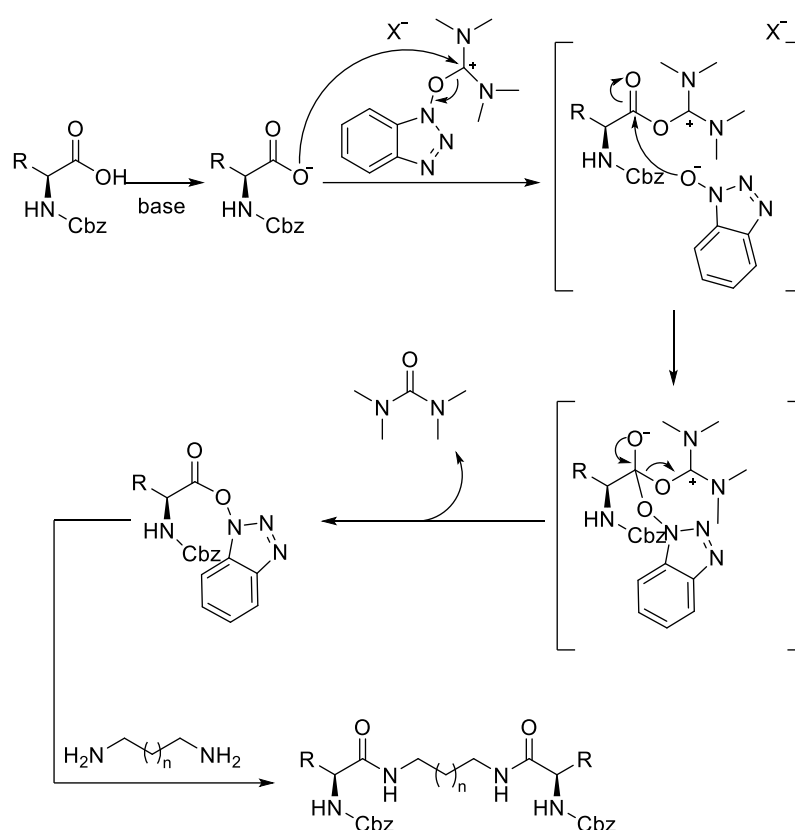
### Síntesis

La síntesis que se describe en el Esquema 3.1 se basa en la metodología para preparar moléculas relacionadas que ha estado utilizando el grupo. Para ello, se comienza mediante el acoplamiento de una diamina con el correspondiente aminoácido, utilizando como agente acoplante TBTU. El producto resultante es sometido a una hidrogenólisis para quitar el grupo protector Z. A continuación, se vuelve a realizar un acoplamiento para unir la unidad de carboxipiridina. Después se procede a metilar el nitrógeno de la piridina utilizando yoduro de metilo, obteniéndose el correspondiente yoduro de metilpiridinio. Finalmente se intercambia el anión yoduro por cloruro, utilizando una resina de intercambio iónico.



**Esquema 3.1.** Reactivos y condiciones: a) ZPheOH o ZValOH, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 54 – 83%; b)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 3 – 6 h, 46 – 95%; c) Ácido isonicotínico, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 44 – 86%; d) Yoduro de metilo,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 65 °C, 3 – 16 h, 98%; e) Resina IRA-402, 52.1% de cloruros,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 88 – 98%.

En la Figura 3.1 se muestra el mecanismo de la reacción de acoplamiento promovida por TBTU. En primer lugar, el ácido carboxílico ataca el átomo de carbono electrofílico del TBTU. A continuación, se produce una reestructuración generando tetrametilurea y el ácido se transforma en un éster activado que forma la amida con la amina correspondiente.



**Figura 3.1.** Mecanismo de formación de enlace amida promovido por TBTU.

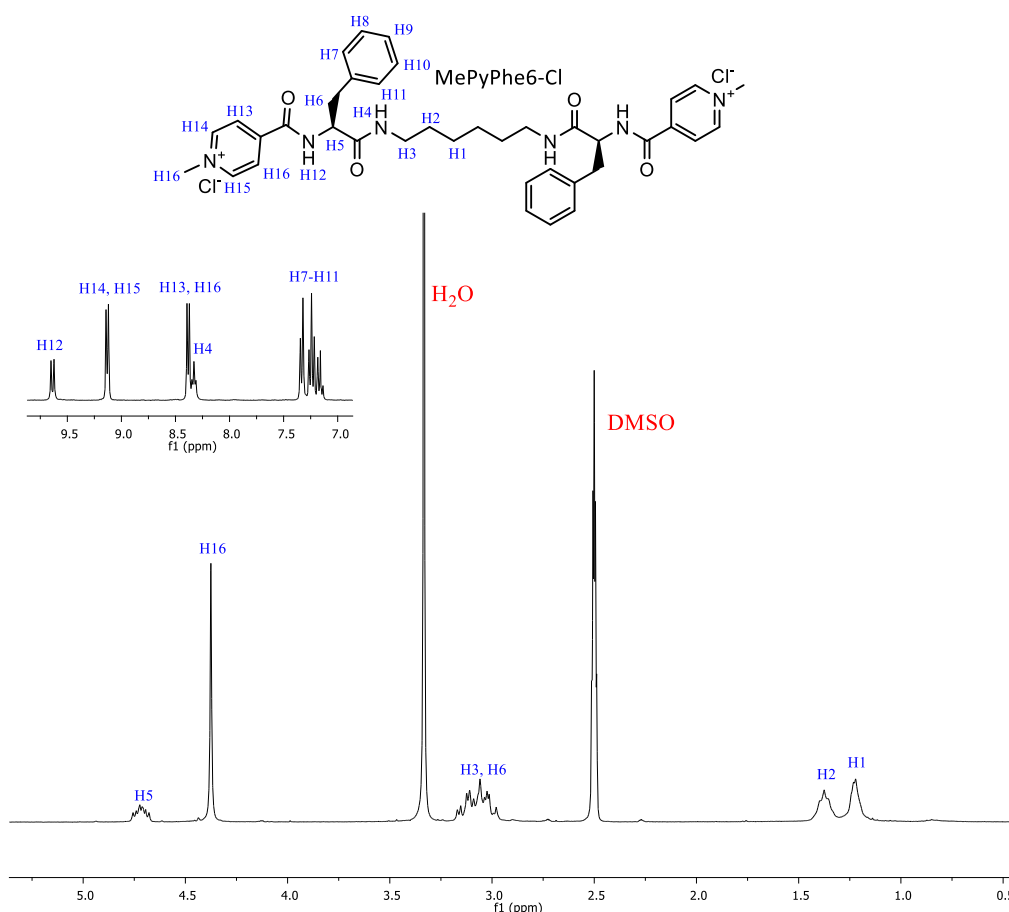
En la Tabla 3.1 se muestran los rendimientos de los diferentes pasos de reacción para todos los compuestos obtenidos. Los rendimientos globales son aproximadamente del 20% para los compuestos MePyVal12-Cl, MePyPhe12-Cl y MePyPhe6-Cl, mientras que para el compuesto MePyVal6-Cl se obtuvo un 63%. Estas diferencias se deben al proceso de aislamiento del producto. Por ejemplo, en el primer paso, el producto se aísla mediante lavados sucesivos con disoluciones acuosas ácidas y básicas. Se observó que los productos presentaban cierta solubilidad en agua, lo cual condujo a menores rendimientos de aislamiento. Cabe destacar que el proceso de metilación funcionó cuantitativamente para todos los compuestos, al igual que el de intercambio de yoduro por cloruro.

**Tabla 3.1.** Rendimientos obtenidos en los diferentes pasos de la síntesis.

Compuesto	Paso de reacción					Rendimiento
	Paso a	Paso b	Paso c	Paso d	Paso e	global
MePyVal12-Cl	54	95	44	98	88	19
MePyVal6-Cl	83	92	86	98	98	63
MePyPhe12-Cl	67	50	82	98	98	26
MePyPhe6-Cl	59	46	63	98	98	16

En la Figura 3.2 se ejemplifica el espectro de RMN de protón de un compuesto final, concretamente MePyPhe6. En él se pueden apreciar, en la zona de los aromáticos (10 – 7 ppm), un doblete correspondiente al H de una de las amidas, que acopla con el H del carbono del centro quiral; dos dobletes correspondientes a los protones de la piridina, equivalentes entre sí; un triplete perteneciente al H de la otra amida, que acopla con los dos H del primer carbono de la cadena alifática; y un conjunto de señales formando un multiplete que indica la presencia de los 5 protones aromáticos del anillo de fenilalanina. Por otro lado, en la zona de los alifáticos, se puede observar, de izquierda a derecha, una señal en forma de multiplete que corresponde al H del carbono del centro quiral, seguida de un singlete perteneciente al metilo de la piridina; luego, además de las señales de los disolventes (H<sub>2</sub>O residual del DMSO-*d*6 y el propio DMSO-*d*6), aparece un multiplete que abarca los protones H6 y H3, solapados entre sí, y los dos multipletes correspondientes a los dos siguientes protones de la cadena alifática.

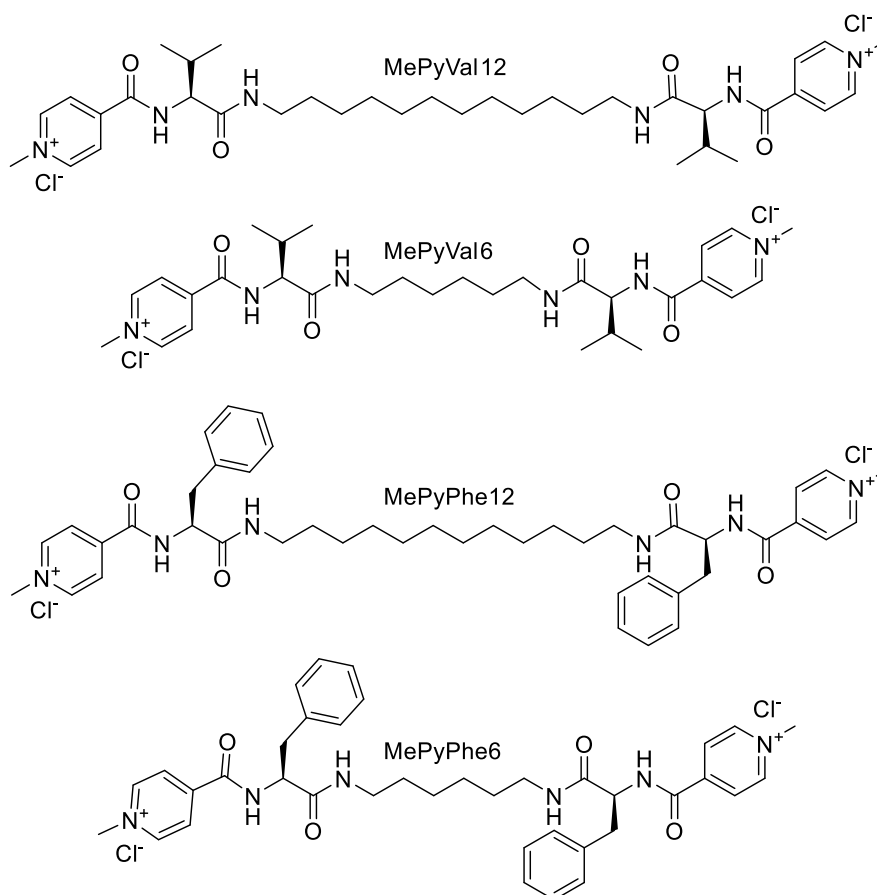




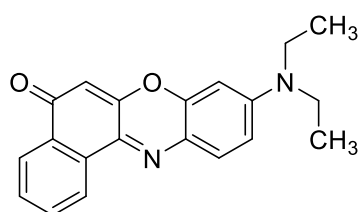
**Figura 3.2.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de MePyPhe6.

## Estudio de agregación

En primer lugar, se determinó la concentración crítica de agregación (CAC) mediante estudios de fluorescencia de los compuestos que se muestran en la Figura 3.3. Para ello se utilizó como sonda fluorescente el colorante rojo de Nilo (ver Figura 3.4). Esta molécula es prácticamente insoluble en agua y solo es fluorescente cuando está en un medio hidrófobo. La formación de vesículas permitirá su disolución en medios acuosos debido a su incorporación en la zona hidrofóbica de la vesícula, originando un aumento de la fluorescencia.



**Figura 3.3.** Estructuras de los compuestos estudiados.

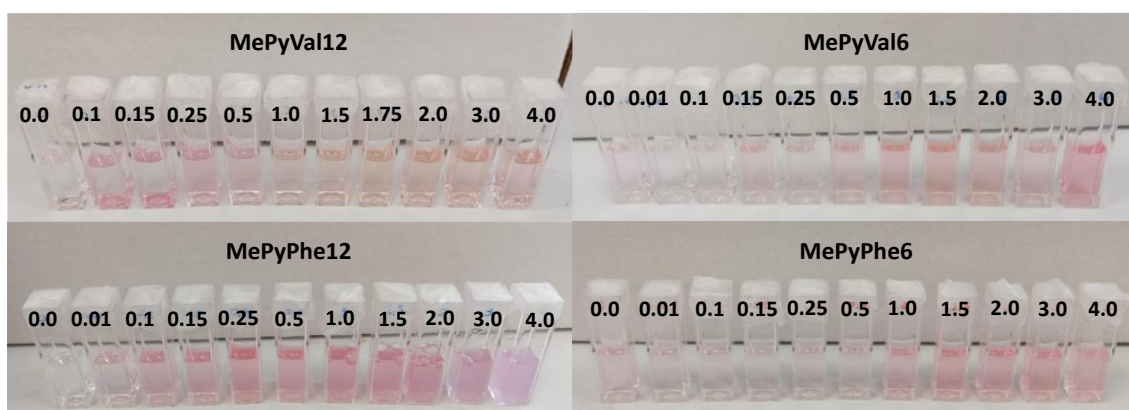


**Figura 3.4.** Estructura química del colorante rojo de Nilo.

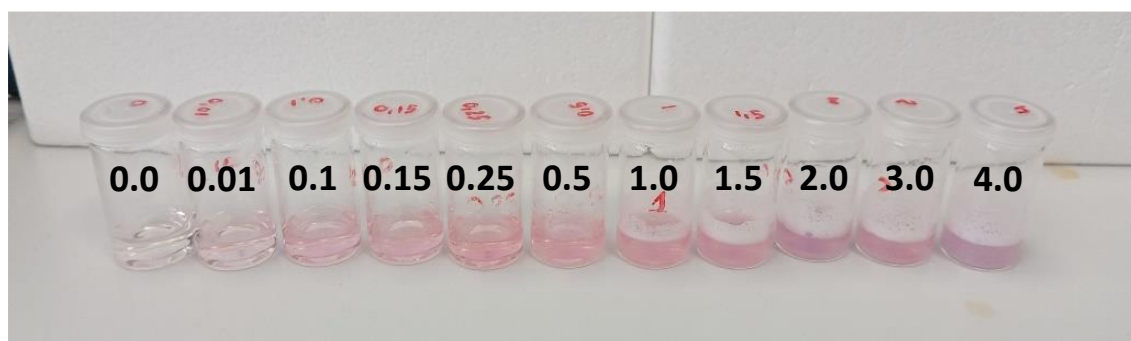
Se prepararon muestras con diferentes concentraciones de los distintos compuestos (0 – 4 mM) y se midió su fluorescencia irradiando al máximo de absorción del rojo de Nilo. La longitud de onda elegida fue 520 nm en todos los casos, excepto para el MePyVal6 que fue de 505 nm; se recogieron los espectros de emisión de 540 o 515 a 750 nm, respectivamente.

En la Figura 3.5 se pueden observar las fotografías de las distintas muestras preparadas a diferentes concentraciones, en presencia de rojo de Nilo (20 μM). En general, se puede

observar cómo en ausencia del compuesto, las disoluciones son incoloras como resultado de la insolubilidad del rojo de Nilo. A medida que aumenta la concentración, hay un aumento progresivo de la coloración de las muestras. Un caso particular fue el del MePyPhe12, que a concentraciones elevadas experimenta un cambio de tono rosáceo a violáceo, indicando un posible cambio estructural de las vesículas. Cabe destacar que el compuesto MePyPhe12 mostró un comportamiento típico de surfactante con la formación de espumas persistentes, efecto que no se observó en los otros compuestos (ver Figura 3.6).

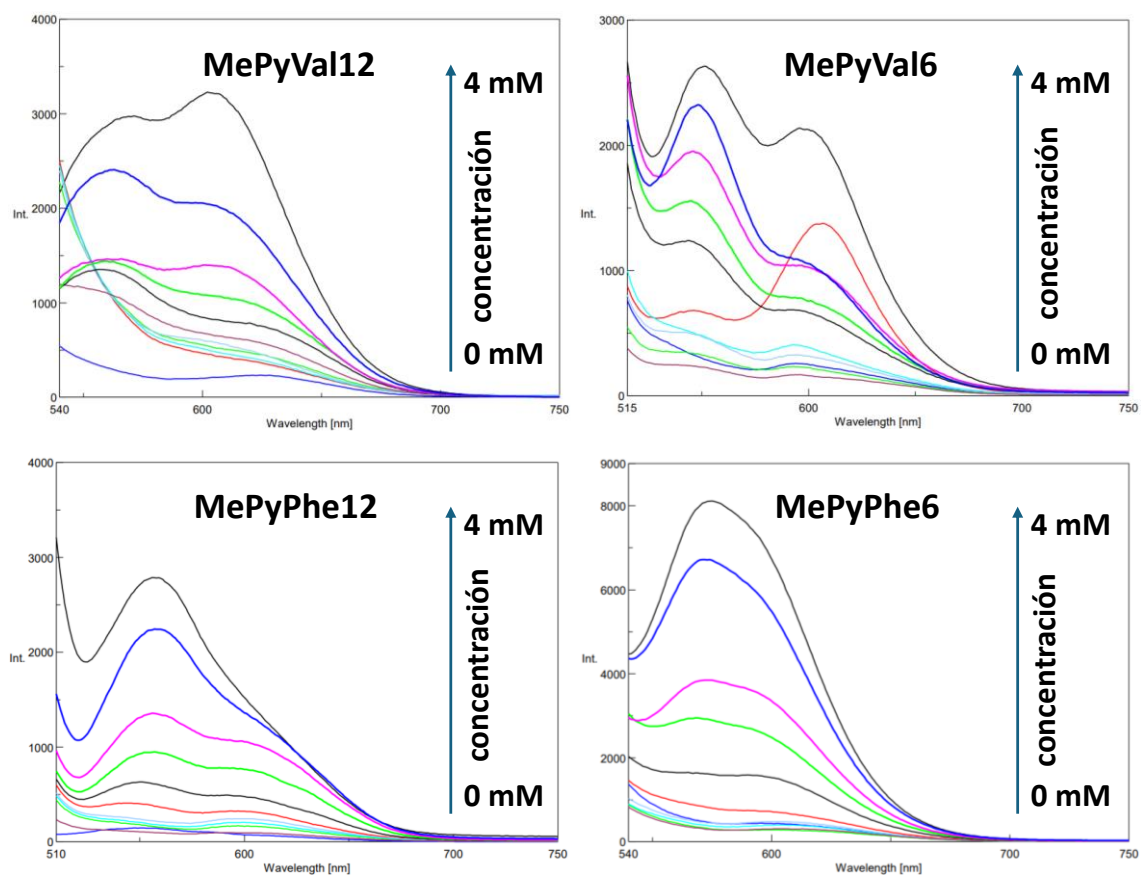


**Figura 3.5.** Fotografías de las distintas muestras preparadas a diferentes concentraciones, en presencia de rojo de Nilo ( $20 \mu\text{M}$ ). Los números indican la concentración (mM) del bolaanfífilo.



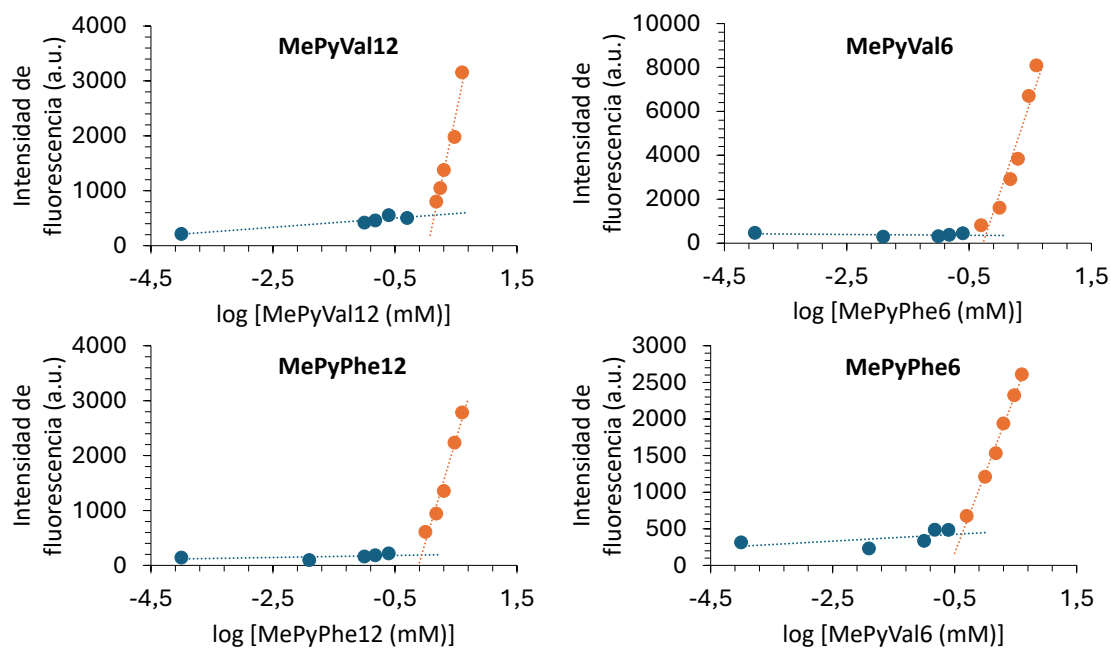
**Figura 3.6.** Fotografía de las distintas disoluciones preparadas de MePyPhe12 a diferentes concentraciones, en presencia de rojo de Nilo ( $20 \mu\text{M}$ ) donde se aprecia la formación de espumas. Los números indican la concentración (mM) del bolaanfífilo.

En la Figura 3.7 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos. En general se observa que a partir de determinada concentración ocurre un aumento muy notable de la emisión fluorescente.



**Figura 3.7.** Espectros de fluorescencia de rojo de Nilo ( $20 \mu\text{M}$ ) en agua en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos estudiados.

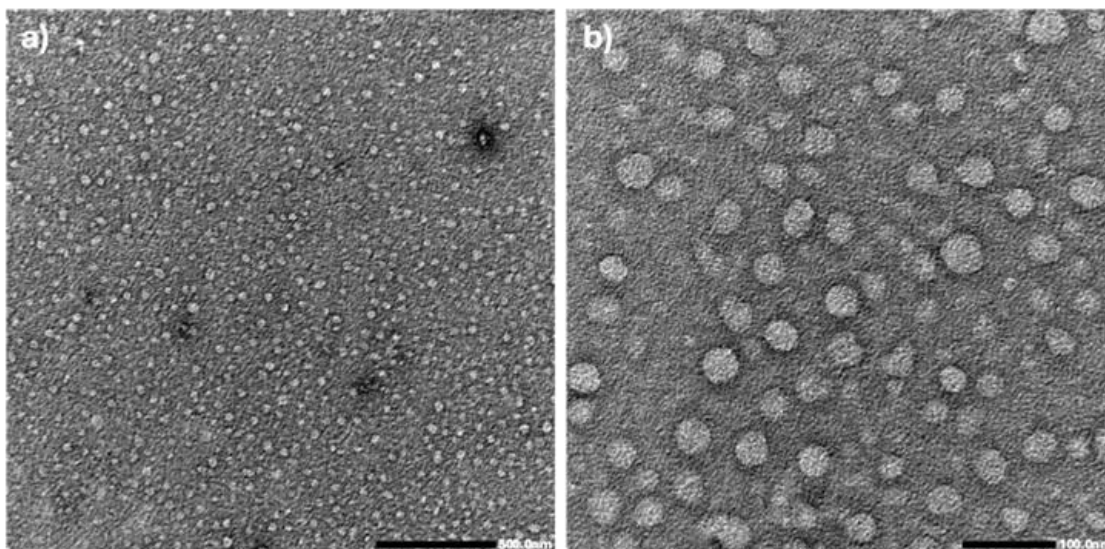
La representación gráfica de estos datos permite obtener la concentración crítica de agregación (ver Figura 3.8). Como se puede observar, se obtuvieron puntos críticos de concentración nítidos para todos los casos. Los valores obtenidos para la concentración crítica de formación de vesículas fueron en torno a 1 mM para todos los compuestos, con valores de 1.4, 0.5, 0.9 y 0.6 mM para los compuestos MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6, respectivamente.



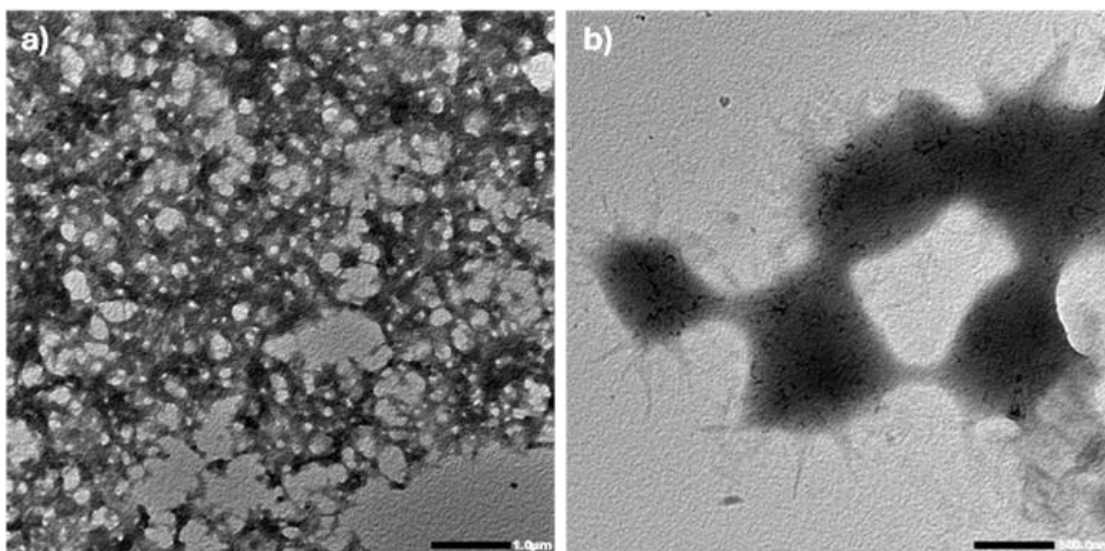
**Figura 3.8.** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a las distintas concentraciones (mM) de los diferentes compuestos en presencia de rojo de Nilo (20  $\mu\text{M}$ ).

## TEM

Con el objetivo de observar la morfología de las vesículas o agregados formados, se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los diferentes compuestos (MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6). En el caso de MePyVal12, se observa la formación de vesículas de diámetro aproximado de 30 nm (Figura 3.9). Los resultados fueron diferentes para el compuesto MePyVal6, observándose una estructura reticular parecida a la que forman los geles (Figura 3.10). Para el compuesto MePyPhe12, se observan también vesículas de aproximadamente 30 nm de diámetro (Figura 3.11b) junto con algunas estructuras fibrilares y otras vesículas de mayor tamaño (Figura 3.11a). Finalmente, en MePyPhe6 se observa la coexistencia de objetos esféricos que se corresponderían con vesículas y estructuras de tipo fibrilar (Figura 3.12a); además, en la Figura 3.12b se puede apreciar cómo estas fibras surgen del resultado de la fusión de vesículas de menor tamaño.

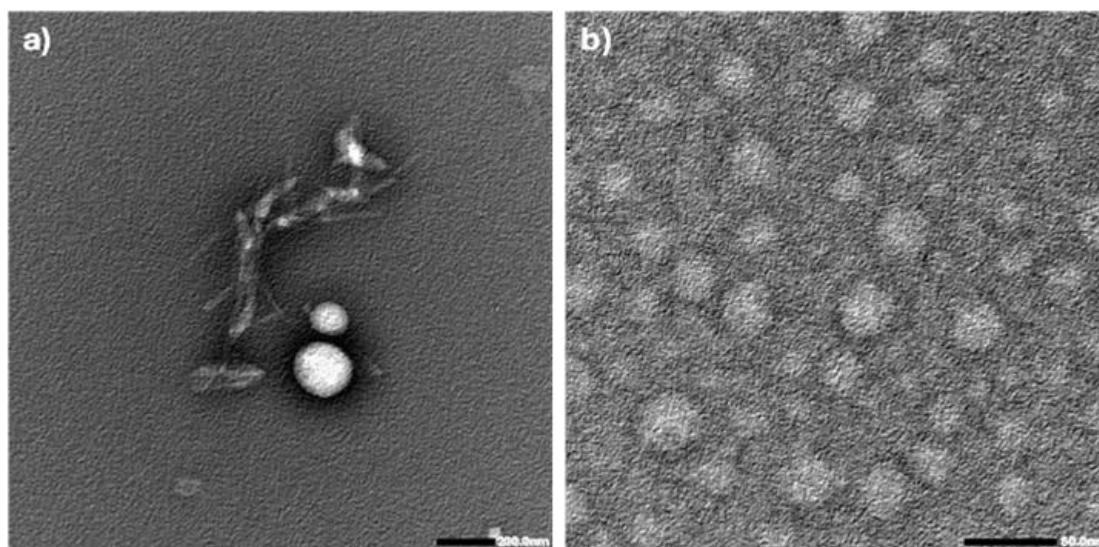


**Figura 3.9.** Fotografías tomadas en TEM del compuesto MePyVal12.

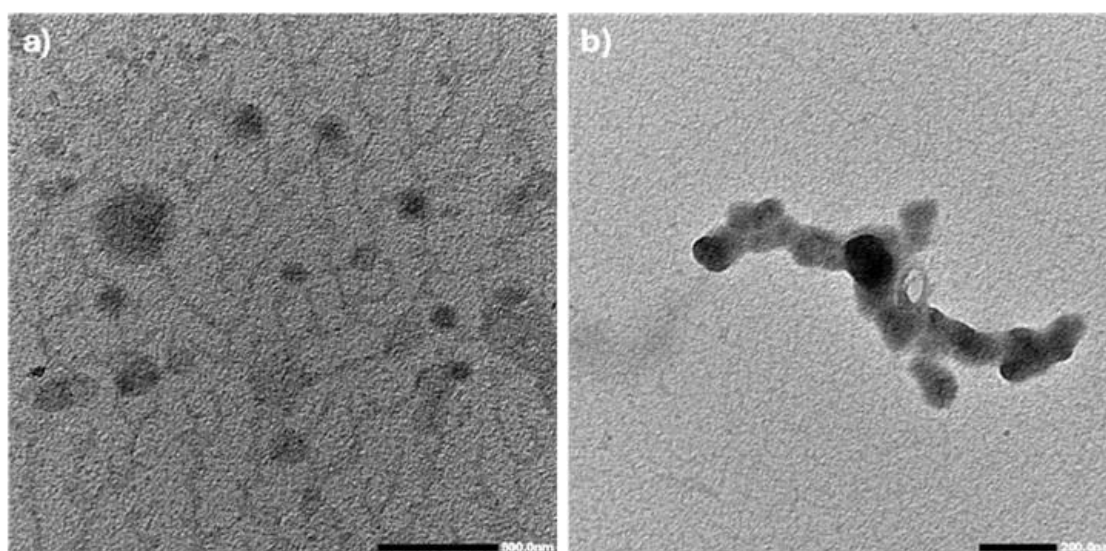


**Figura 3.10.** Fotografías tomadas en TEM del compuesto MePyVal6.





**Figura 3.11.** Fotografías tomadas en TEM del compuesto MePyPhe12.



**Figura 3.12.** Fotografías tomadas en TEM del compuesto MePyPhe6.

### Estudio de formación de nanopartículas mediante DLS

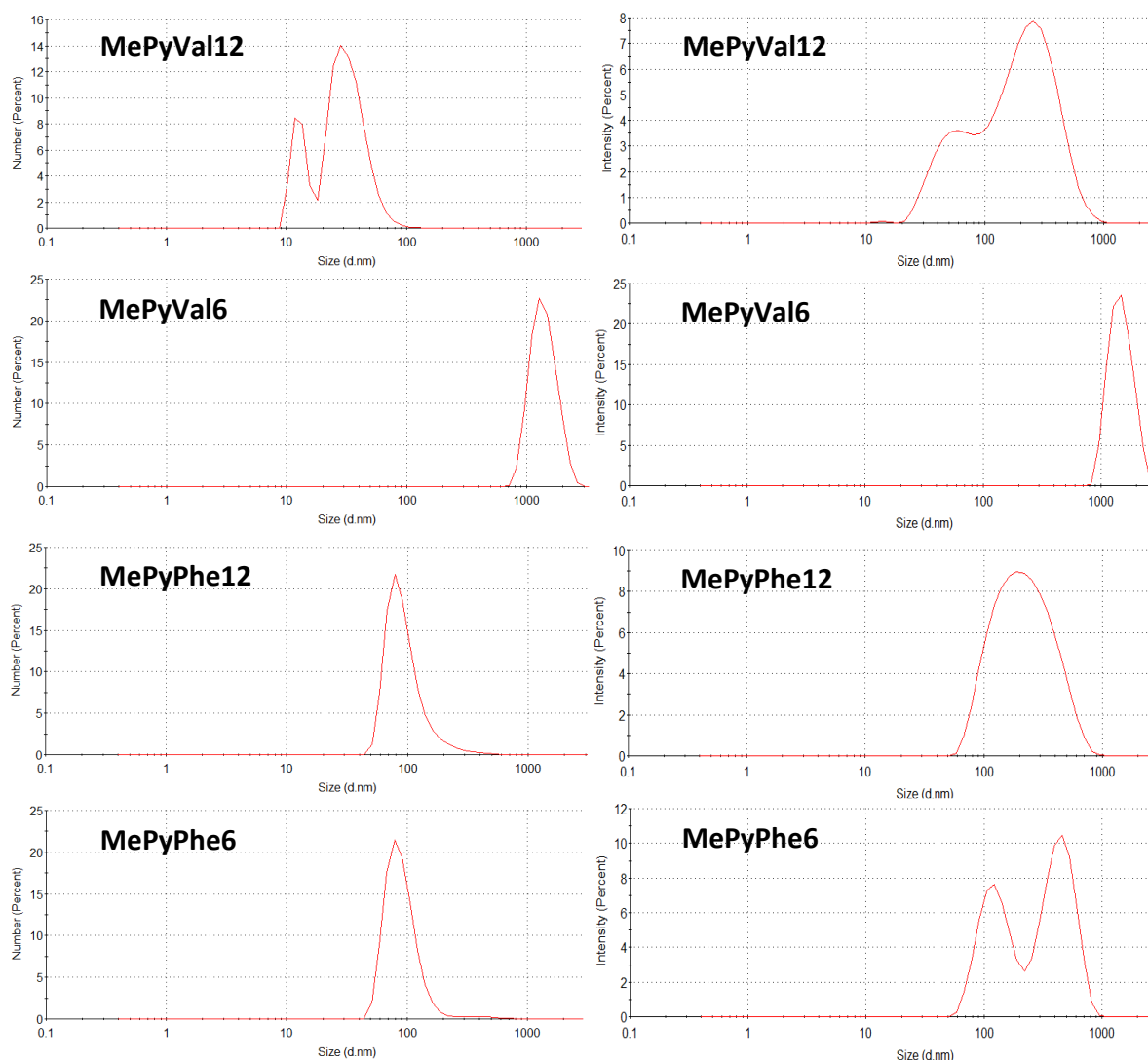
Se estudió la formación de nanopartículas en las moléculas estudiadas utilizando DLS. Para ello, se disolvieron los compuestos MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6 en agua filtrada alcanzando concentraciones 4 mM. Se obtuvieron gráficas que relacionan la intensidad de luz dispersada o el número de partículas con el tamaño de estas, permitiendo conocer el

tamaño aproximado de las nanopartículas presentes en las distintas disoluciones (ver Figura 3.13). Hay que tener en cuenta que la distribución de tamaños basada en el número de partículas es más realista y ofrece siempre valores inferiores a la obtenida teniendo en cuenta la intensidad de luz dispersada. Esto es así porque la intensidad de luz dispersada sigue una relación exponencial con el diámetro de las partículas.

En el caso de MePyVal12, se obtuvo una distribución bimodal con unos diámetros promedio calculados en base al número de partículas de  $13 \pm 2$  nm y  $34 \pm 14$  nm; según la intensidad de luz dispersada también se observó una distribución bimodal con diámetros promedio de  $256 \pm 139$  nm y  $53 \pm 16$  nm. En el MePyVal6 se obtuvieron distribuciones monomodales calculando tanto el número de partículas como la intensidad de luz dispersada, consiguiendo diámetros promedio de  $1400 \pm 350$  nm y  $1500 \pm 343$  nm, respectivamente. De igual forma, las distribuciones observadas en MePyPhe12 también fueron monomodales en ambos casos, calculando un diámetro promedio en base al número de partículas de  $99 \pm 49$  nm, y de  $244 \pm 137$  nm según la intensidad de luz dispersada. Finalmente, en el compuesto MePyPhe6 se observó una distribución monomodal calculando un diámetro promedio en base al número de partículas de  $90 \pm 28$  nm; mientras que la distribución fue bimodal cuando se calculó según la intensidad de luz dispersada, siendo los diámetros promedio de  $443 \pm 136$  nm y  $129 \pm 40$  nm.

En general, estos valores están de acuerdo con lo observado por TEM, por ejemplo, en el caso de MePyVal12 hay una muy buena correlación entre los tamaños observados por ambas técnicas. En el caso de MePyVal6, que dio lugar a estructuras reticulares por TEM, se observa que estas dan lugar a una distribución de tamaños de DLS superior a un micrómetro.

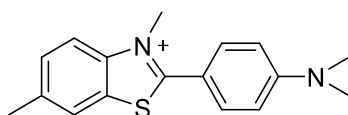




**Figura 3.13.** Representaciones gráficas de los datos obtenidos en DLS para los distintos compuestos MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6 de concentración 4 mM.

### Evaluación de la interacción de los compuestos con ADN.

Teniendo en mente la posible aplicación de los cuatro compuestos en terapia génica, se estudió, como primer paso, la interacción de los mismos con ADN. Con este objetivo se realizaron estudios de fluorescencia utilizando tioflavina T (ThT) como sonda fluorescente (Figura 3.14). ThT es un colorante fluorescente disponible comercialmente que se utiliza comúnmente en la investigación biomédica y presenta un notable aumento en la intensidad de la señal de emisión de fluorescencia al unirse a biomoléculas, debido a la inhibición de la rotación alrededor del enlace simple C-C.<sup>31</sup>



**Figura 3.14.** Estructura química de la tioflavina T (ThT).

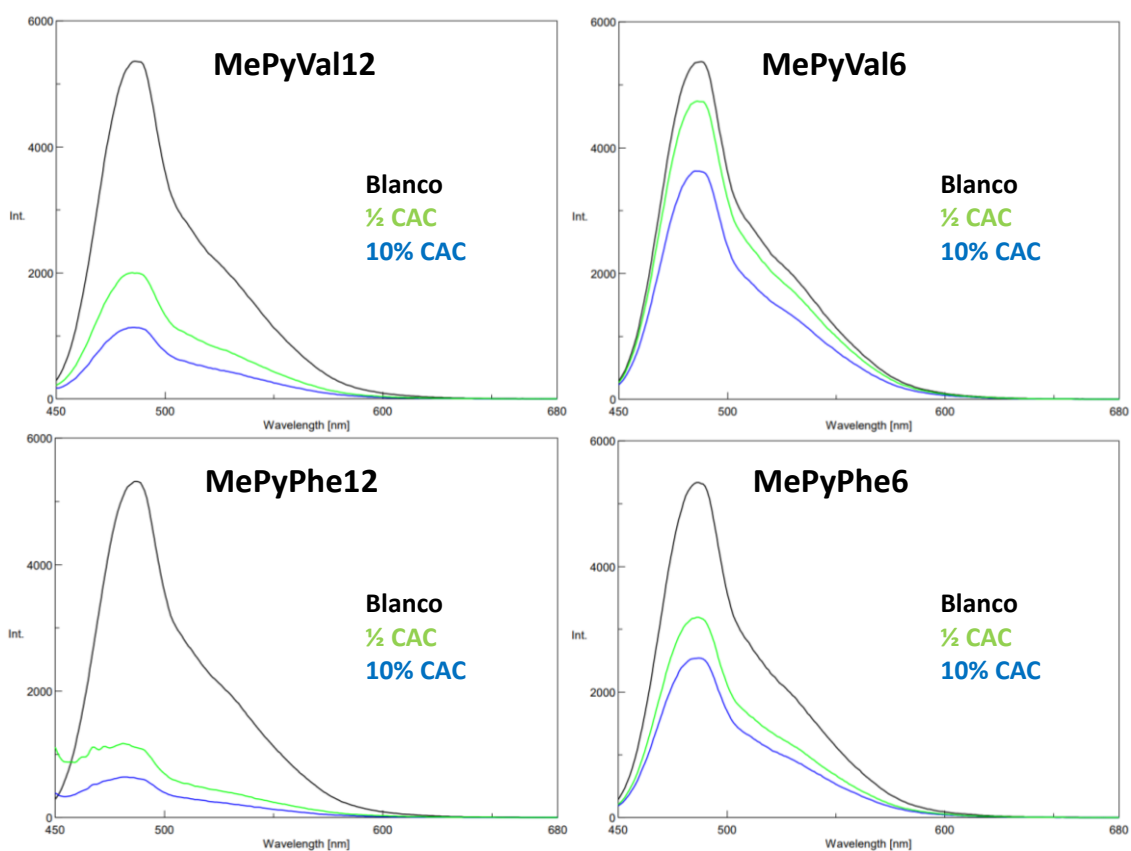
Se evaluó la capacidad de los compuestos preparados de competir con ThT en la complejación con ADN. En estos estudios se espera que si los compuestos interactúan con ADN se produzca una disminución de la fluorescencia del ThT al ser desplazado a la disolución. Se realizaron estudios de fluorescencia donde se utilizó una muestra de ADN de bajo peso molecular de esperma de salmón (0.25 mg/mL) y ThT como sonda fluorescente extrínseca (30  $\mu$ M). A estas muestras se les adicionaron disoluciones de los diferentes compuestos conteniendo concentraciones que eran un 10% por encima de su CAC y la mitad de dicha CAC. Se midió la fluorescencia de las muestras irradiando a una longitud de onda de 440 nm y recogiendo los espectros de emisión de 450 a 680 nm.

En la Figura 3.15 se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos, observando en general una destacable disminución de la fluorescencia en presencia de los compuestos, especialmente para aquellas muestras con una concentración un 10% superior a la CAC. Esta disminución de la fluorescencia se encuentra particularmente pronunciada en el caso de los compuestos más hidrofóbicos, MePyVal12 y MePyPhe12; mientras que para MePyVal6 y MePyPhe6, las señales de fluorescencia decrecen menos, en especial para MePyVal6, en cuya presencia la fluorescencia apenas disminuye. Por lo tanto, los resultados indican que existe una interacción con el ADN para todas las moléculas, aunque su intensidad parece estar relacionada con el carácter hidrofóbico de las mismas. En la Tabla 3.2 se muestra una comparación de la disminución de la intensidad de fluorescencia en relación con el carácter hidrofóbico. Puede apreciarse, por ejemplo, que en el caso de MePyVal6, con un valor de  $\log P$  igual a -6.9, el porcentaje de disminución de fluorescencia es del 32% para una concentración un 10% superior a la CAC y de un 12% para una concentración con un valor igual a la mitad de CAC; mientras que para el caso de MePyPhe6, con un valor de  $\log P$  igual a -5.9, la disminución de la fluorescencia es del 52% a una concentración un 10% mayor a CAC y del 40% para una concentración a la mitad de CAC. Es decir, la intensidad de fluorescencia disminuye de forma más notable para aquellos compuestos con un valor de  $\log P$  mayor, es decir, más hidrofóbicos.

Adicionalmente, cabe destacar que la interacción observada es en general similar para las moléculas libres, con concentraciones por debajo de la CAC, y las moléculas agregadas en vesículas, con concentración un 10% superior a su CAC.

**Tabla 3.2.** Porcentajes de disminución de fluorescencia y datos de clogP para cada molécula a cada una de las concentraciones.

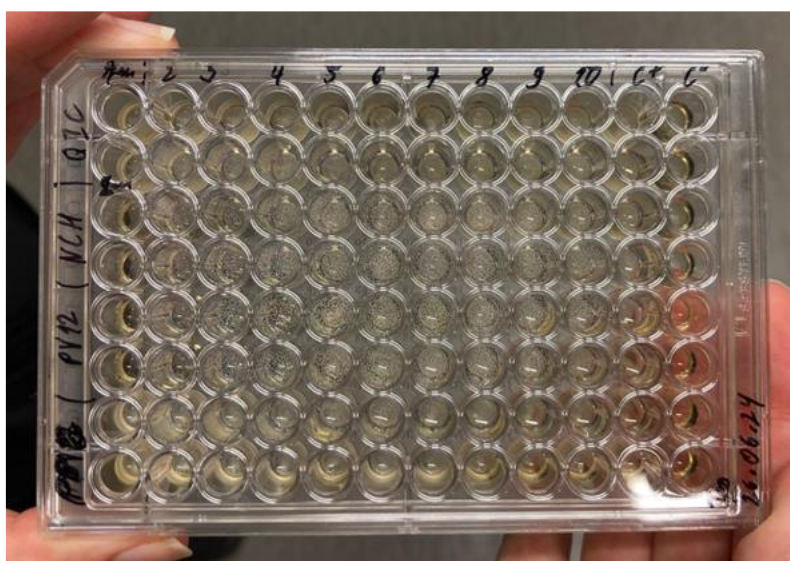
Molécula	Disminución de fluorescencia (%) para 10% CCA	Disminución de fluorescencia (%) para ½ CCA	clogP
MePyVal12	79	63	-3.7
MePyVal6	32	12	-6.9
MePyPhe12	88	79	-2.7
MePyPhe6	52	40	-5.9



**Figura 3.15.** Espectros de fluorescencia de una mezcla de ADN (0.25 mg/mL) y ThT (30  $\mu$ M) en agua en presencia de distintas concentraciones de los compuestos estudiados.

## Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de levaduras

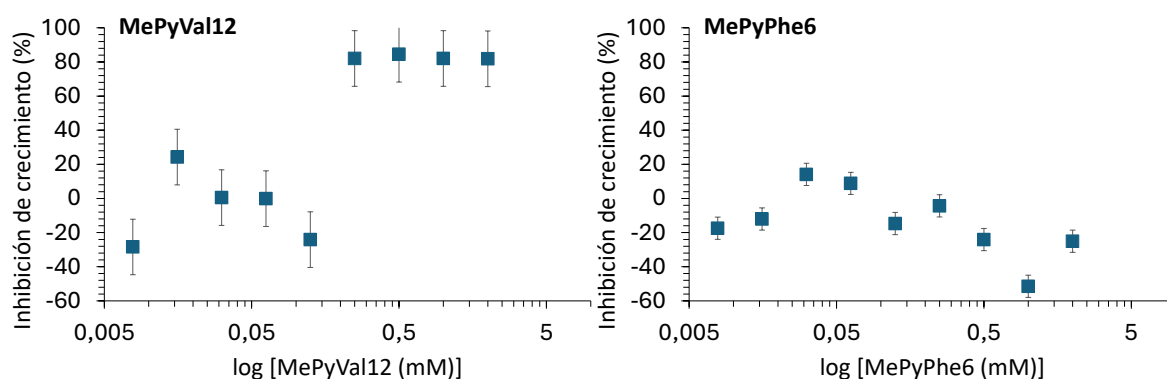
Para realizar una primera estimación de la biocompatibilidad de los compuestos, se realizaron estudios con *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza) en el laboratorio de microbiología de la profesora Rosa de Llanos de la UJI. Se realizó un primer ensayo con el fin de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de dos de los compuestos (MePyVal12 y MePyPhe6); se utilizó un método de dilución en caldo de antifúngicos para levaduras. Para ello se utilizó una placa de microdilución de 96 pocillos, añadiendo en cada uno de ellos 50  $\mu$ L de la respectiva solución del compuesto a estudiar (de concentración 4 mM en ambos casos) y 50  $\mu$ L de inóculo de la levadura. Además de estos, también se prepararon los pocillos correspondientes al control positivo (50  $\mu$ L de inóculo y 50  $\mu$ L del medio estéril sin fármaco) y al control negativo (50  $\mu$ L de agua estéril destilada y 50  $\mu$ L de medio sin fármaco). La placa de microdilución se incubó a 35 °C sin agitación durante 48 horas, obteniendo la placa que se encuentra en la Figura 3.16.



**Figura 3.16.** Fotografía de la placa de microdilución obtenida tras 48 horas de incubación a 35 °C. Los compuestos MePyVal12 y MePyPhe6 son los correspondientes a las cuatro filas de abajo.

Para llevar a cabo la lectura de los resultados se utilizó un lector de placas y se midió la absorbancia a 450 nm. A este respecto hay que tener en cuenta que la presencia de levaduras origina turbidez y dispersión de luz, que es la que se mide a 450 nm. Una absorbancia baja,

indica que las levaduras no han crecido como resultado de la acción de los compuestos añadidos. Con los datos recogidos se realizaron las gráficas que se muestran en la siguiente Figura 3.17, representando la inhibición de crecimiento (%) frente a la concentración en escala logarítmica.



**Figura 3.17.** Representación gráfica de la inhibición de crecimiento (%) frente a las distintas concentraciones (mM) de los diferentes compuestos.

A partir de estas representaciones, podemos concluir que, en el caso de MePyVal12, la MIC tendrá un valor en torno a 0.06 mM, pues la absorbancia presenta un importante decrecimiento al alcanzar esa concentración, algo que se puede observar en el primer gráfico al notar un gran aumento de la inhibición de crecimiento. Por otro lado, en MePyPhe6 todos los valores de inhibición de crecimiento se encuentran alrededor de cero y números negativos, lo que indica que no hay una concentración mínima inhibitoria para este compuesto. Por lo tanto, a la hora de utilizar estos compuestos como agentes de transporte de bioactivos en levaduras, solamente el compuesto MePyPhe6 muestra la biocompatibilidad en un amplio rango de concentraciones.

# Conclusiones

## Conclusiones

- Se han preparado y caracterizado los compuestos MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6 con rendimientos globales en torno al 20% para todos excepto para MePyVal6 que fue del 63%.
- Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fueron determinadas usando tanto espectroscopía de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C como espectrometría de masas.
- Los estudios de fluorescencia mostraron que todos los compuestos estudiados tienen la capacidad de formar agregados (vesículas principalmente) a concentraciones críticas específicas (alrededor de 1 mM), con MePyPhe12 mostrando propiedades típicas de surfactante.
- El estudio TEM reveló una variedad de morfologías entre los cuatro compuestos investigados. Mientras que en MePyVal12 y MePyPhe12 se observaron principalmente vesículas, MePyVal6 mostró una estructura reticular y MePyPhe6 presentó tanto vesículas como estructuras fibrilares.
- El análisis DLS confirmó la presencia de nanopartículas y reveló distribuciones de tamaño específicas para cada compuesto; siendo las de mayor tamaño las correspondientes a MePyVal6 (del orden de micrómetros).
- Todos los compuestos estudiados mostraron interacción con el ADN, siendo más efectiva en aquellos con mayor carácter hidrofóbico (MePyVal12 y MePyPhe12), lo que indica su potencial para aplicaciones en terapia génica.
- MePyPhe6 destaca por su biocompatibilidad con *Saccharomyces cerevisiae*, lo que lo hace un mejor candidato para su uso como agente de transporte de bioactivos en levaduras. Mientras tanto, MePyVal12 podría ser considerado para aplicaciones donde se requiera actividad antifúngica, pues presenta una MIC en torno a 0.06 mM.

# Sección Experimental



## Sección Experimental

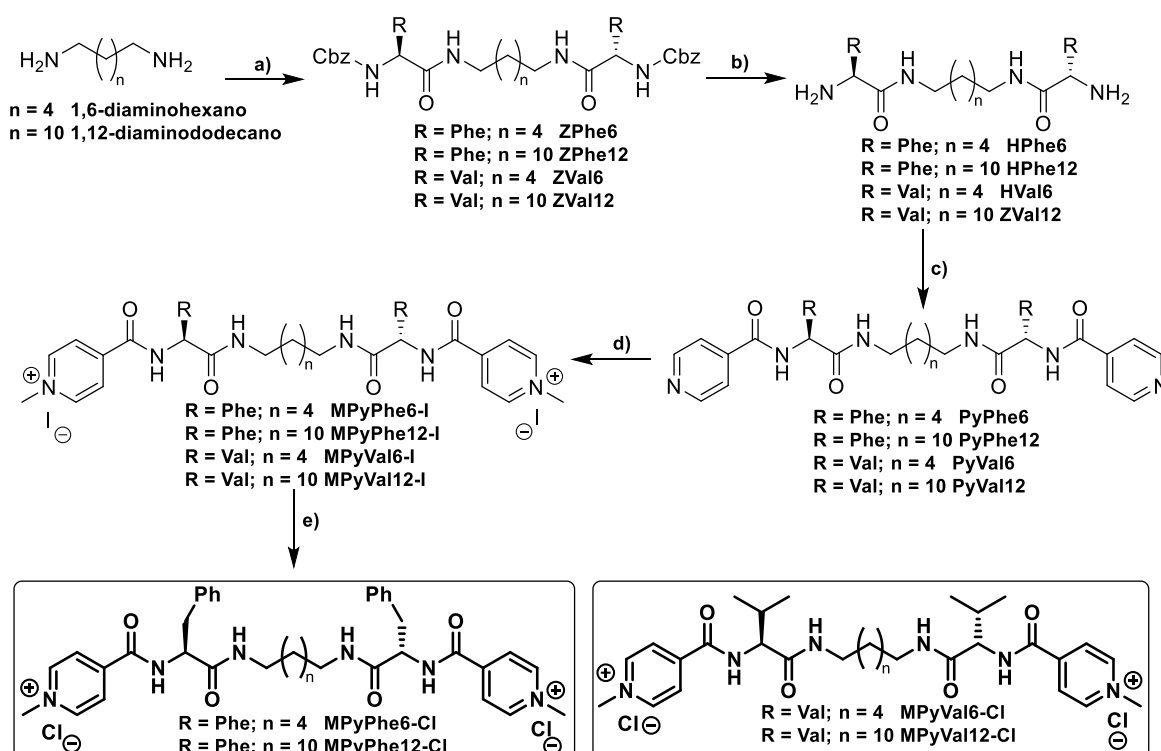
### Métodos Generales

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  fueron realizados en espectrómetros Bruker Avance III HD 400 MHz y HD 300 MHz y en un espectrómetro Agilent INOVA System 500 MHz, usando como disolvente dimetilsulfóxido o agua deuterada a una temperatura de 30 °C. Las señales que se tomaron como referencia en el disolvente deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) son el singlete a 2.5 ppm en RMN- $^1\text{H}$  y el quintuplete a 39.52 ppm en RMN- $^{13}\text{C}$ ; mientras que en  $\text{D}_2\text{O}$  la señal que se tomó como referencia fue el singlete a 4.79 ppm en RMN- $^1\text{H}$ . Las señales fueron asignadas con la ayuda de métodos 2D (COSY, HSQC y HMBC).

El espectro de masas fue realizado por *Mass Spectrometry triple Quadrupole Q-TOF Premier* con Electrospray y APCI acoplados (ESMS).

Las reacciones que necesitaban atmósfera inerte fueron llevadas a cabo bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$ . Los reactivos disponibles comercialmente fueron utilizados tal y como fueron recibidos

## Síntesis de MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6.

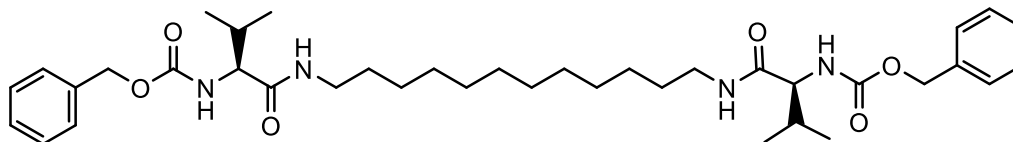


**Esquema 6.1.** *Reactivos y condiciones:* a) ZPheOH o ZValOH, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 54 – 83%; b)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 3 – 6 h, 46 – 95%; c) Ácido isonicotínico, TBTU, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ , t.a., 16 h, 44 – 86%; d) Yoduro de metilo,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 65 °C, 3 – 16 h, 98%; e) Resina IRA-402, 52.1 % de cloruros,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , t.a., 88 – 98%.

### Procedimiento general para el acoplamiento de los aminoácidos con las diaminas.

A una disolución de la diamina comercial (1,6-diamino hexano o 1,12-diamino dodecano) (5 mmol) en cloroformo (250 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se le añadió secuencialmente: el TBTU (10.5 mmol, 2.1 eq.), el L-aminoácido Z protegido comercial (**ZValOH o ZPheOH**) (10 mmol, 2.0 eq.) y la DIPEA (10.5 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 (250 mL), luego con NaOH 0.1 M (250 mL), con salmuera (250 mL) y finalmente con agua destilada (50 mL). El sólido obtenido se secó en estufa de vacío durante 16 h a 50 °C.

*Dibenzyl((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate (ZVal12)*: Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 54%):

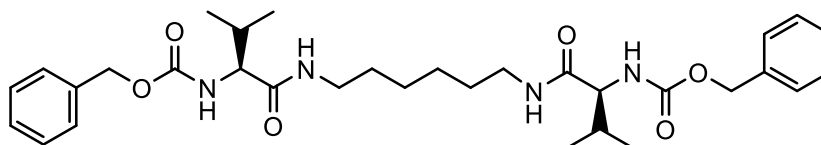


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6)**:  $\delta$  7.85 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 7.40 – 7.27 (m, 5H), 7.19 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.77 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.16 – 2.90 (m, 2H), 1.98 – 1.85 (m, 1H), 1.42 – 1.32 (m, 2H), 1.27 – 1.18 (m, 8H), 0.83 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6)**:  $\delta$  170.9 (C=O), 156.1 (C=O), 137.1 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (2CH<sub>Ar</sub>), 65.3 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH), 38.4 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH), 28.9 (3CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 19.2 (CH<sub>3</sub>), 18.2 (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 [M+H]<sup>+</sup>; found: 667.4431 (0.6 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*Dibenzyl((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))dicarbamate (ZVal6)*: Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 83%):

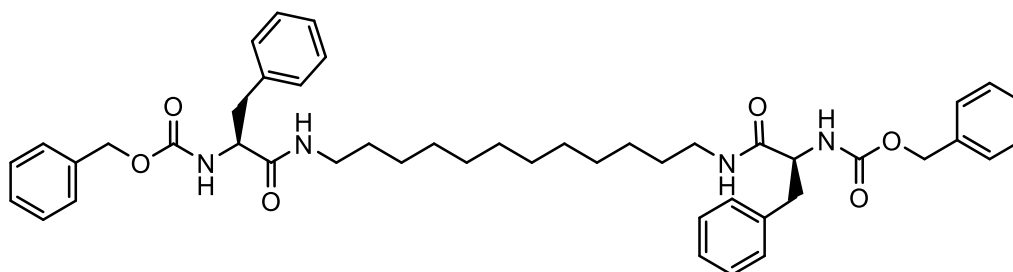


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6)**:  $\delta$  7.87 (t,  $J = 5.5$  Hz 1H), 7.41 – 7.28 (m, 5H), 7.17 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.78 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.15 – 2.93 (m, 2H), 1.97 – 1.85 (m, 1H), 1.41 – 1.31 (m, 2H), 1.27 – 1.19 (m, 2H), 0.83 (d,  $J = 6.4$  Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 170.9 (C=O), 156.0 (C=O), 137.1 (C<sub>Ar</sub>), 128.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.7 (CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (2CH<sub>Ar</sub>), 65.3 (CH<sub>2</sub>), 60.4 (CH), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>), 19.2 (CH<sub>3</sub>), 18.2 (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 [M+H]<sup>+</sup>; found: 583.3497 (0.2 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*Dibenzyl((2S,2'S)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate (ZPhe12):* Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 67%):

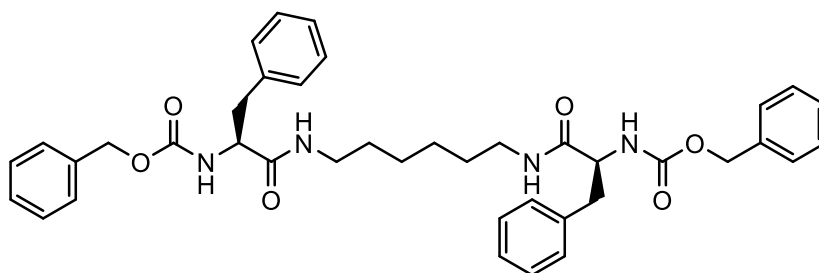


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.91 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.13 (m, 10H), 4.94 (s, 2H), 4.19 (td, *J* = 9.6, 4.9 Hz, 1H), 3.14 – 2.65 (m, 4H), 1.40 – 1.28 (m, 2H), 1.26 – 1.15 (m, 8H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 171.1 (C=O), 155.7 (C=O), 138.1 (C<sub>Ar</sub>), 137.1 (C<sub>Ar</sub>), 129.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.9 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.2 (CH<sub>Ar</sub>), 65.1 (CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (2CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 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>: 762.4436 [M+H]<sup>+</sup>; found: 763.4435 (0.1 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*Dibenzyl((2S,2'S)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))dicarbamate (ZPhe6):* Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 59%):



**RMN-<sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  7.96 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 7.44 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.39 – 7.11 (m, 10H), 4.94 (s, 2H), 4.20 (td,  $J$  = 9.3, 3.9 Hz, 1H), 3.14 – 2.66 (m, 4H), 1.39 – 1.28 (m, 2H), 1.23 – 1.14 (m, 2H).

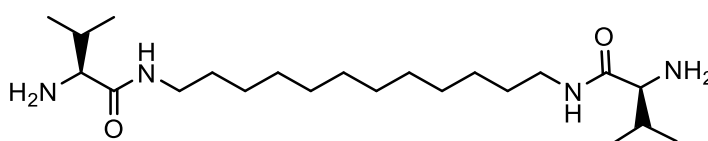
**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  171.1 (C=O), 155.7 (C=O), 138.1 (C<sub>Ar</sub>), 137.0 (C<sub>Ar</sub>), 129.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.9 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.6 (CH<sub>Ar</sub>), 127.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.2 (CH<sub>Ar</sub>), 65.1 (CH<sub>2</sub>), 56.3 (CH), 38.4 (CH<sub>2</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (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 [M+H]<sup>+</sup>; found: 679.3498 (0.3 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

### Procedimiento general para la desprotección del grupo carbobenzoiloxi de los aminoácidos.

Se pesaron 693 mg del catalizador Pd/C (20% en peso) y 3465 mg del compuesto N-Z protegido (**ZVal12**, **ZVal6**, **ZPhe12** o **ZPhe6**). Seguidamente, fueron suspendidos en CH<sub>3</sub>OH (100 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'*-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide) (**HVal12**): Se obtuvo un sólido amarillo (rendimiento 95%):

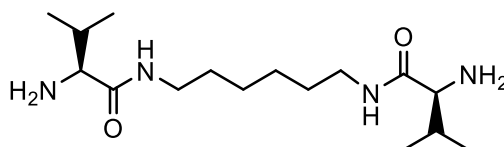


**RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  7.74 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.12 – 2.97 (m, 2H), 2.88 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 1.86 – 1.78 (m, 1H), 1.60 (s, 2H), 1.42 – 1.35 (m, 2H), 1.26 – 1.21 (m, 8H), 0.81 (dd,  $J$  = 39.1, 6.8 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  174.3 (C=O), 60.1 (CH), 38.2 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 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 [M+H]<sup>+</sup>; found: 399.3702 (0.8 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*(2S,2'S)-N,N'-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-methylbutanamide)* (**HVal6**): Se obtuvo una cera beige (rendimiento 92%):

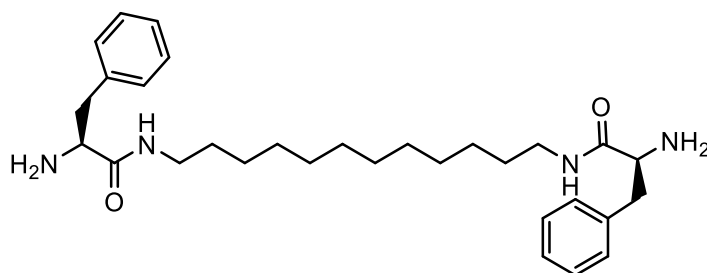


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  7.79 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.12 – 2.96 (m solapado con señal de H<sub>2</sub>O, 4H), 2.90 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 1.93 – 1.74 (m, 1H), 1.44 – 1.32 (m, 2H), 1.30 – 1.20 (m, 2H), 0.81 (dd,  $J$  = 22.2, 6.8 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  174.2 (C=O), 60.0 (CH), 38.2 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 26.1 (CH<sub>2</sub>), 19.5 (CH<sub>3</sub>), 17.2 (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 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 337.2100 (0.9 ppm) [M+Na]<sup>+</sup>.

*(2S,2'S)-N,N'-(dodecane-1,12-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)* (**HPhe12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 50%):

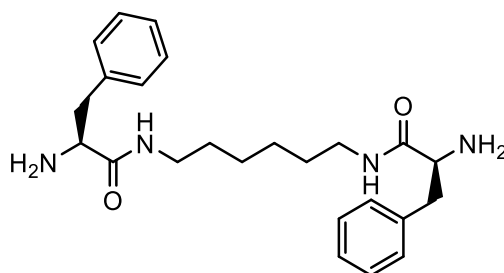


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  7.74 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.34 – 7.12 (m, 5H), 3.35 aprox. (m solapado con señal del H<sub>2</sub>O, 1H), 3.09 – 2.93 (m, 2H), 2.92 – 2.56 (m, 2H), 1.60 (s, 2H), 1.38 – 1.27 (m, 2H), 1.26 – 1.12 (m, 8H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  174.0 (C=O), 138.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.0 (2CH<sub>Ar</sub>), 125.9 (CH<sub>Ar</sub>), 56.3 (CH), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (2CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 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 [M+H]<sup>+</sup>; found: 495.3699 (0.0 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*(2S,2'S)-N,N'-(hexane-1,6-diyl)bis(2-amino-3-phenylpropanamide)* (**HPhe6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 46%):



**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  7.83 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.28 – 7.16 (m, 5H), 3.31 aprox. (m solapado con señal del H<sub>2</sub>O, 1H), 3.07 – 2.95 (m, 2H), 2.93 – 2.54 (m, 2H), 2.15 (s, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H), 1.18 – 1.08 (m, 2H).

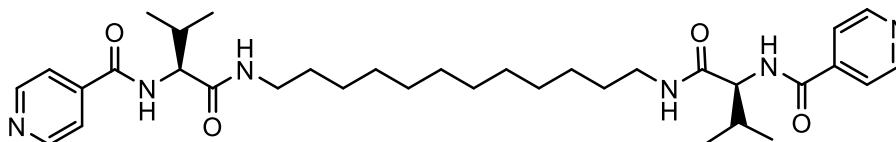
**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  173.8 (C=O), 138.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 127.9 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.0 (CH<sub>Ar</sub>), 56.2 (CH), 41.1 (CH<sub>2</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:**  $m/z$ : calcd for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 411.2760 [M+H]<sup>+</sup>; found: 411.2765 (1.2 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

## Procedimiento general para el acoplamiento entre las aminas y el ácido isonicotínico.

A una disolución de la respectiva diamina (**HVal12**, **HVal6**, **HPhe12** y **HPhe6**) (5.37 mmol) en cloroformo (250 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se le añadió secuencialmente: el ácido isonicotínico (21.48 mmol, 2.0 eq.), el TBTU (22.02 mmol, 2.1 eq.) y la DIPEA (22.02 mmol, 2.1 eq.). La mezcla se agitó vigorosamente durante 16 h a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno. Después de este tiempo, el disolvente de la mezcla se eliminó bajo presión reducida y el residuo crudo se lavó primero con NaOH 0.1 M (250 mL), después con salmuera (250 mL) y finalmente con agua destilada (50 mL). El sólido obtenido se secó en estufa de vacío durante 16 h a 50 °C.

*N,N'*-((2*S*,2'*S*)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))diisonicotinamide (**PyVal12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 44%):

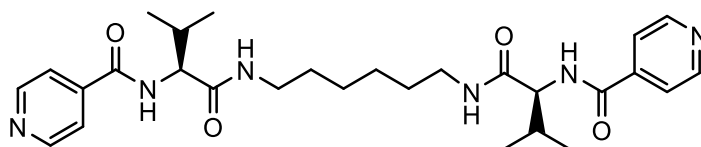


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  8.70 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 8.63 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 8.09 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.24 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.15 – 2.96 (m, 2H), 2.18 – 2.05 (m, 1H), 1.43 – 1.35 (m, 2H), 1.27 – 1.16 (m, 8H), 0.90 (dd,  $J = 6.6, 3.6$  Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  170.4 (C=O), 164.9 (C=O), 150.0 (2CH<sub>Ar</sub>), 141.2 (C<sub>Ar</sub>), 121.6 (2CH<sub>Ar</sub>), 59.4 (CH), 38.4 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (2CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 19.2 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (CH<sub>3</sub>).

*N,N'*-((2*S*,2'*S*)-(hexane-1,6-diylbis(azanediyl))bis(3-methyl-1-oxobutane-1,2-diyl))diisonicotinamide (**PyVal6**): Se obtuvo una cera beige (rendimiento 86%):



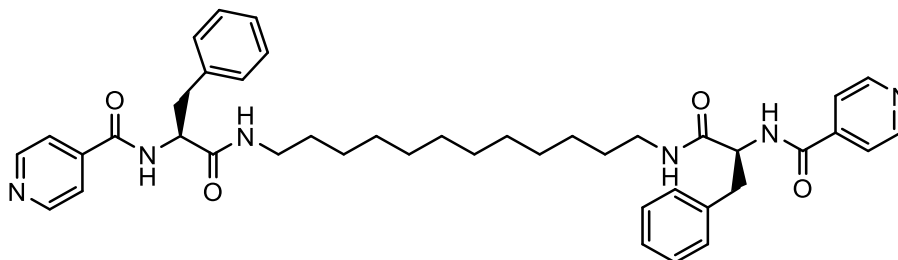


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  8.70 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 8.62 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 8.08 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 4.23 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 3.18 – 2.91 (m, 2H), 2.17 – 2.03 (m, 1H), 1.44 – 1.33 (m, 2H), 1.30 – 1.19 (m, 2H), 0.90 (dd,  $J$  = 6.7, 3.8 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  170.5 (C=O), 164.9 (C=O), 150.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 141.2 (C<sub>Ar</sub>), 121.6 (2CH<sub>Ar</sub>), 59.4 (CH), 38.4 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>), 19.3 (CH<sub>3</sub>), 18.9 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:**  $m/z$ : calcd for C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 525.3189 [M+H]<sup>+</sup>; found: 525.3192 (0.6 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*N,N'*-((2*S*,2'*S*)-(dodecane-1,12-diylbis(azanediyl))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))diisonicotinamide (**PyPhe12**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 82%):

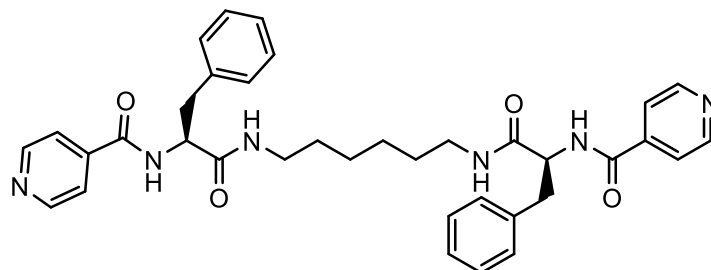


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  8.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.68 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 2H), 8.08 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 2H), 7.37 – 7.11 (m, 5H), 4.66 (td,  $J$  = 9.1, 5.0 Hz, 1H), 3.16 – 2.95 (m, 4H), 1.41 – 1.32 (m, 2H), 1.28 – 1.17 (m, 8H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  170.6 (C=O), 164.6 (C=O), 150.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 140.9 (C<sub>Ar</sub>), 138.2 (C<sub>Ar</sub>), 129.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.0 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.2 (CH<sub>Ar</sub>), 121.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 55.1 (CH), 38.6 (CH<sub>2</sub>), 37.4 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (2CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:**  $m/z$ : calcd for C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 705.4128 [M+H]<sup>+</sup>; found: 705.4116 (1.7 ppm) [M+H]<sup>+</sup>.

*N,N'*-((2*S*,2'*S*)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(1-oxo-3-phenylpropane-1,2-diyl))diisonicotinamide (**PyPhe6**): Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 63%):

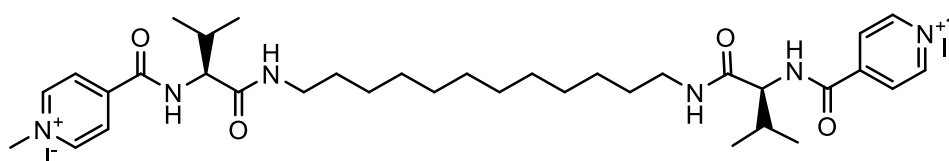


**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  8.89 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.70 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H), 8.10 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 7.39 – 7.10 (m, 5H), 4.76 – 4.61 (m, 1H), 3.22 – 2.88 (m, 4H), 1.46 – 1.31 (m, 2H), 1.29 – 1.15 (m, 2H).

#### Procedimiento general para la metilación del nitrógeno aromático.

A una disolución de la respectiva amina (4.63 mmol; **PyVal12**, **PyVal6**, **PyPhe12** o **PyPhe6**) en CH<sub>3</sub>CN (150 mL) o en una mezcla 1:1 de CH<sub>3</sub>CN/CHCl<sub>3</sub> (150 mL), se le añadieron 11 mL de yoduro de metilo comercialmente disponible (172 mmol, 74 eq.). La mezcla se agitó durante 16 horas a 65 °C y bajo atmósfera de nitrógeno. Después de este tiempo, la disolución se concentró bajo presión reducida y el residuo crudo se dejó a vacío durante 3 h.

*4,4'*-((3*S*,20*S*)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide (**MePyVal12-I**): Se obtuvo un sólido naranja (rendimiento 98%):

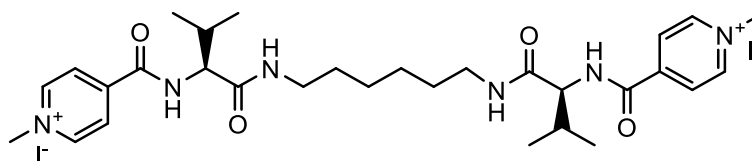


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 9.04 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.53 (s, 3H), 4.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.41 – 3.21 (m, 2H), 2.27 – 2.16 (m, 1H), 1.67 – 1.54 (m, 2H), 1.46 – 1.23 (m, 8H), 1.09 (dd, *J* = 13.2, 6.7 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 171.6 (C=O), 164.3 (C=O), 147.5 (C<sub>Ar</sub>), 145.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 125.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 60.4 (CH), 47.6 (CH<sub>3</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH<sub>2</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>), 27.3 (CH<sub>2</sub>), 25.1 (CH<sub>2</sub>), 17.5 (CH<sub>3</sub>), 17.4 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 319.2260 [M+2H]<sup>2+</sup>; found: 319.2259 (0.3 ppm) [M+2H]<sup>2+</sup>.

*4,4'-((3S,14S)-3,14-diisopropyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide (MePyVal6-I):* Se obtuvo un sólido naranja (rendimiento 98%):

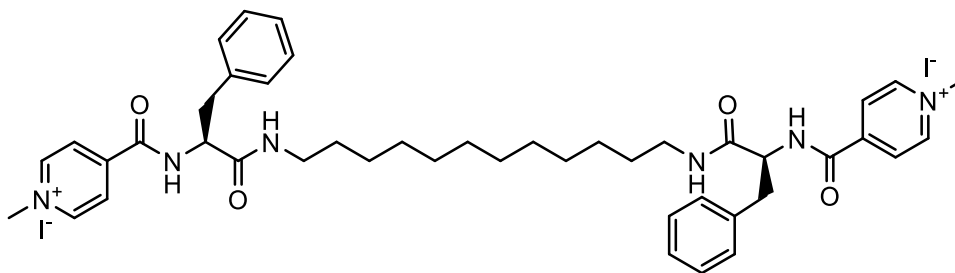


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 9.04 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.53 (s, 3H), 4.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.42 – 3.20 (m, 2H), 2.30 – 2.16 (m, 1H), 1.65 – 1.56 (m, 2H), 1.45 – 1.38 (m, 2H), 1.09 (dd, *J* = 15.1, 6.7 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, D<sub>2</sub>O):** δ 171.6 (C=O), 164.3 (C=O), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 145.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 125.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 60.3 (CH), 47.6 (CH<sub>3</sub>), 38.3 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>), 17.4 (CH<sub>3</sub>), 17.3 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 277.1790 [M]<sup>2+</sup>; found: 277.1786 (1.4 ppm) [M]<sup>2+</sup>.

*4,4'-((3S,20S)-3,20-dibenzyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide (MePyPhe12-I):* Se obtuvo un sólido naranja (rendimiento 98%):

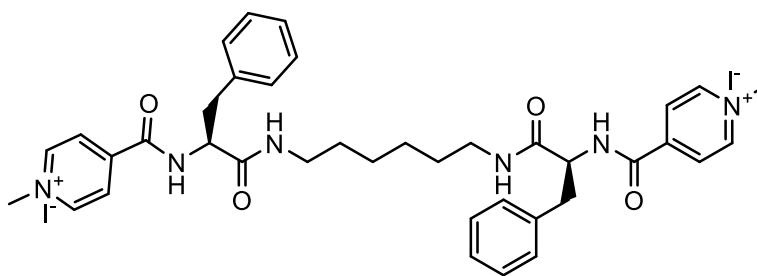


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  9.39 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 9.06 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 8.29 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 8.18 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 7.35 – 7.11 (m, 5H), 4.76 – 4.67 (m, 1H), 4.36 (s, 3H), 3.16 – 2.90 (m, 4H), 1.42 – 1.31 (m, 2H), 1.29 – 1.13 (m, 8H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  170.2 (C=O), 161.9 (C=O), 147.4 (C<sub>Ar</sub>), 146.5 (2CH<sub>Ar</sub>), 137.8 (C<sub>Ar</sub>), 129.2 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.6 (CH<sub>Ar</sub>), 125.5 (2CH<sub>Ar</sub>), 55.5 (CH), 48.3 (CH<sub>3</sub>), 38.8 (CH<sub>2</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (2CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:**  $m/z$ : calcd for C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 367.2260 [M]<sup>2+</sup>; found: 367.2255 (1.3 ppm) [M]<sup>2+</sup>.

*4,4'*-((3*S*,14*S*)-3,14-dibenzyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)iodide (**MePyPhe6-I**): Se obtuvo un sólido naranja (rendimiento 98%):



**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  9.41 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 9.10 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 8.31 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 8.19 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.36 – 7.10 (m, 5H), 4.73 (td,  $J$  = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 4.37 (s, 3H), 3.20 – 2.89 (m, 4H), 1.43 – 1.31 (m, 2H), 1.26 – 1.16 (m, 2H).

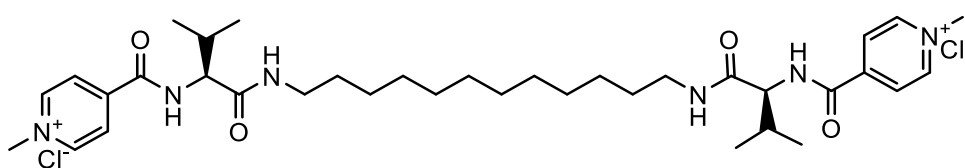
**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  170.02 (C=O), 161.77 (C=O), 147.27 (C<sub>Ar</sub>), 146.45 (2CH<sub>Ar</sub>), 137.72 (C<sub>Ar</sub>), 129.10 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.13 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.42 (CH<sub>Ar</sub>), 125.38 (2CH<sub>Ar</sub>), 55.33 (CH), 48.12 (CH<sub>3</sub>), 38.62 (CH<sub>2</sub>), 37.56 (CH<sub>2</sub>), 28.92 (CH<sub>2</sub>), 26.02 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 325.1790 [M]<sup>2+</sup>; found: 325.1786 (1.2 ppm) [M]<sup>2+</sup>.

### Procedimiento general para la preparación de los compuestos finales (intercambio del yoduro por cloruro).

A una disolución de la respectiva amina metilada (4.63 mmol, **MePyVal12-I**, **MePyVal6-I**, **MePyPhe12-I** o **MePyPhe6-I**) en CH<sub>3</sub>OH (150 mL) se le añadió 3780 mg de amberlite IRA-402, 52.1% de cloruros (6 eq. de Cl<sup>-</sup>). La mezcla se agitó vigorosamente durante 4 o 16 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la disolución se filtró a gravedad y la solución obtenida se concentró bajo presión reducida y el residuo crudo se dejó a vacío durante 3 h.

*4,4'-((3*S*,20*S*)-3,20-diisopropyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride* (**MePyVal12-Cl**): Se obtuvo un sólido amarillo (rendimiento 88%):

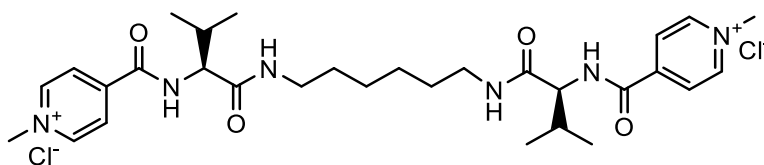


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  9.04 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.53 (s, 3H), 4.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 3.40 – 3.22 (m, 1H), 2.34 – 2.12 (m, 1H), 1.65 – 1.55 (m, 2H), 1.43 – 1.24 (m, 8H), 1.09 (dd, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  172.5 (C=O), 165.2 (C=O), 148.4 (C<sub>Ar</sub>), 146.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 61.3 (CH), 48.5 (CH<sub>3</sub>), 39.4 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (CH<sub>2</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for  $C_{36}H_{58}N_6O_4^{2+}$ : 319.2260  $[M+2H]^{2+}$ ; found: 319.2259 (0.3 ppm)  $[M+2H]^{2+}$ .

*4,4'-((3S,14S)-3,14-diisopropyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride (MePyVal6-Cl):* Se obtuvo un sólido amarillo (rendimiento 98%):

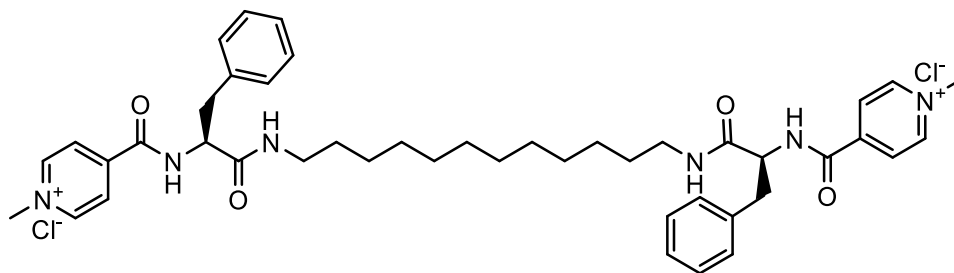


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  9.04 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 8.39 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 4.53 (s, 3H), 4.30 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 3.39 – 3.22 (m, 2H), 2.33 – 2.16 (m, 1H), 1.65 – 1.56 (m, 2H), 1.45 – 1.39 (m, 2H), 1.09 (dd,  $J$  = 15.1, 6.7 Hz, 6H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  172.6 (C=O), 165.3 (C=O), 148.4 (C<sub>Ar</sub>), 146.3 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 61.3 (CH), 48.5 (CH<sub>3</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (CH), 28.2 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (CH<sub>3</sub>).

**HR ESMS:** m/z: calcd for  $C_{30}H_{46}N_6O_4^{2+}$ : 277.1790  $[M]^{2+}$ ; found: 277.1786 (1.4 ppm)  $[M]^{2+}$ .

*4,4'-((3S,20S)-3,20-dibenzyl-4,19-dioxo-2,5,18,21-tetraazadocosanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride (MePyPhe12-Cl):* Se obtuvo un sólido amarillo (rendimiento 98%):

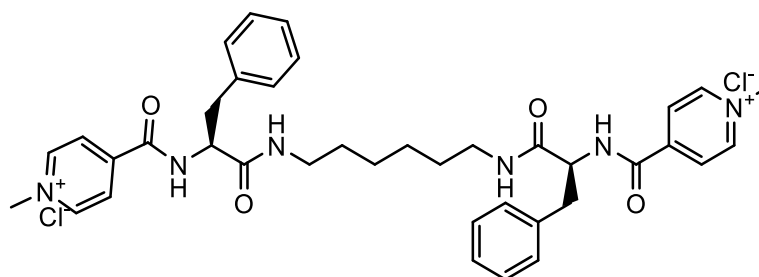


**RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 9.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.33 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.36 – 7.14 (m, 5H), 4.73 (td, *J* = 10.1, 4.8 Hz, 1H), 4.39 (s, 3H), 3.20 – 2.97 (m, 4H), 1.44 – 1.34 (m, 2H), 1.29 – 1.20 (m, 8H).

**RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*6):** δ 170.1 (C=O), 161.6 (C=O), 147.2 (C<sub>Ar</sub>), 146.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>), 129.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.3 (CH<sub>Ar</sub>), 125.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 55.6 (CH), 48.0 (CH<sub>3</sub>), 38.6 (CH<sub>2</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (2CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 367.2260 [M]<sup>2+</sup>; found: 367.2255 (1.3 ppm) [M]<sup>2+</sup>.

*4,4'-((3*S*,14*S*)-3,14-dibenzyl-4,13-dioxo-2,5,12,15-tetraazahexadecanedioyl)bis(1-methylpyridin-1-ium)chloride (MePyPhe6-Cl):* Se obtuvo un sólido amarillo (rendimiento 98%):



**RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*6):** δ 9.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 9.13 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.38 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.33 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.10 (m, 5H), 4.72 (td, *J* = 10.1, 4.8 Hz, 1H), 4.38 (s, 3H), 3.20 – 2.93 (m, 4H), 1.44 – 1.32 (m, 2H), 1.29 – 1.16 (m, 2H).

**RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*6):** δ 170.1 (C=O), 161.7 (C=O), 147.2 (C<sub>Ar</sub>), 146.5 (2CH<sub>Ar</sub>), 137.9 (C<sub>Ar</sub>), 129.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 128.1 (2CH<sub>Ar</sub>), 126.4 (CH<sub>Ar</sub>), 125.4 (2CH<sub>Ar</sub>), 55.6 (CH), 48.0 (CH<sub>3</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>).

**HR ESMS:** *m/z*: calcd for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>2+</sup>: 325.1790 [M]<sup>2+</sup>; found: 325.1786 (1.2 ppm) [M]<sup>2+</sup>.

## Fluorescencia y absorbancia

Las propiedades de absorbancia y fluorescencia se midieron con un espectrofotómetro JASCO V-630 UV-Vis y un fluorímetro JASCO FP-8300, ambos equipados con un accesorio Peltier a 25 °C. Las medidas se hicieron con cubetas de plástico óptico (PMMA), marca Hellma Analytics de 3 mL de capacidad y 10 mm de paso óptico.

## 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 tintar 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.

## 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 partícula se reportó como un promedio de seis mediciones.



## Preparación general de las muestras

Como ejemplo representativo, se evaporaron 160  $\mu\text{L}$  de soluciones madre de 50 mM de MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6 en  $\text{CH}_3\text{OH}$  en viales por separado a bajo vacío. Los sólidos resultantes se resuspendieron luego en 2 mL de agua destilada (para DLS y TEM, el agua destilada se filtró a través de un filtro de malla de acetato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ ). La mezcla se sonicó durante aproximadamente 15 minutos hasta obtener una solución.

## 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 0.1 hasta 4 mM para MePyVal12; y desde 0.0125 hasta 4 mM para MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6) evaporando el disolvente y obteniendo la cantidad deseada del compuesto a partir de las soluciones madre en metanol, junto con 20  $\mu\text{L}$  de una solución stock de NR de 0.2 mM en etanol. La mezcla seca se redisolvió luego en 2 mL de agua destilada y se sonicó durante aproximadamente cinco minutos. Las soluciones de NR se excitaban a 505 y 520 nm (para MePyVal6 y el resto de los compuestos, respectivamente), y el espectro de emisión se registraba de 515 y 540 nm a 750 nm, respectivamente. La relación de intensidad del pico (610, 548, 556 y 573 nm para MePyVal12, MePyVal6, MePyPhe12 y MePyPhe6, respectivamente) se representó frente a las concentraciones de compuesto utilizado.

## Interacción de los compuestos con el ADN

La interacción de los compuestos con el ADN se determinó por fluorescencia utilizando tioflavina T (ThT) como sonda fluorescente. Se prepararon dos concentraciones de cada compuesto (10% CAC y  $\frac{1}{2}$  CAC) evaporando el disolvente, obteniendo la cantidad deseada del compuesto a partir de las soluciones madre en metanol y redisolviendo a continuación en 1 mL de agua destilada, sonicándola durante cinco minutos aproximadamente. Por otro lado, se preparó una mezcla de ADN de bajo peso molecular de salmón 0.25 mg/mL y ThT 30  $\mu\text{M}$ , previamente atemperado y sonicado durante unos 5 minutos, obtenidos a partir de las respectivas soluciones en agua de ADN 0.5 mg/mL y ThT 600  $\mu\text{M}$ . Se añadió 1 mL de esta

mezcla a cada una de las soluciones de compuestos previamente preparadas y se excitaron a 440 nm, recogiendo el espectro de emisión de 450 a 680 nm.

## Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria de los compuestos MePyVal12 y MePyPhe6 se determinó mediante un método de dilución en caldo de antifúngicos para levaduras basado en la preparación de las soluciones de antifúngico (MePyVal12 y MePyPhe6 4 mM en 1 mL de agua destilada) en 50  $\mu$ L de volumen por pocillo más la adición de otros 50  $\mu$ L de inóculo. La técnica se realizó en una placa de microdilución de 96 pocillos con fondo plano. Para preparar el medio de cultivo se utilizó el medio caldo Sabouraud dextrosa con concentración 2x para permitir una dilución del 50% después de la adición del inóculo. Se pesó el medio deshidratado y se le añadió agua destilada, se agitó hasta quedar todo el medio hidratado y homogéneo y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El inóculo ( $0.5 \cdot 10^5 - 2.5 \cdot 10^5$  UFC/mL) se preparó mediante suspensión en agua destilada estéril de una colonia (*Saccharomyces cerevisiae*), obtenida de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo.

En la placa de microdilución, se añadió cada uno de los compuestos (MePyVal12, MePyPhe6), el volumen requerido de medio, se realizó la suspensión de colonias y se inoculó inmediatamente después. Se inoculó cada pocillo de la placa con 50  $\mu$ L de la suspensión de levaduras a una concentración de  $1 - 5 \cdot 10^5$  UFC/mL, obteniendo tanto la concentración requerida de fármaco como la densidad del inóculo ( $0.5 \cdot 10^5 - 2.5 \cdot 10^5$  UFC/mL). Se prepararon también los pocillos correspondientes al control de crecimiento positivo con 50  $\mu$ L de inóculo y 50  $\mu$ L del medio estéril sin fármaco; y los correspondientes al control negativo con 50  $\mu$ L de agua estéril destilada y 50  $\mu$ L de medio sin fármaco.

Se incubó la placa de microdilución a 35 °C sin agitación durante 48 horas y transcurrido ese tiempo, se leyó en un lector de placas. La longitud de onda utilizada para medir la absorbancia fue 450 nm.

# **Bibliografía**

## Bibliografía

- (1) Su, S.; Kang, P. M. Recent Advances in Nanocarrier-Assisted Therapeutics Delivery Systems. *Pharmaceutics*. MDPI AG September 1, 2020, pp 1–27. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090837>.
- (2) Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano. Lett.* **2010**, *10* (9), 3223–3230. [https://doi.org/10.1021/NL102184C/ASSET/IMAGES/LARGE/NL-2010-02184C\\_0002.JPEG](https://doi.org/10.1021/NL102184C/ASSET/IMAGES/LARGE/NL-2010-02184C_0002.JPEG).
- (3) Chenthamara, D.; Subramaniam, S.; Ramakrishnan, S. G.; Krishnaswamy, S.; Essa, M. M.; Lin, F. H.; Qoronfleh, M. W. Therapeutic Efficacy of Nanoparticles and Routes of Administration. *Biomater. Res.* **2019**, *23* (1). <https://doi.org/10.1186/S40824-019-0166-X/ASSET/680F39BA-397D-41A3-9DD5-2BB07C0BDA88/ASSETS/GRAPHIC/S40824-019-0166-X.FIG.012.PNG>.
- (4) Gunasekaran, T.; Haile, T.; Nigusse, T.; Dhanaraju, M. D. Nanotechnology: An Effective Tool for Enhancing Bioavailability and Bioactivity of Phytomedicine. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, S1–S7. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C980>.
- (5) Shen, Z.; Nieh, M. P.; Li, Y. Decorating Nanoparticle Surface for Targeted Drug Delivery: Opportunities and Challenges. *Polymers 2016, Vol. 8, Page 83* **2016**, *8* (3), 83. <https://doi.org/10.3390/POLYM8030083>.
- (6) Li, F.; Qin, Y.; Lee, J.; Liao, H.; Wang, N.; Davis, T. P.; Qiao, R.; Ling, D. Stimuli-Responsive Nano-Assemblies for Remotely Controlled Drug Delivery. *J. Control. Release* **2020**, *322*, 566–592. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.051>.
- (7) Gregoriadis, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295* (13), 704–710. <https://doi.org/10.1056/NEJM197609232951305>.
- (8) Gregoriadis, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295* (14), 765–770. <https://doi.org/10.1056/NEJM197609302951406>.

- (9) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.037>.
- (10) D’Mello, S. R.; Cruz, C. N.; Chen, M. L.; Kapoor, M.; Lee, S. L.; Tyner, K. M. The Evolving Landscape of Drug Products Containing Nanomaterials in the United States. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, *12:6* **2017**, *12* (6), 523–529. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.67>.
- (11) Li, F.; Qin, Y.; Lee, J.; Liao, H.; Wang, N.; Davis, T. P.; Qiao, R.; Ling, D. Stimuli-Responsive Nano-Assemblies for Remotely Controlled Drug Delivery. *J. Control. Release* **2020**, *322*, 566–592. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.051>.
- (12) Engelberth, S. A.; Hempel, N.; Bergkvist, M. Development of Nanoscale Approaches for Ovarian Cancer Therapeutics and Diagnostics. *Crit. Rev. Oncog.* **2014**, *19* (3–4), 281–316. <https://doi.org/10.1615/CRITREVONCOG.2014011455>.
- (13) Mahapatro, A.; Singh, D. K. Biodegradable Nanoparticles Are Excellent Vehicle for Site Directed In-Vivo Delivery of Drugs and Vaccines. *J. Nanobiotechnol.* **2011**, *9* (1), 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55/FIGURES/8>.
- (14) Tokarska, K.; Lamch, Ł.; Piechota, B.; Żukowski, K.; Chudy, M.; Wilk, K. A.; Brzózka, Z. Co-Delivery of IR-768 and Daunorubicin Using MPEG-b-PLGA Micelles for Synergistic Enhancement of Combination Therapy of Melanoma. *J Photochem. Photobiol. B* **2020**, *211*. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.111981>.
- (15) Ghezzi, M.; Pescina, S.; Padula, C.; Santi, P.; Del Favero, E.; Cantù, L.; Nicoli, S. Polymeric Micelles in Drug Delivery: An Insight of the Techniques for Their Characterization and Assessment in Biorelevant Conditions. *J. Control. Release* **2021**, *332*, 312–336. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.02.031>.
- (16) Ewert, K. K.; Scodeller, P.; Simón-Gracia, L.; Steffes, V. M.; Wonder, E. A.; Teesalu, T.; Safinya, C. R. Cationic Liposomes as Vectors for Nucleic Acid and Hydrophobic Drug Therapeutics. *Pharmaceutics*. MDPI **2021**. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091365>.

- (17) Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D. Evidence for the Role of Proteoglycans in Cation-Mediated Gene Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (22), 12349–12354. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.22.12349>.
- (18) Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. New Structures in Complex Formation between DNA and Cationic Liposomes Visualized by Freeze—Fracture Electron Microscopy. *FEBS Lett.* **1994**, *356* (2–3), 361–366. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01315-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01315-2).
- (19) Leventis, R.; Silviu, J. R. Interactions of Mammalian Cells with Lipid Dispersions Containing Novel Metabolizable Cationic Amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1990**, *1023* (1), 124–132. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90017-I](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90017-I).
- (20) Ewert, K.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Schmidt, H. W.; Safinya, C. R. Efficient Synthesis and Cell-Transfection Properties of a New Multivalent Cationic Lipid for Nonviral Gene Delivery. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (23), 5023–5029. <https://doi.org/10.1021/JM020233W/ASSET/IMAGES/LARGE/JM020233WF00006.JPEG>.
- (21) Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. Cationic Lipid Saturation Influences Intracellular Delivery of Encapsulated Nucleic Acids. *J. Control. Release* **2005**, *107* (2), 276–287. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2005.06.014>.
- (22) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.21.7413>.
- (23) Kawakami, S.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Hashida, M. In Vivo Gene Delivery to the Liver Using Novel Galactosylated Cationic Liposomes. *Pharm. Res.* **2000**, *17* (3), 306–313. <https://doi.org/10.1023/A:1007501122611/METRICS>.
- (24) Bernal-Martínez, A. M.; Angulo-Pachón, C. A.; Galindo, F.; Miravet, J. F. Reduction-Responsive Cationic Vesicles from Bolaamphiphiles with Ionizable Amino Acid or Dipeptide Polar Heads. *Langmuir* **2023**, *39* (39), 13841–13849. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c01294>.

- (25) 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/BIBTEX>.
- (26) Fuhrhop, J. H.; Fritsch, D.; Tesche, B.; Schmiady, H. Water-Soluble  $\alpha,\omega$ -Bis(Paraquat) Amphiphiles Form Monolayer Membrane Vesicles, Micelles, and Crystals by Stepwise Anion Exchange or Photochemical Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (7), 1998–2001. [https://doi.org/10.1021/JA00319A018/ASSET/JA00319A018.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/JA00319A018/ASSET/JA00319A018.FP.PNG_V03).
- (27) Sano, M.; Oishi, K.; Ishii, T.; Shinkai, S. Vesicle Formation and Its Fractal Distribution by Bola-Amphiphilic [60]Fullerene. *Langmuir* **2000**, *16* (8), 3773–3776. <https://doi.org/10.1021/la991550h>.
- (28) Weissig, V.; Lasch, J.; Erdos, G.; Meyer, H. W.; Rowe, T. C.; Hughes, J. DQAsomes: A Novel Potential Drug and Gene Delivery System Made from Dequalinium(TM). *Pharm. Res.* **1998**, *15* (2), 334–337. <https://doi.org/10.1023/A:1011991307631/METRICS>.
- (29) Taira, M. C.; Chiaramoni, N. S.; Pecuch, K. M.; Alonso-Romanowski, S. Stability of Liposomal Formulations in Physiological Conditions for Oral Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2004**, *11* (2), 123–128. <https://doi.org/10.1080/10717540490280769>.
- (30) Esposto, B. S.; Jauregi, P.; Tapia-Blácido, D. R.; Martelli-Tosi, M. Liposomes vs. Chitosomes: Encapsulating Food Bioactives. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *108*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.12.003>.
- (31) Verma, S.; Ravichandiran, V.; Ranjan, N. Beyond Amyloid Proteins: Thioflavin T in Nucleic Acid Recognition. *Biochimie* **2021**, *190*, 111–123. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.06.003>.

# Anexo



## Anexo

## Espectros RMN

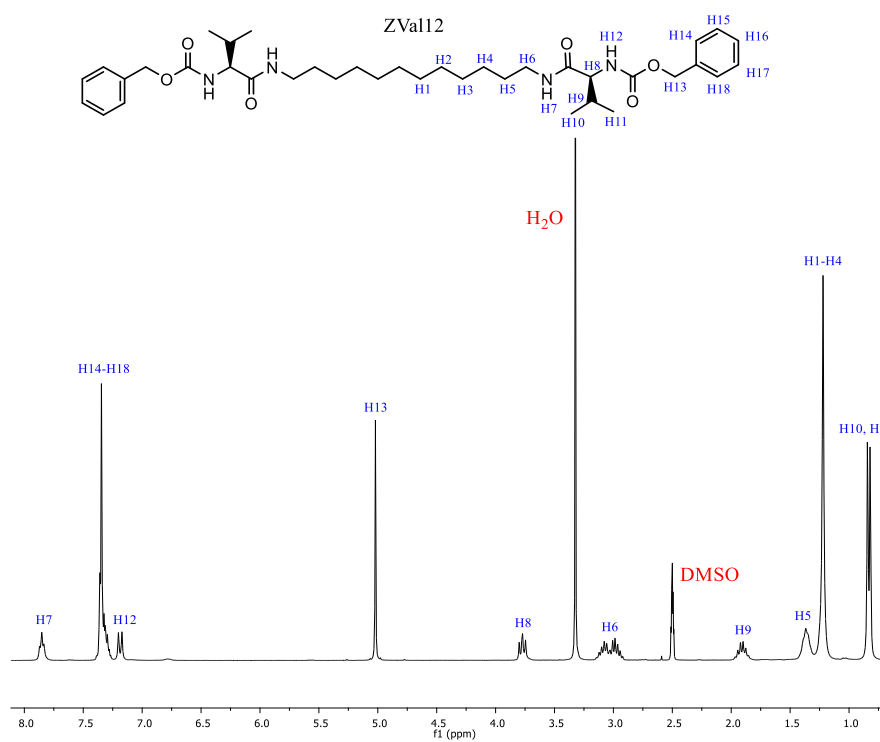


Figura 7.1. Espectro RMN- $^1\text{H}$  ZVal12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

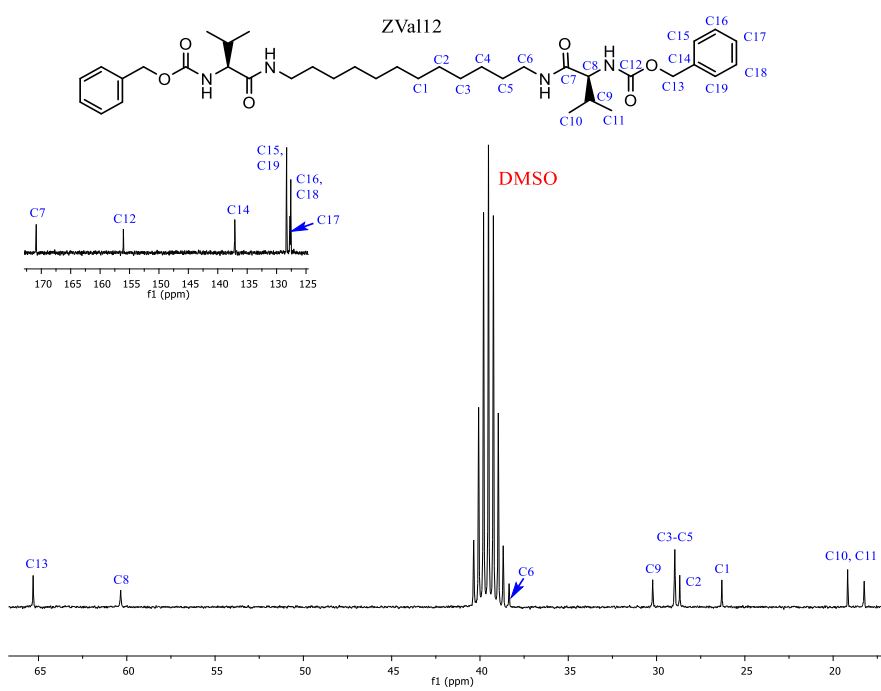
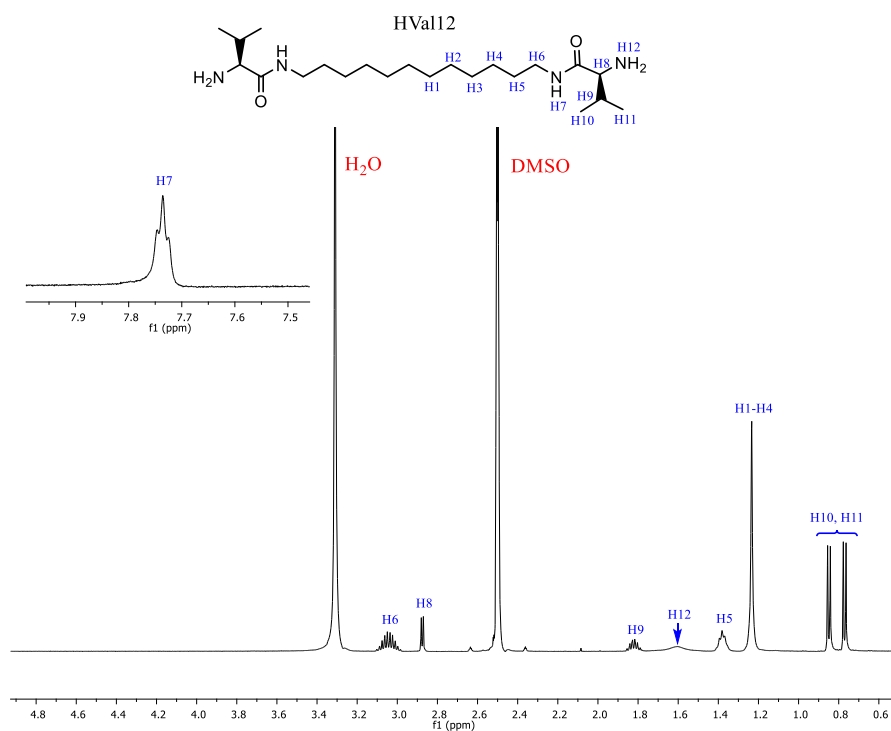
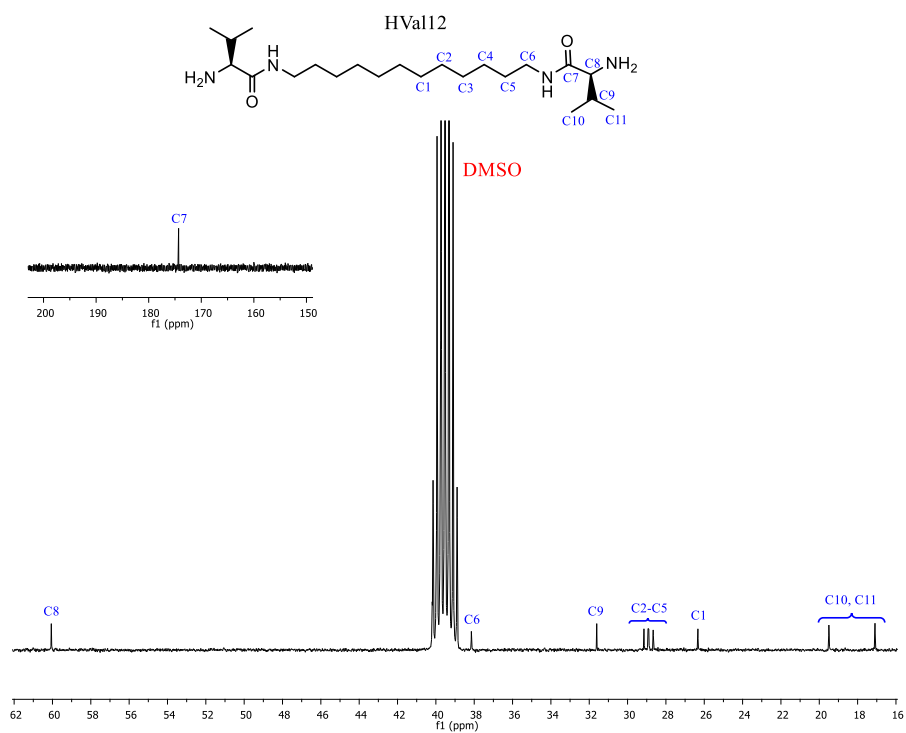


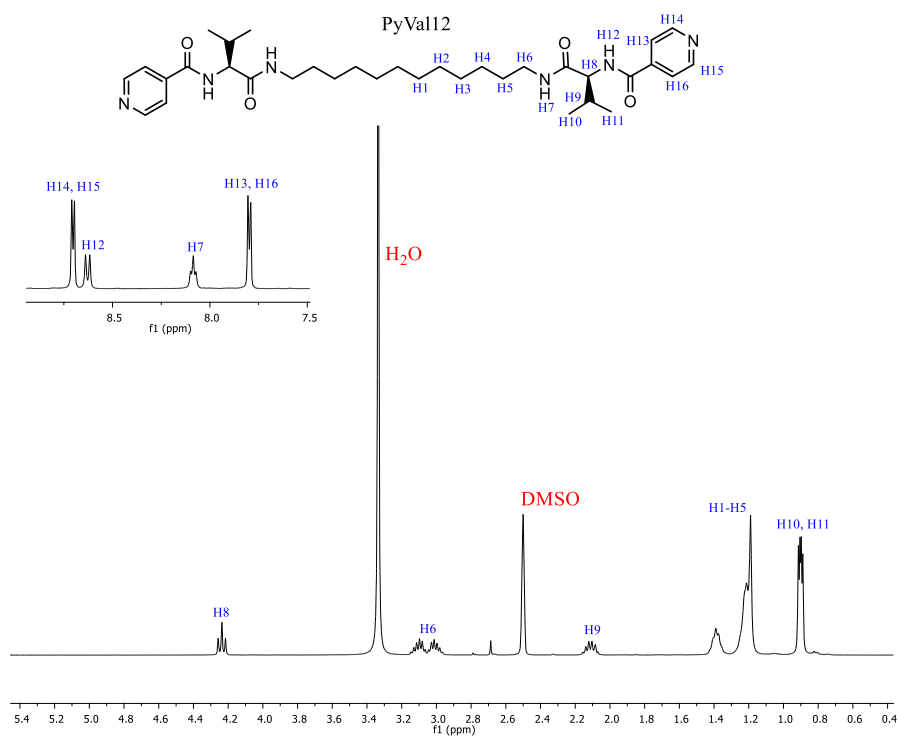
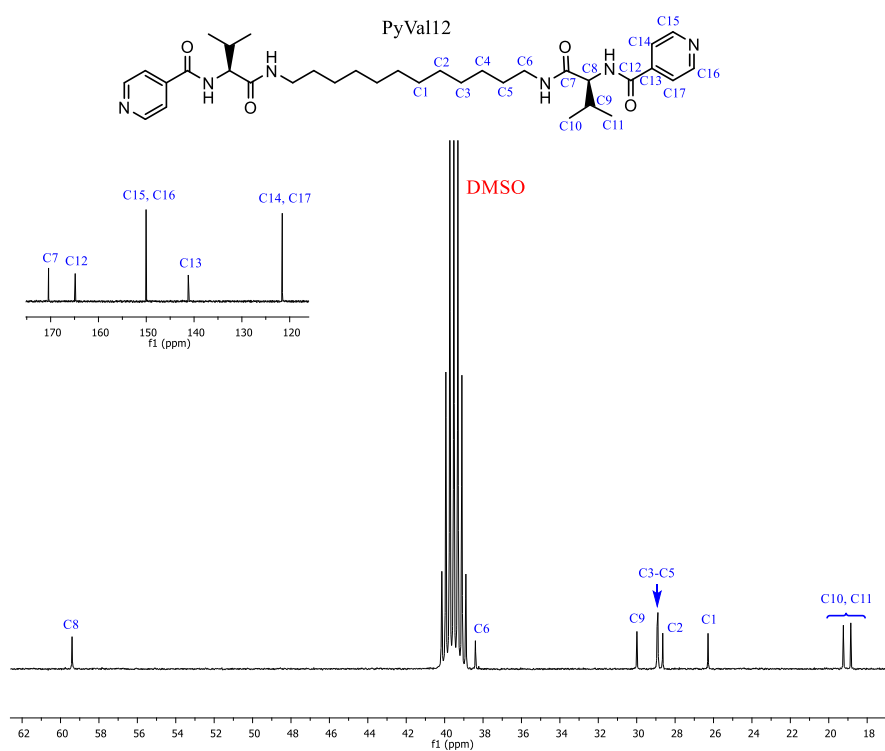
Figura 7.2. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de ZVal12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

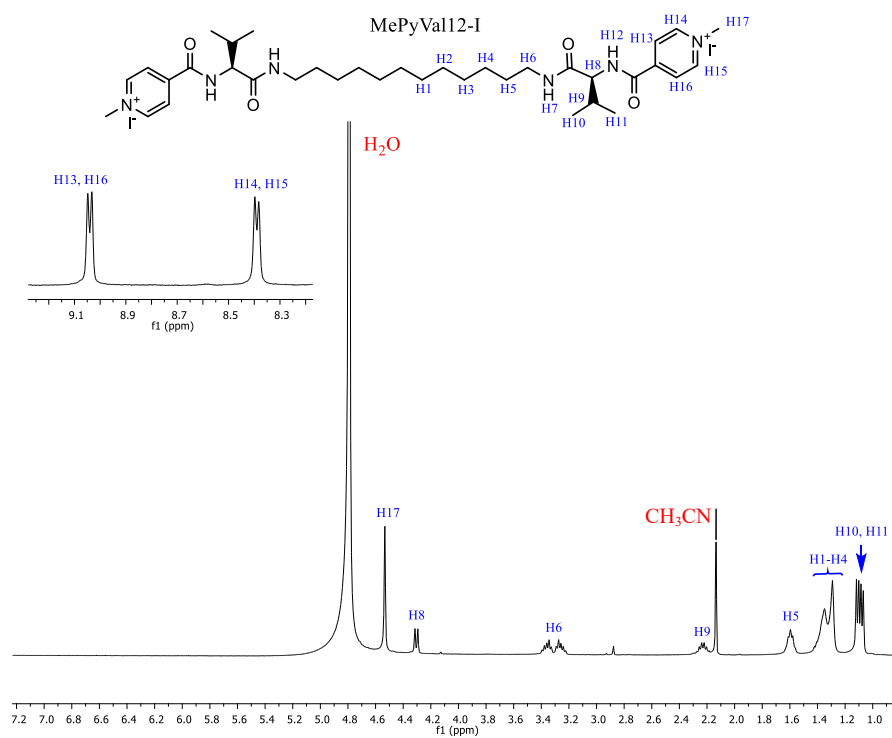


**Figura 7.3.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de HVal12 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

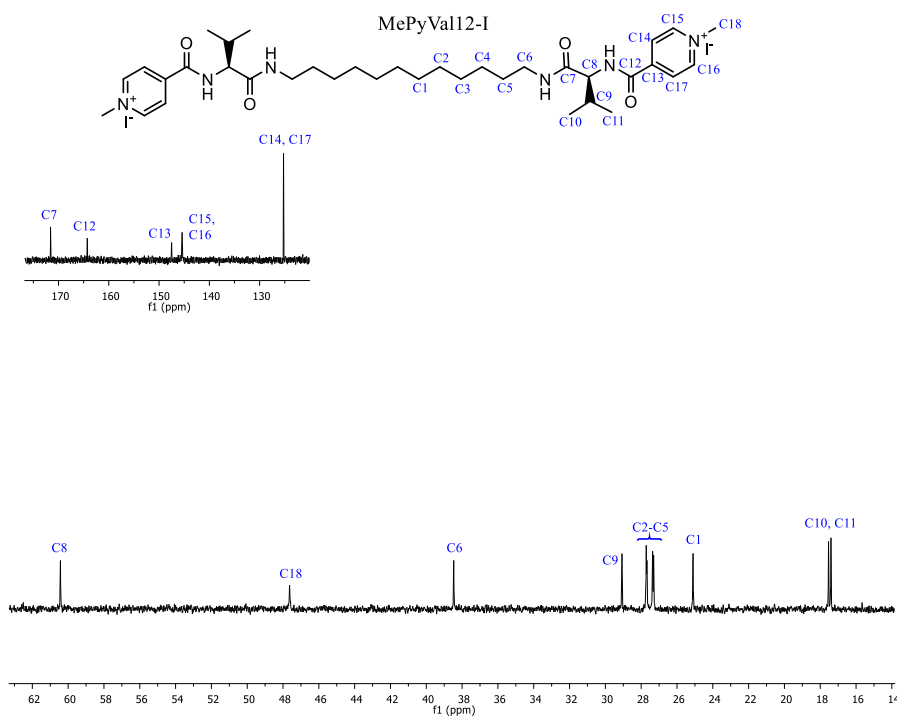


**Figura 7.4.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C de HVal12 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

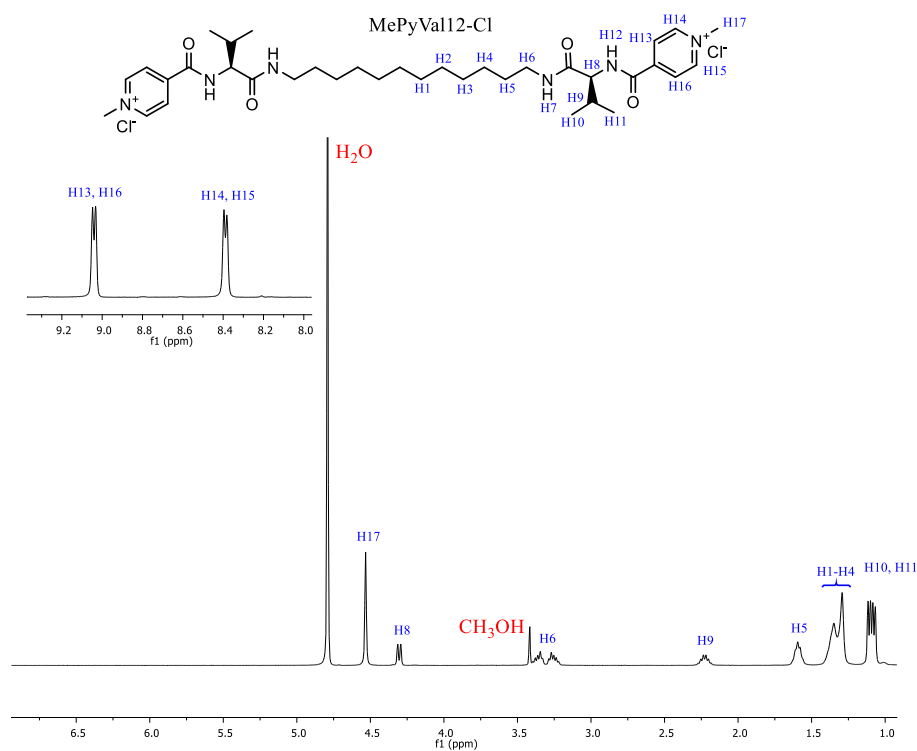
Figura 7.5. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PyVal12 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.Figura 7.6. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PyVal12 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.



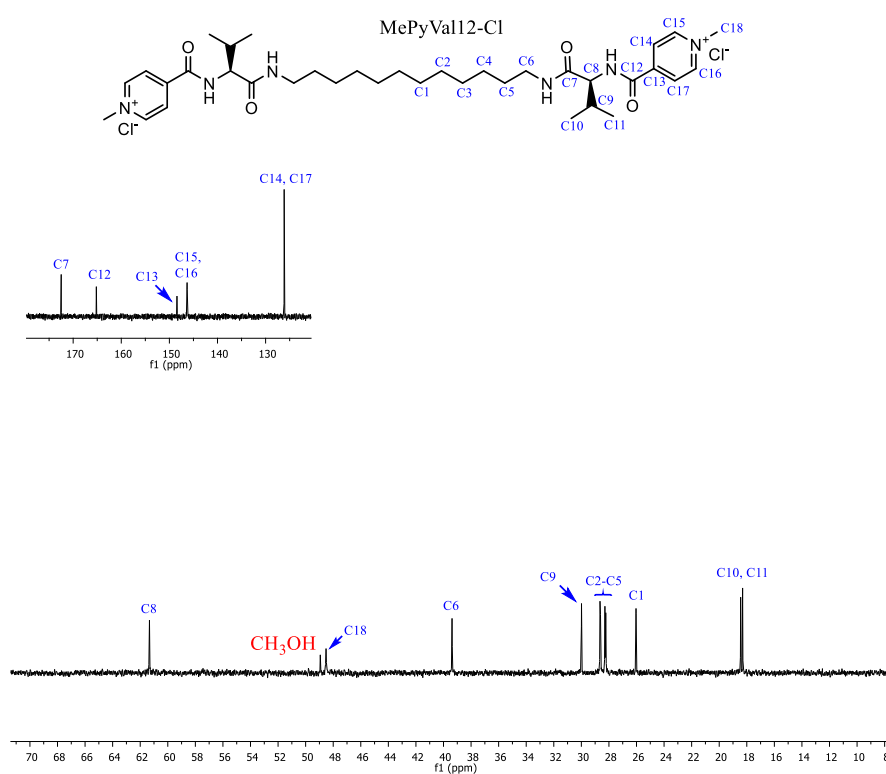
**Figura 7.7.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyVal12-I en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 7.8.** Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyVal12-I en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 7.9.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de MePyVal12-Cl en D<sub>2</sub>O.



**Figura 7.10.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C de MePyVal12-Cl en D<sub>2</sub>O.

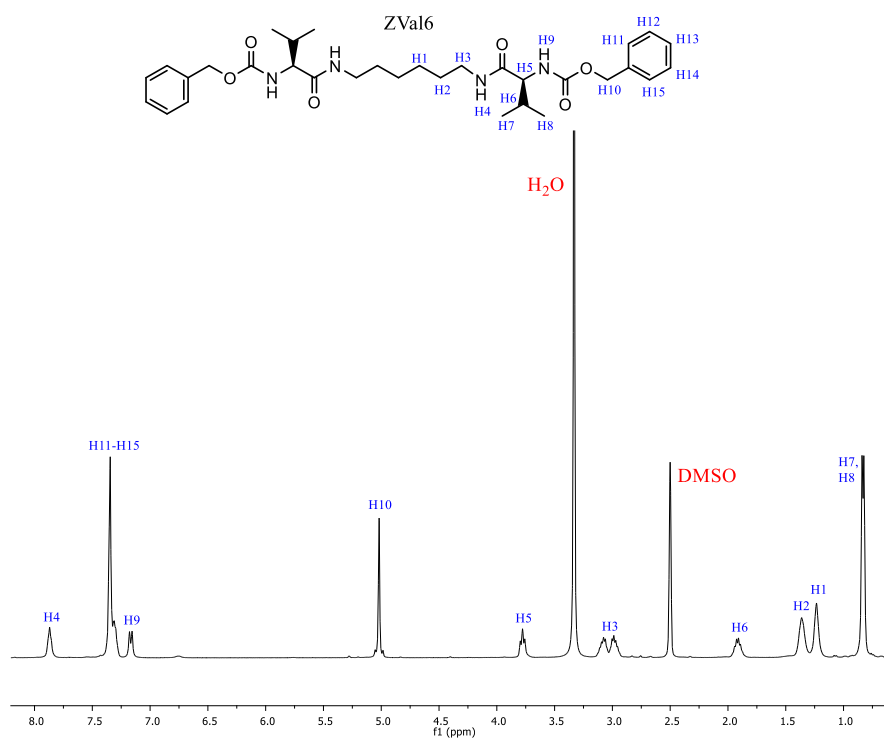


Figura 7.11. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de ZVal6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

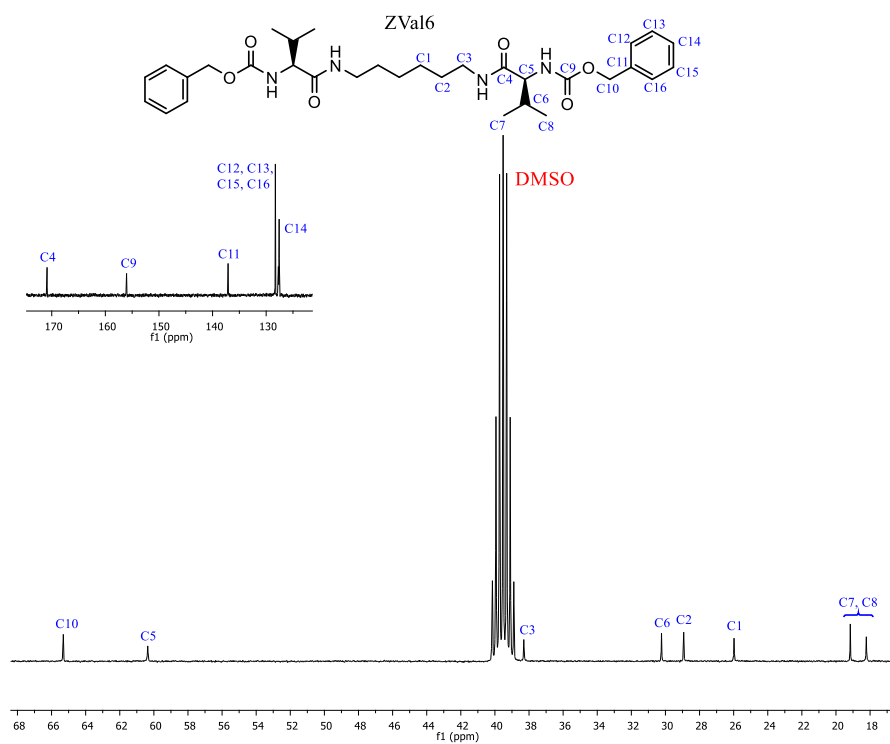


Figura 7.12. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de ZVal6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

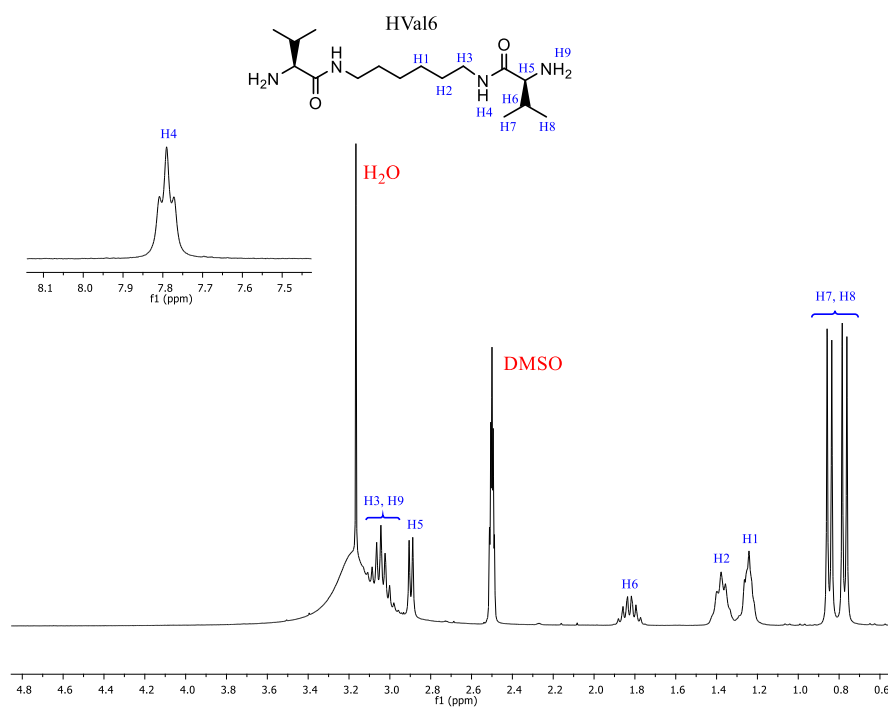


Figura 7.13. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de HVal6 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

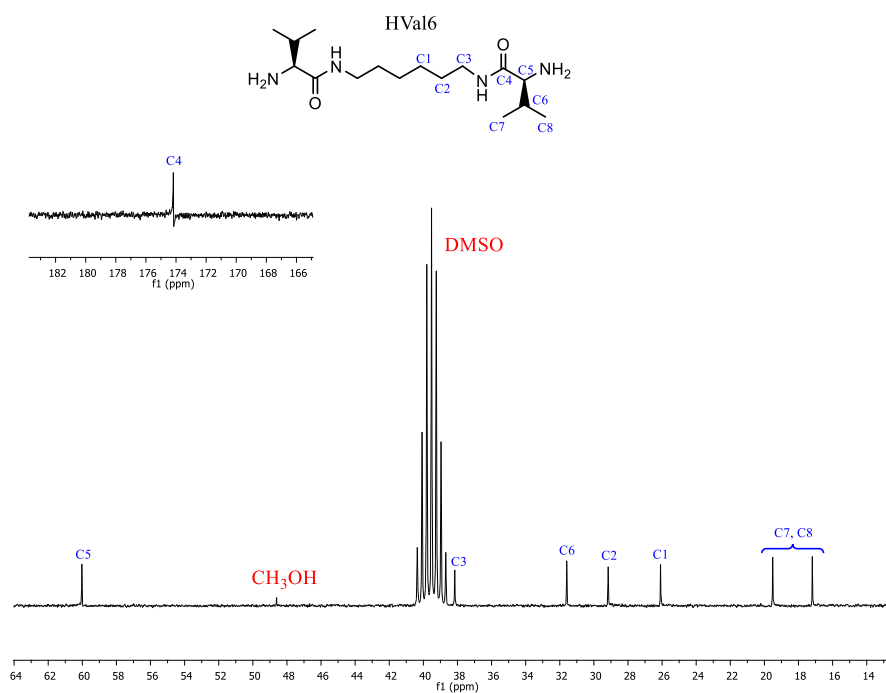


Figura 7.14. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de HVal6 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

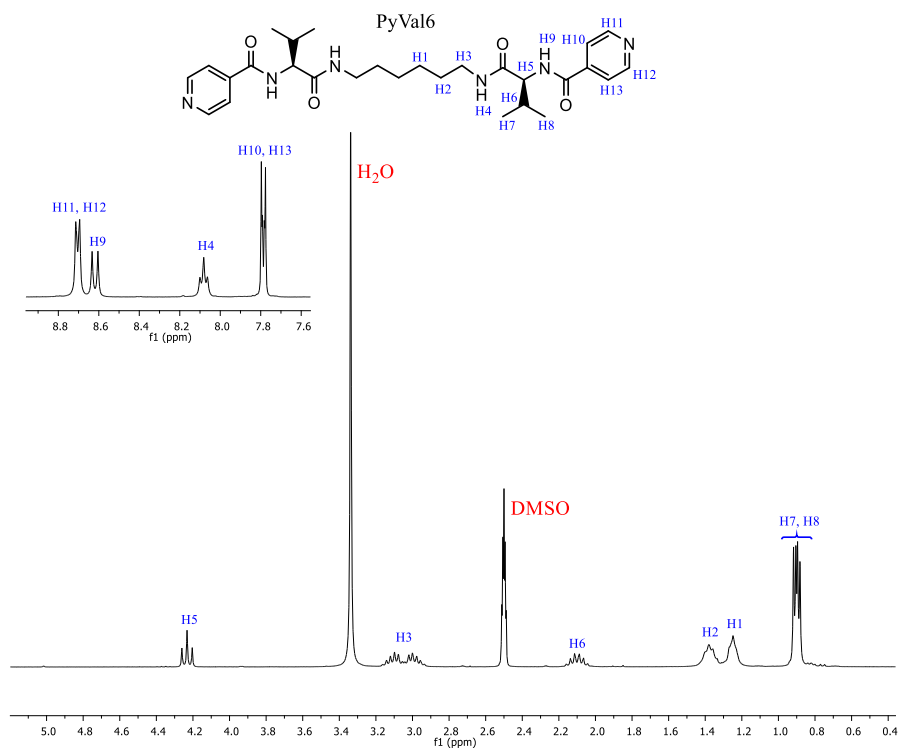


Figura 7.15. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de PyVal6 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.

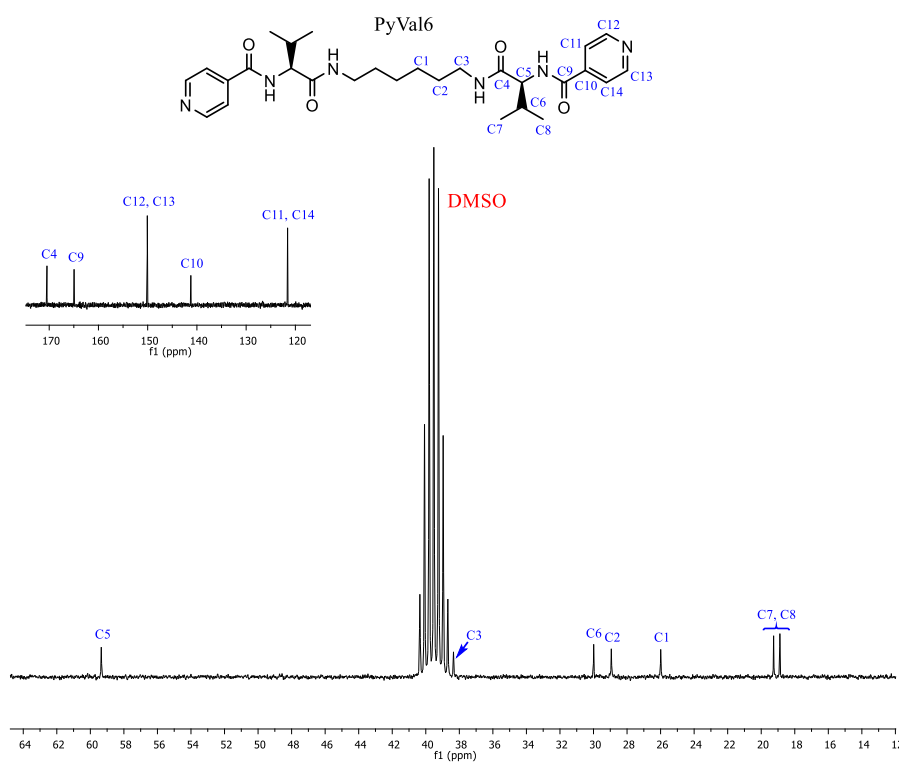


Figura 7.16. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de PyVal6 en DMSO-*d*<sub>6</sub>.



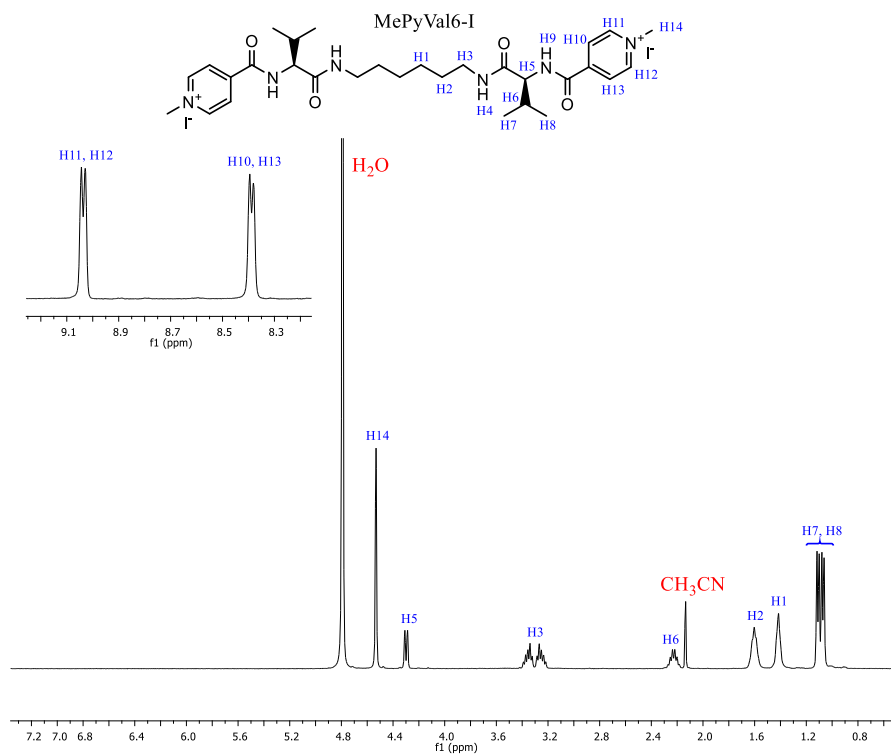


Figura 7.17. Espectro RMN-<sup>1</sup>H de MePyVal6-I en D<sub>2</sub>O.

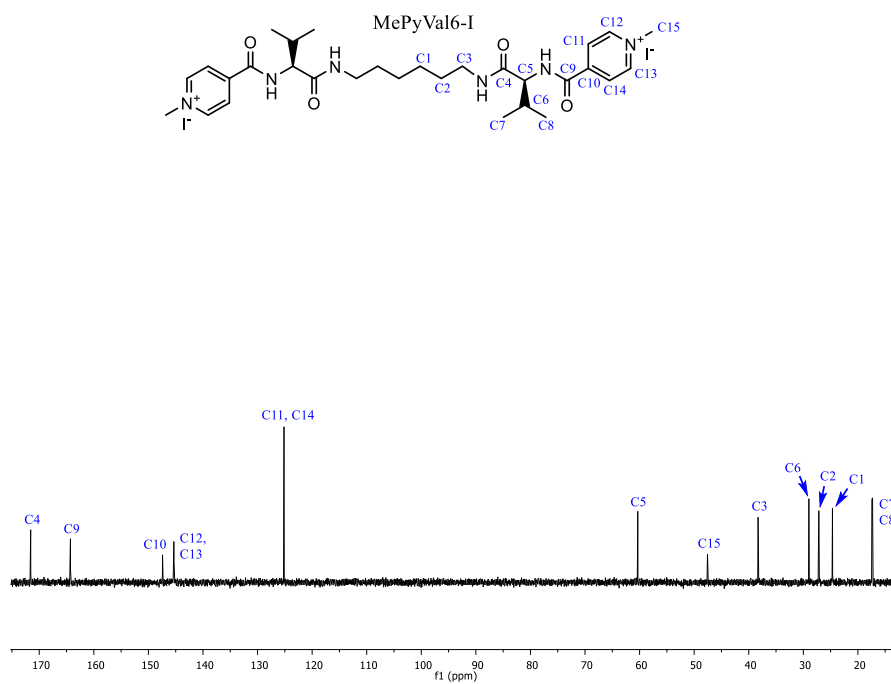


Figura 7.18. Espectro RMN-<sup>13</sup>C de MePyVal6-I en D<sub>2</sub>O.

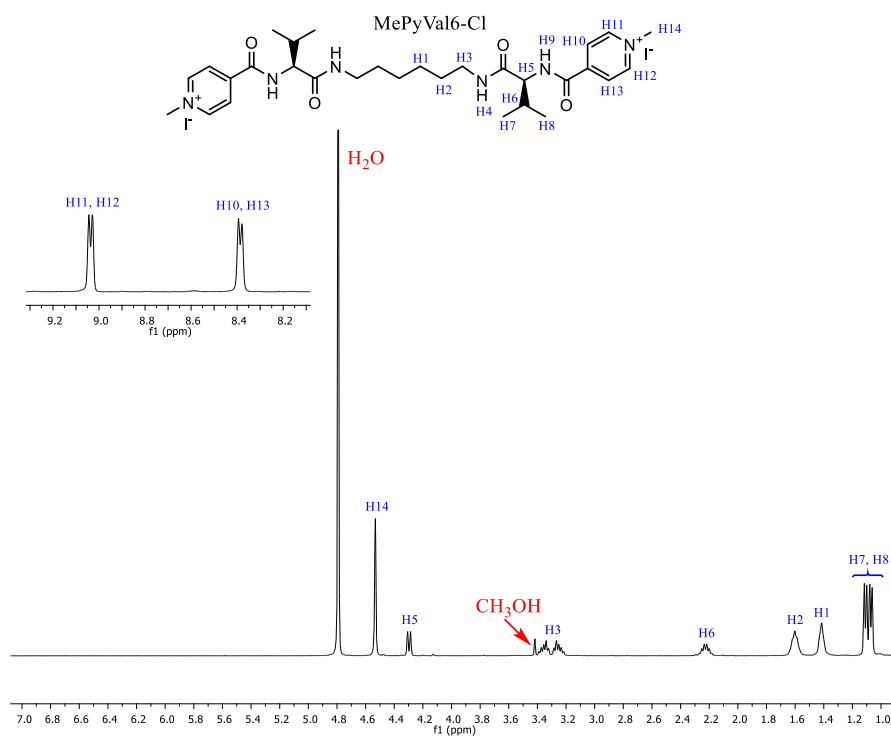


Figura 7.19. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyVal6-Cl en  $\text{D}_2\text{O}$ .

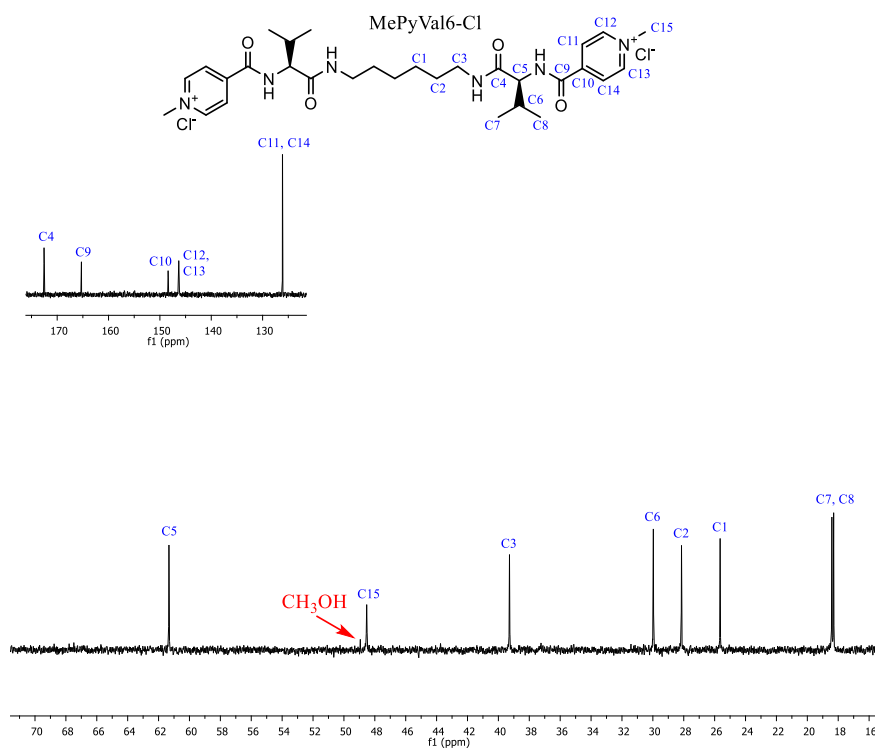


Figura 7.20 Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyVal6-Cl en  $\text{D}_2\text{O}$ .

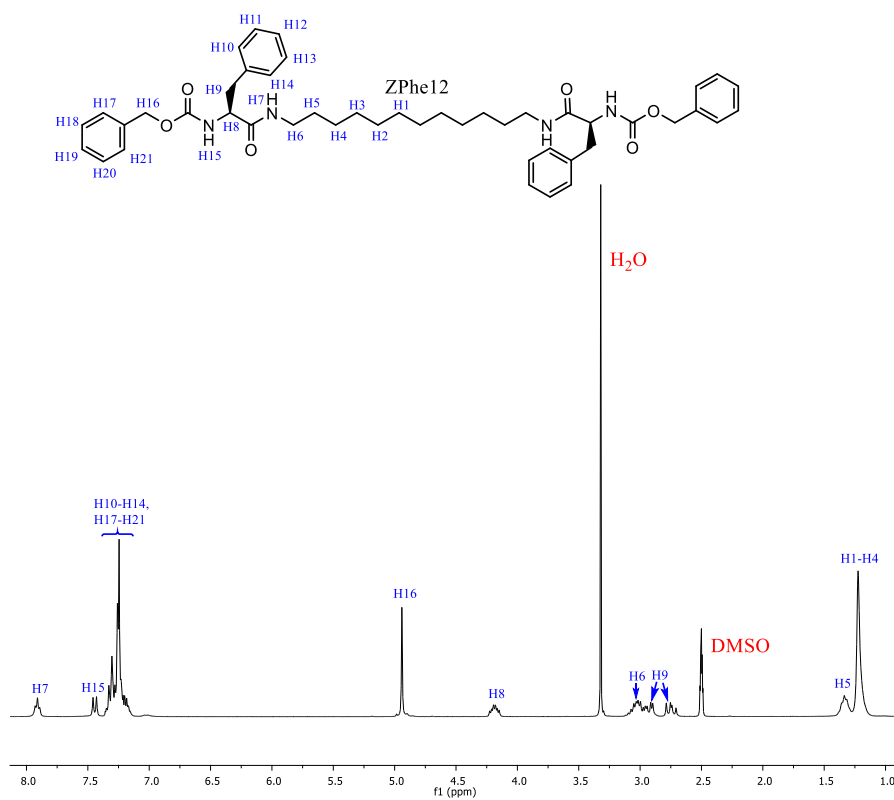


Figura 7.21. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de ZPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

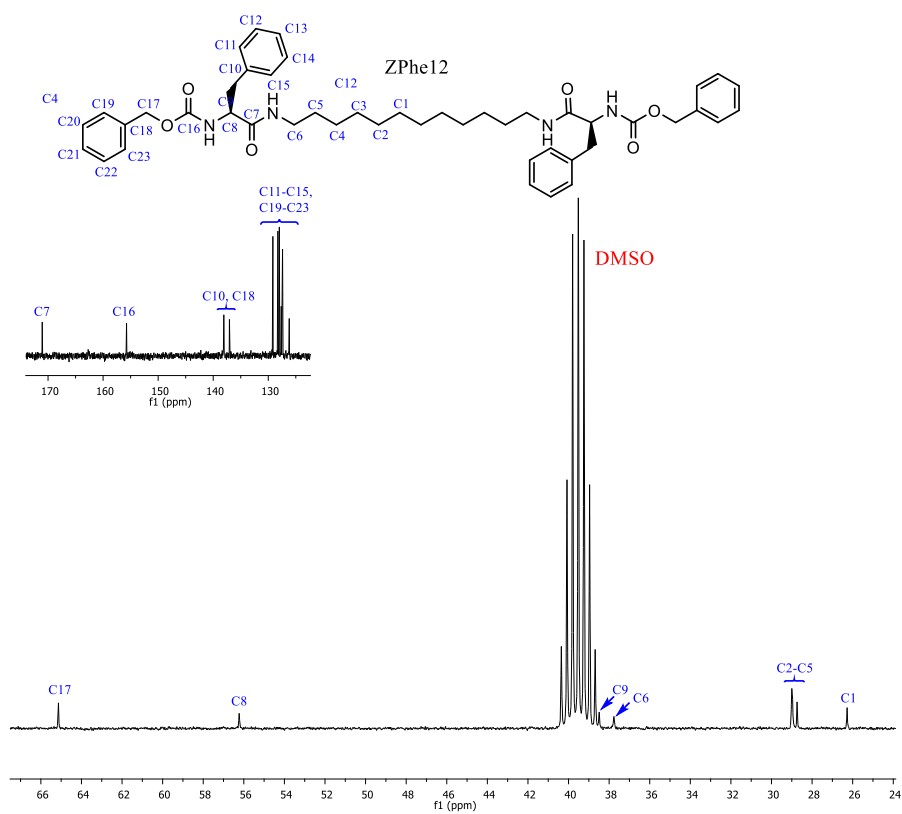


Figura 7.22. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de ZPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

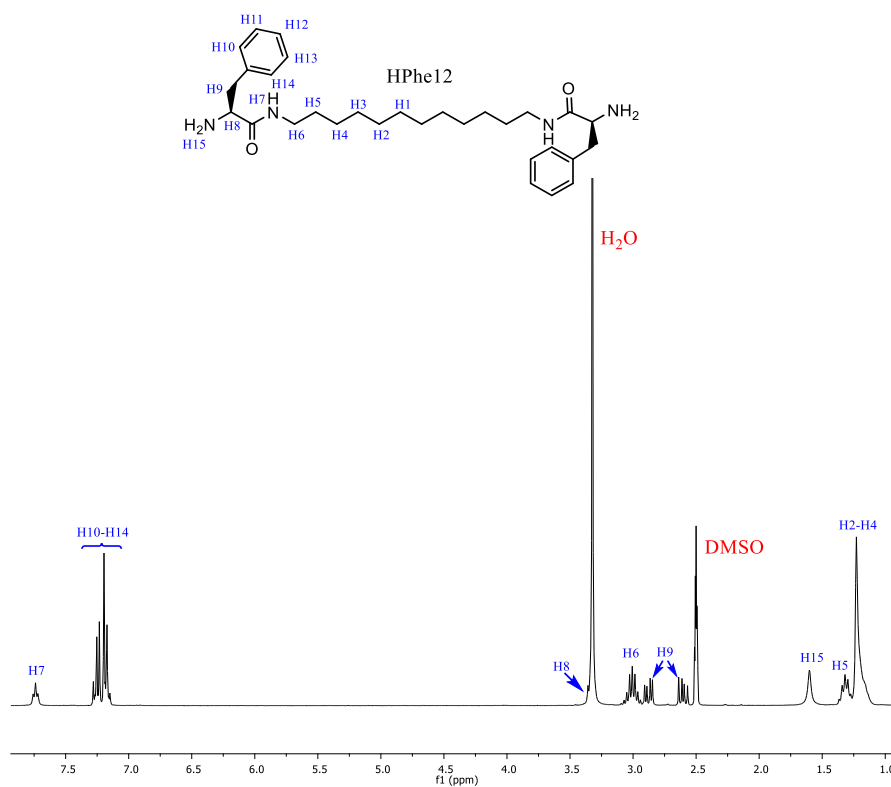


Figura 7.23. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de HPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

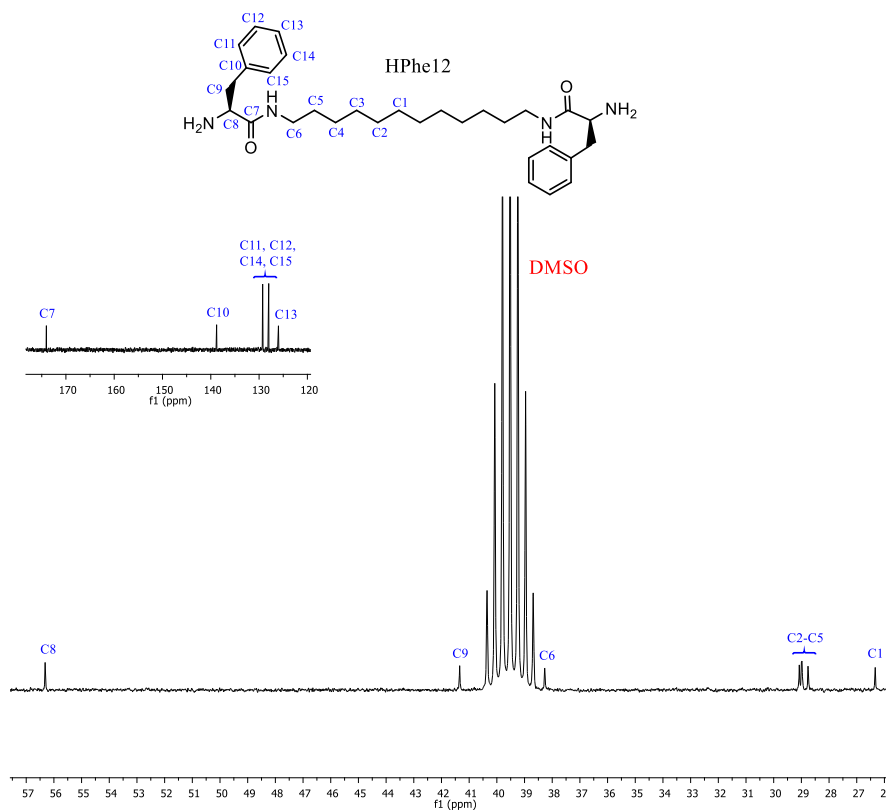


Figura 7.24. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de HPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

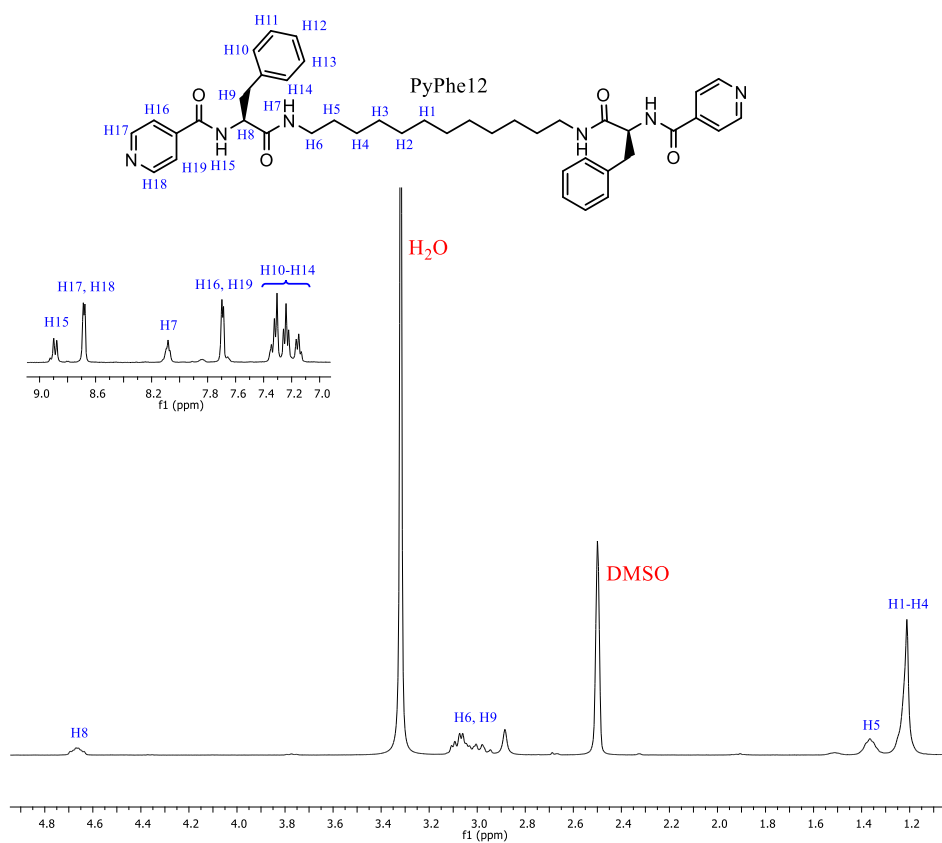


Figura 7.25. Espectro  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de PyPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

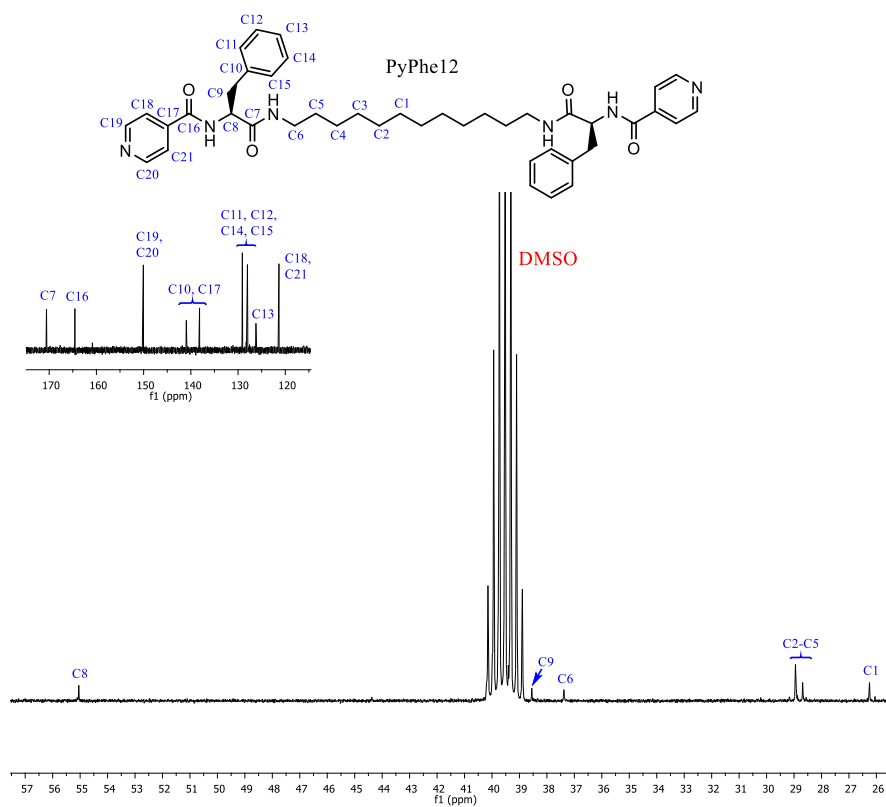


Figura 7.26. Espectro  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  de PyPhe12 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

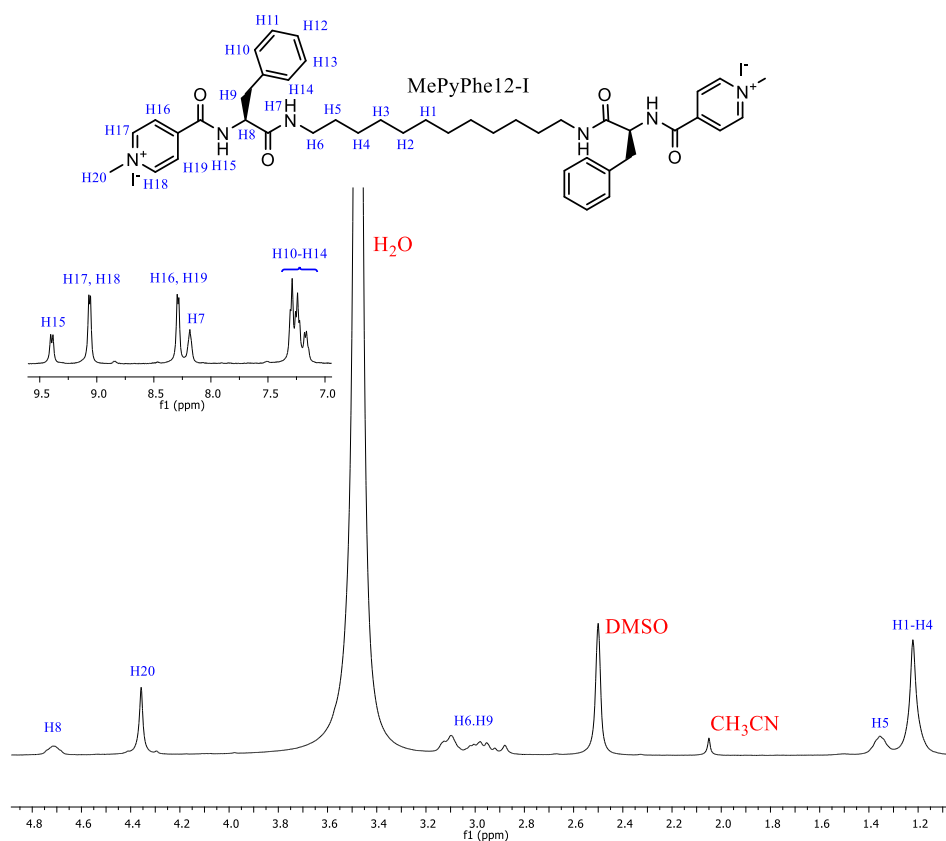


Figura 7.27. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyPhe12-I en  $\text{DMSO-}d_6$ .

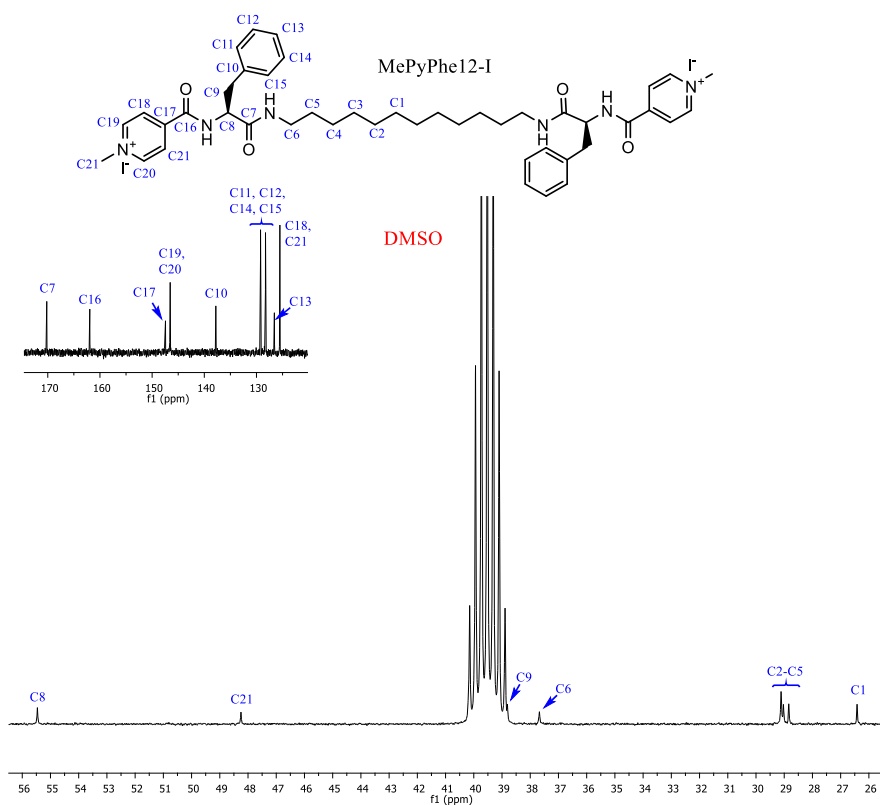


Figura 7.28. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyPhe12-I en  $\text{DMSO-}d_6$ .

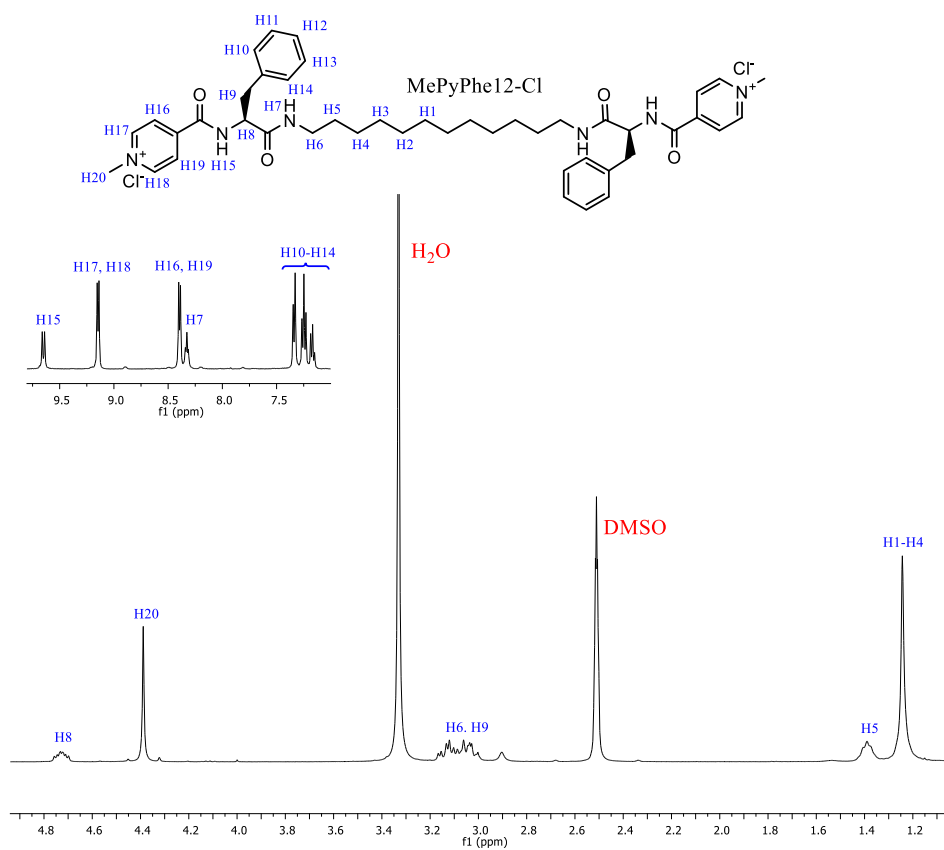


Figura 7.29. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyPhe12-Cl en DMSO- $d_6$ .

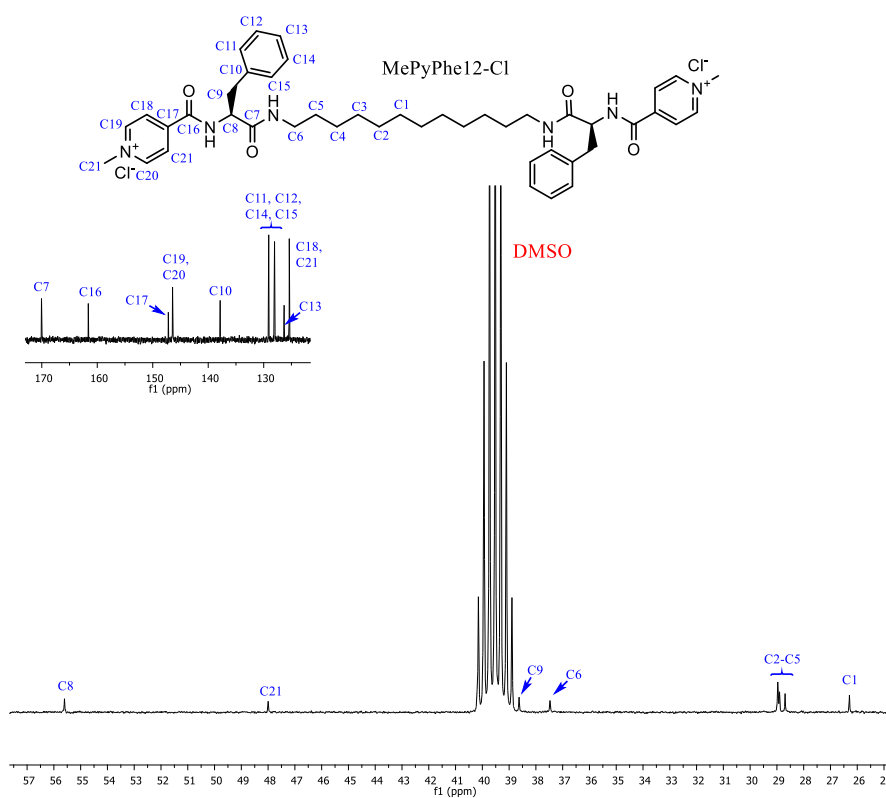


Figura 7.30. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyPhe12-Cl en DMSO- $d_6$ .

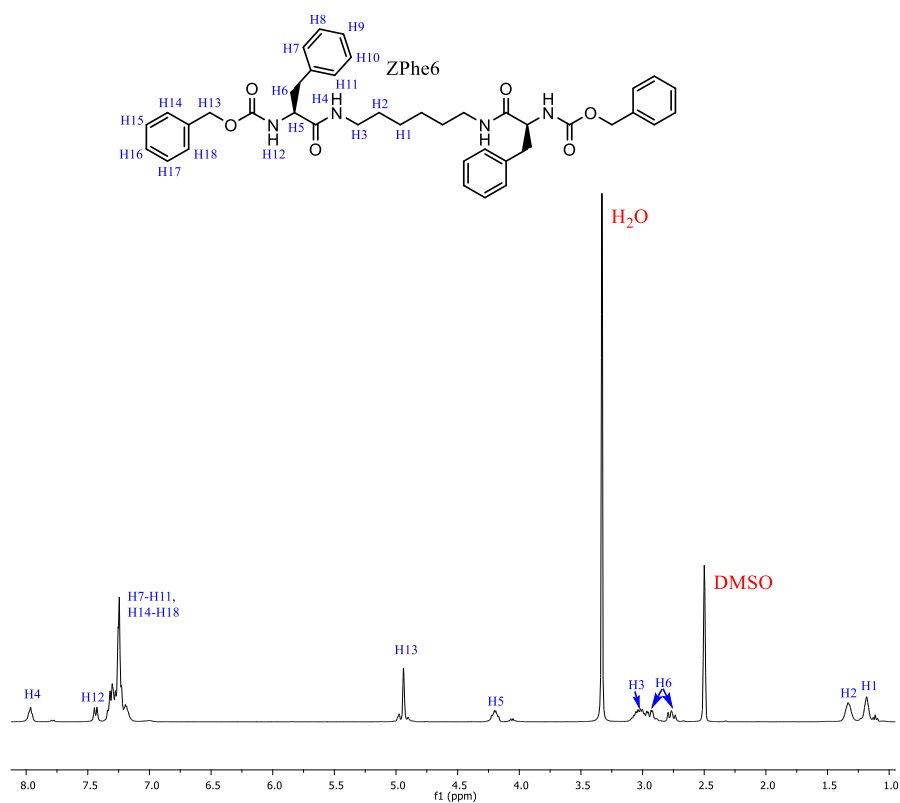


Figura 7.31. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de ZPhe6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

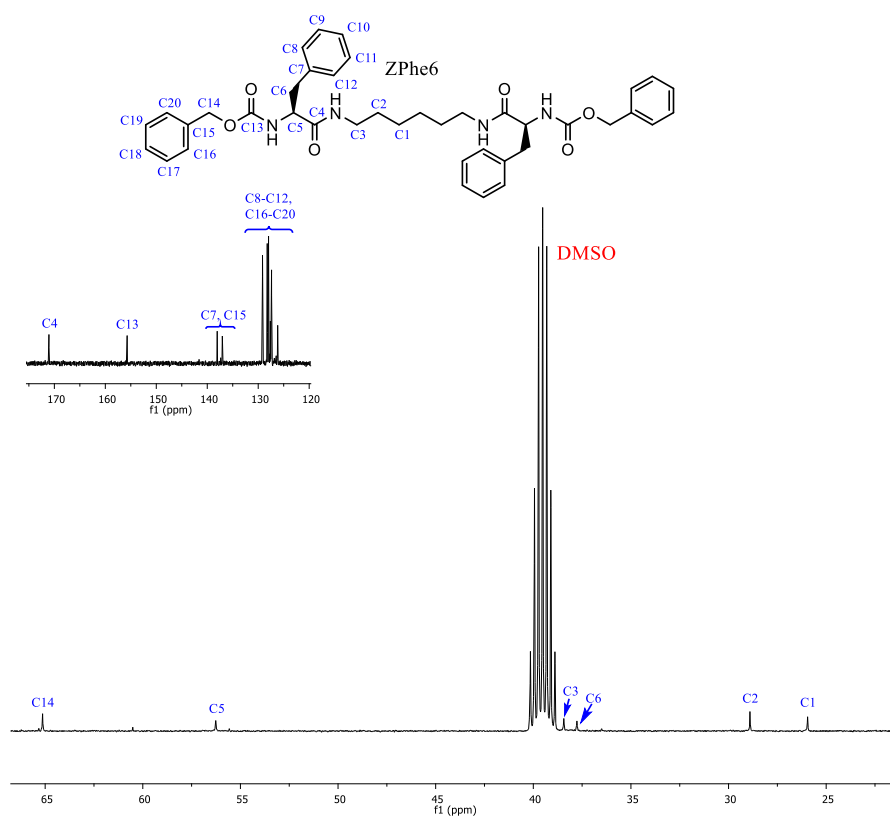


Figura 7.32. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de ZPhe6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .



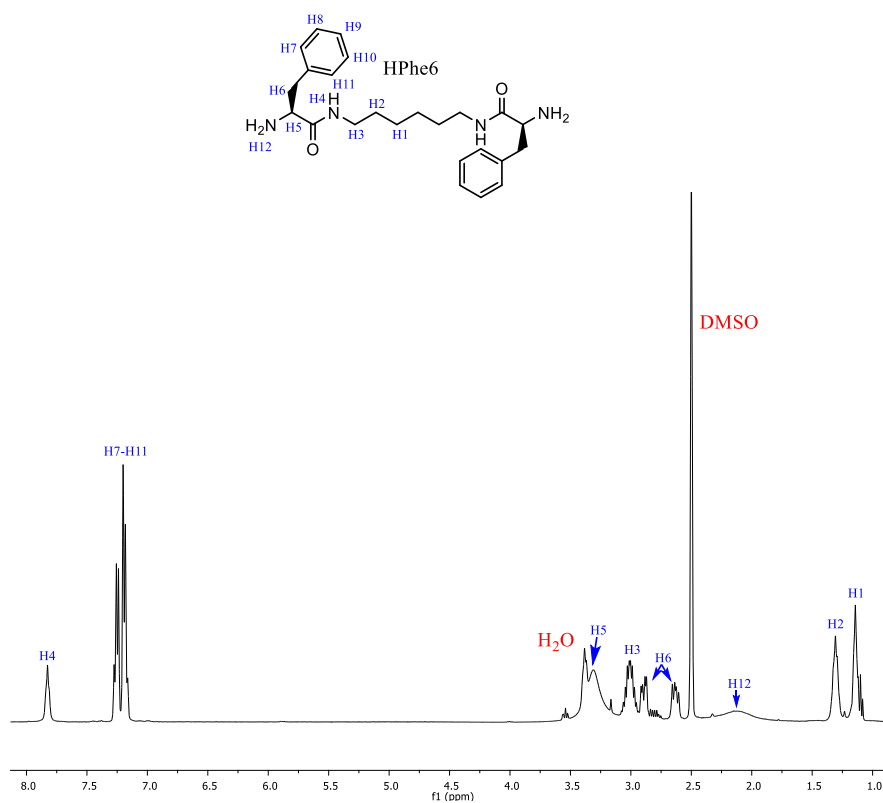


Figura 7.33. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de HPhe6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

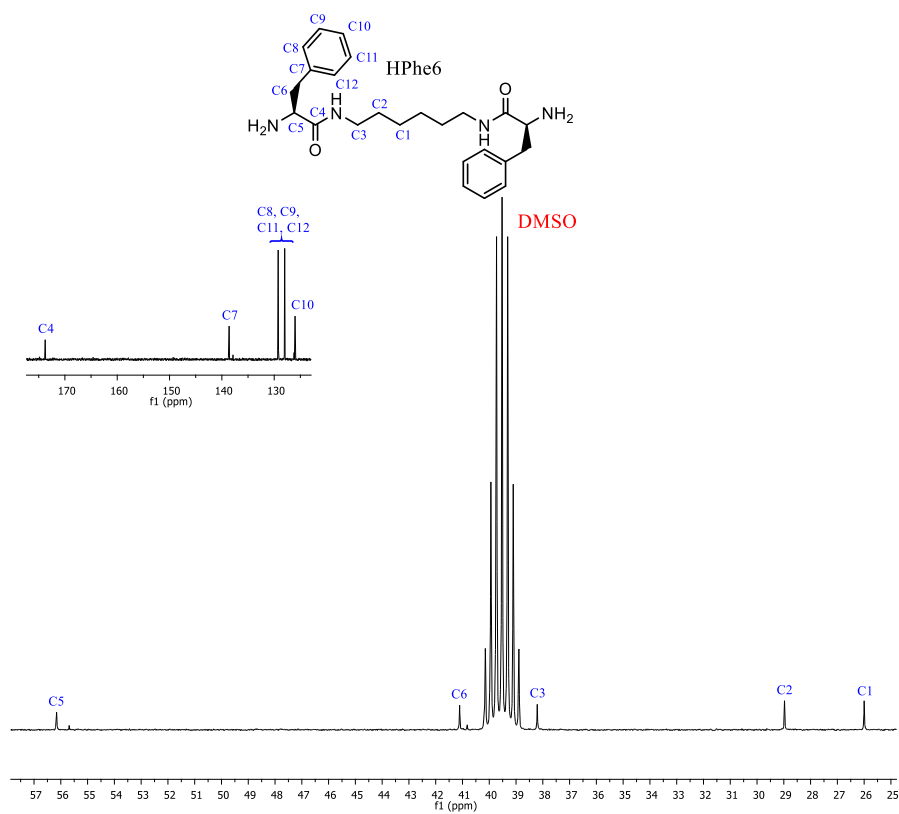


Figura 7.34. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de HPhe6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

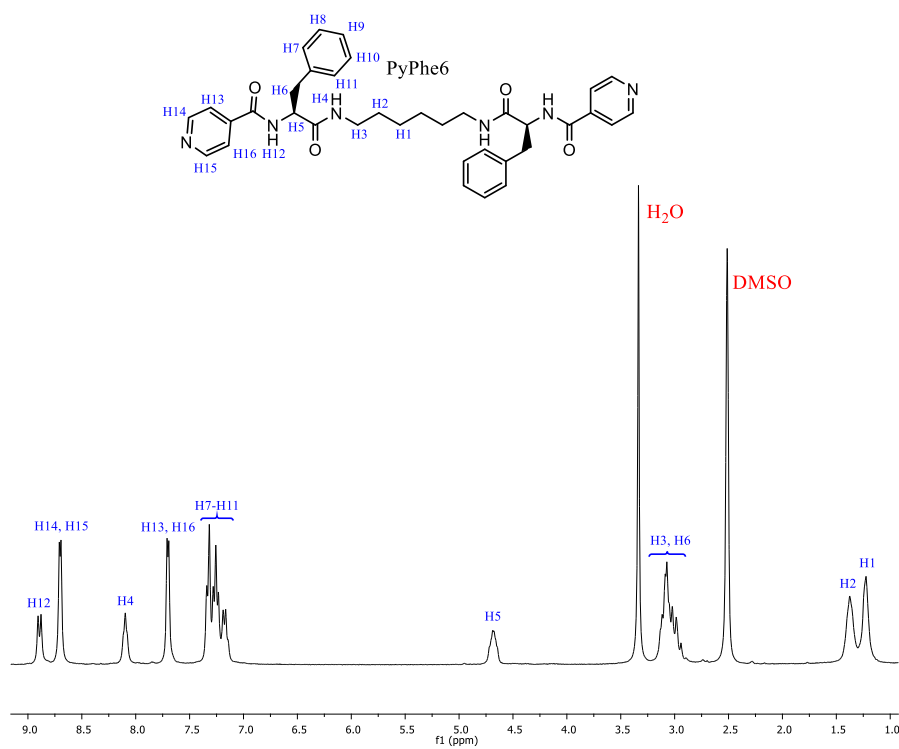


Figura 7.35. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de PyPhe6 en  $\text{DMSO-}d_6$ .

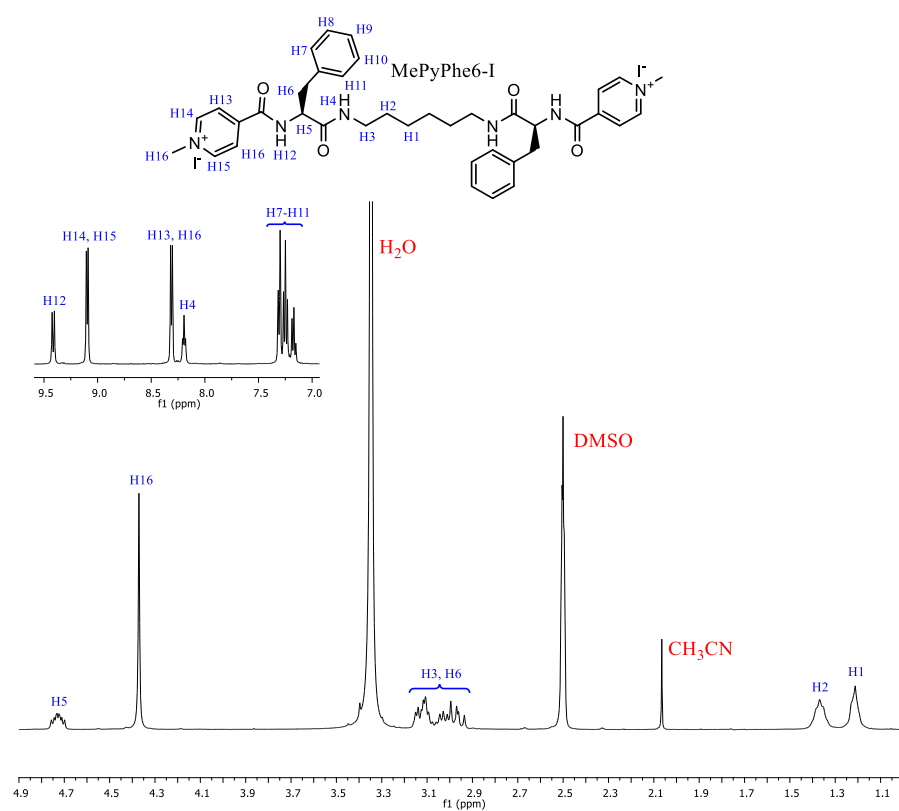


Figura 7.36. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyPhe6-I en  $\text{DMSO-}d_6$ .

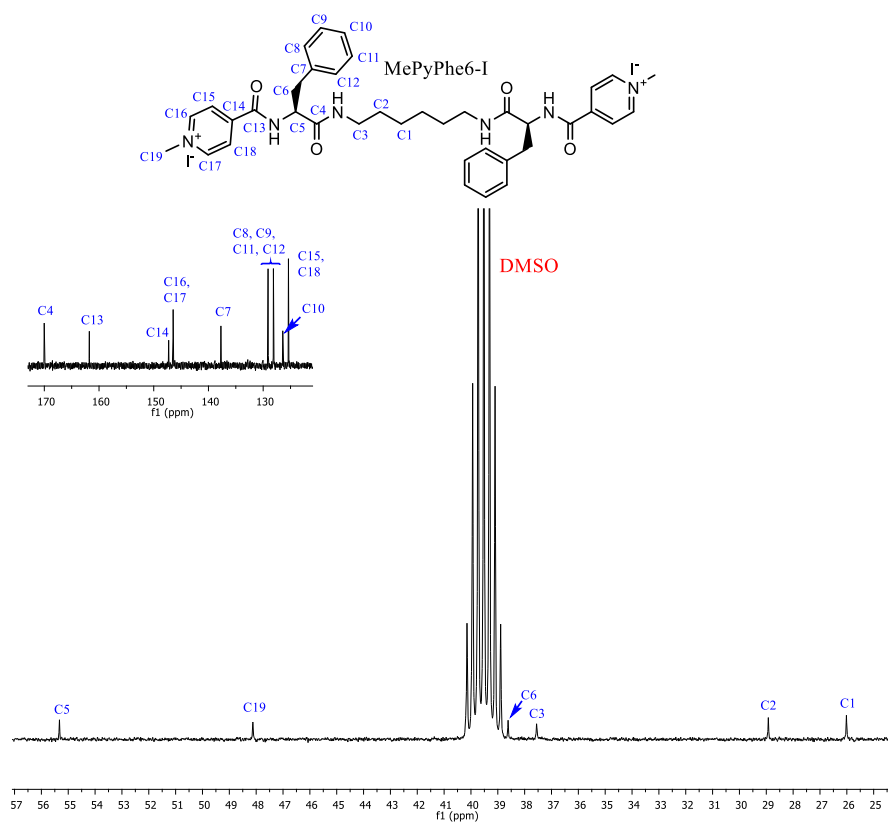


Figura 7.37. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyPhe6-I en DMSO- $d_6$ .

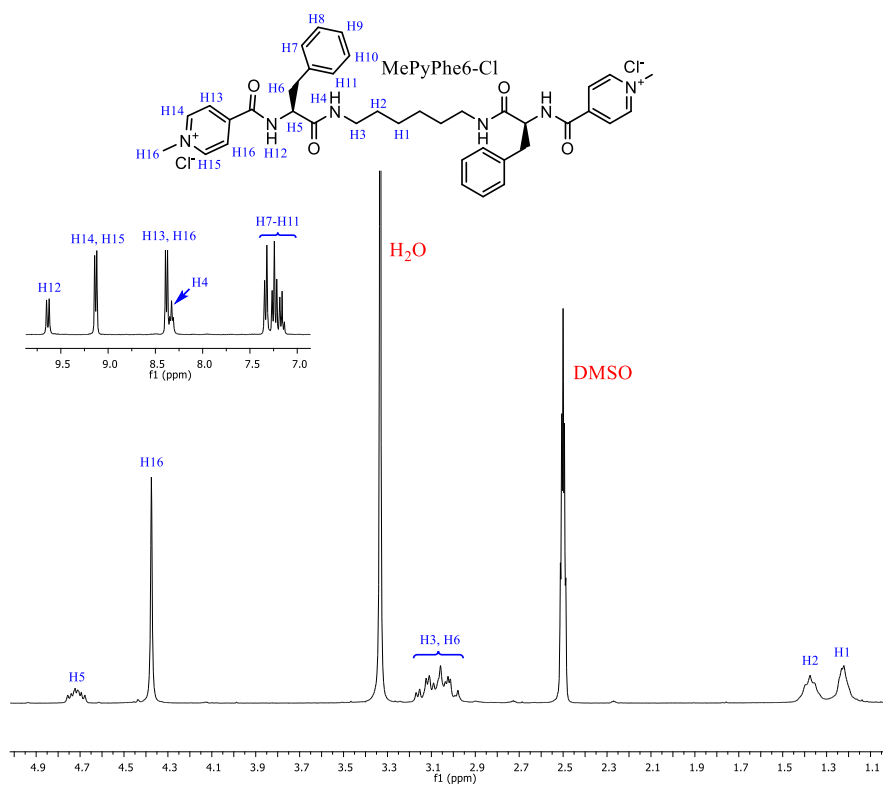


Figura 7.38. Espectro RMN- $^1\text{H}$  de MePyPhe6-Cl en DMSO- $d_6$ .

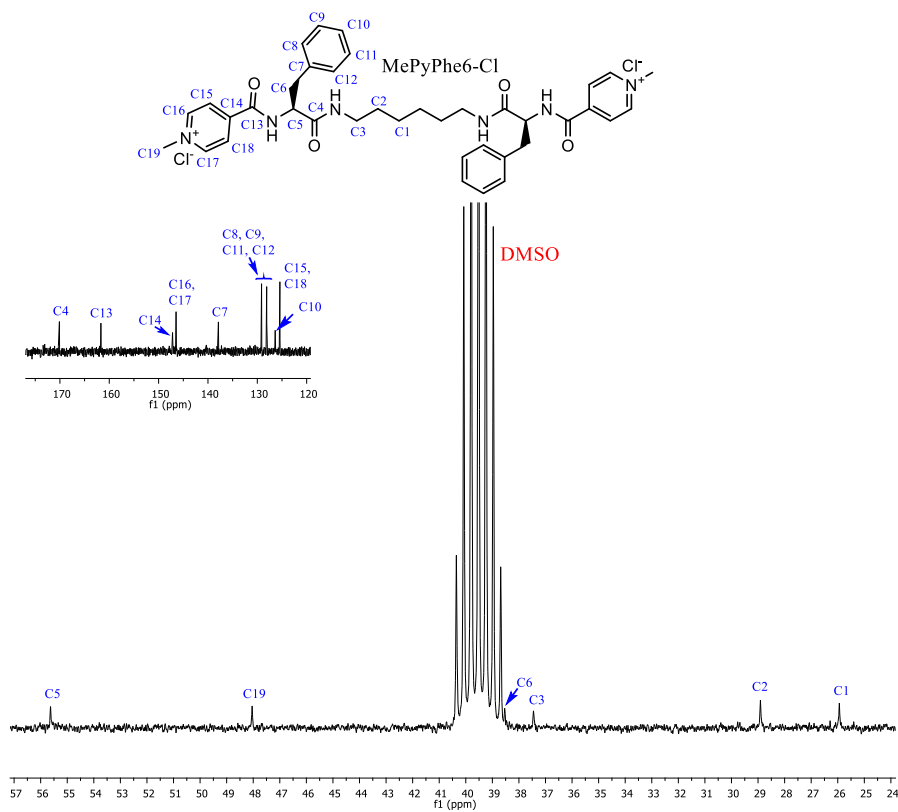


Figura 7.39. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de MePyPhe6-Cl en DMSO- $d_6$ .