



Universidad Nacional del Sur

Tesis de Doctor en Química

**Organización dirigida de moléculas
pequeñas para la obtención de
nanoestructuras que responden a
estímulos externos**

María Alejandra Sequeira

Bahía Blanca

Argentina

2017

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional de Sur y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química, Área II durante el período comprendido entre el 13 de agosto de 2009 y el 14 de Febrero de 2017, bajo la dirección de la Dra. Verónica I. Dodero, Profesora Adjunta de Química Orgánica.

María Alejandra Sequeira



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de..... (.....)

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo...
un esfuerzo total es una victoria completa”
Mahatma Gandhi*

AGRADECIMIENTOS

Al momento de plasmar por escrito el trabajo de tantos años de esfuerzo y muchas experiencias vividas, no puedo más que comenzar agradeciendo a las personas con las que compartí tantos momentos y a todos los que hicieron posible mi transitar por el camino de este doctorado.

Inicialmente quiero agradecer a la Dra. Verónica Doderó, quien desde el primer día me enseñó su interés y motivación por la investigación, abriéndome las puertas de un laboratorio a todo pulmón, desde una enseñanza de que es posible transformar los obstáculos en desafíos logrados.

Al Dr. Norbert Sewald, mi "co-director" por 3 meses en Alemania, por su cálido recibimiento durante mi estancia en aquel hermoso país y por brindarme su sencillez y sabiduría pero aún más, su entusiasmo respecto a su trabajo y a la investigación con péptidos, siempre con una sonrisa.

Al CONICET por brindarme una beca doctoral y permitirme acceder a un espacio de investigación para desarrollarme profesionalmente en este ámbito.

A los grandes enseñantes de nuestra Universidad Nacional del Sur y de otras universidades que tuve la oportunidad de conocer, la Dra. María Cristina Minguillón, de la Universidad de Barcelona, el Dr. Ernesto Mata, de la Universidad de Rosario, el Dr. Bruno Magio del CIQUIBIC, de Córdoba, agradecer a todos los profesores que hicieron posible mi formación profesional y en esta última instancia, continuar con mi formación de posgrado. Entre ellos no quiero dejar de mencionar a la Dra. Marta Avendaño, quién junto a Eduardo Maldonado me transmitiera allá lejos durante mi carrera la curiosidad por el trabajo en un laboratorio de investigación.

Al Dr. Pablo Schultz a través de quién me acerqué al mundo de los anfililos y me enseñó algunos vericuetos de la microscopía de luz polarizada. Al Dr. Daniel Ercoli por facilitarme siempre de un modo muy amable el acceso al microscopio del Área de Ciencia y Tecnología de Polímeros de PLAPIQUI. Al grupo de trabajo de Marcelo Avena que me permitieron trabajar con el equipo de Light Scattering. A Luciano Rodríguez y su grupo de trabajo en agronomía por facilitarme muchas veces el uso del liofilizador. A Cecilia por las largas horas compartidas en el TEM y el SEM.

A cada una de las personas que hacen el INQUISUR, profesores, compañeros del instituto administrativos, compañeros docentes, personal de LIUC, quienes han hecho de este espacio un lugar de trabajo ameno.

A Luciano Benedini, un compañero de años de carrera que la investigación me permitió

volver a disfrutar. Gracias por colaborar en la realización de esta tesis y transmitirme su especialidad: las monocapas. A mi amiga Georgina Herrera colaboradora también en el presente trabajo, y en hacerse un lugarcito en mi corazón. Al igual que Zulma Quirolo, compañera de ruta y de mate, y muchas personas que conocí trabajando en este espacio y hoy me acompañan como parte muy importante de mis afectos: Juliana, Verito, Soraya, Ivana, Pitu, Marilyn, María José, Tania, Lilly, Gesa, Ansgar. A las chicas de al lado, Fabiana, Yanina, Evangelina, a las del fondo que de vez en cuando nos cruzamos, Julia, Natalia, Valeria, a Viviana, Darío y por supuesto Olga, para todos mi agradecimiento.

No me alcanzan las palabras para agradecerle a un profesional que tuvo mucho que ver con la puesta en marcha del nuestro laboratorio, el bioquímico Enrique Wolf, que nos donó de corazón todos los reactivos y el material de vidrio de su laboratorio de análisis clínicos, entre ellos un destilador que usé durante toda mi tesis y que sigue siendo la reliquia de nuestro laboratorio.

A mis amigas de siempre, Lorena, Mariela, Gisela, Coqui porque están ahí justo cuando más se las necesita, por el apoyo en esta última etapa y porque me transmiten día a día que la amistad no tiene tiempo y se construye de reencuentros.

A mi amiga Natalia que es mi hermana.

A Antonio y Mónica por caminar a mi lado.

A mis hermanos Verónica, Federico y Carolina, Martín que siempre me acompañan aún a la distancia, y a mis cuñadas de hierro Viviana y Carolina que estuvieron y están muy cerca formando parte de mi familia.

A mis papás, Alicia y Mario por darme amor, que es esa palabra de aliento en el momento justo. Gracias por acompañarme y simplemente eso, estar ahí.

A mis abuelos Carmela y Juan que son mis estrellas.

A Carlos porque todo el amor del mundo cabe en su abrazo. Gracias mi amor por acompañarme en esta etapa siempre de pie y entregando el alma.

RESUMEN

Inspirados en el concepto de investigación traslacional, nuestros proyectos de investigación están dirigidos al desarrollo de sistemas químicos desde el conocimiento básico hasta la aplicación. Los sistemas químicos pueden ser definidos como sistemas autoensamblados que son capaces de hacer algo interesante y útil. Considerando los sistemas anfífilos, hay dos procesos básicos de ensamblado utilizados en su construcción. El primero, es el ensamblado espontáneo de moléculas que se conoce como autoensamblaje. Asimismo, hay procesos con requerimiento de energía que conducen a estructuras metaestables o en “equilibrio permanente”, es decir, de larga duración, que no son necesariamente las estructuras termodinámicamente más favorecidas o estados de equilibrio verdaderos. Este último tipo de proceso se denomina *ensamblaje dirigido*. Por lo tanto, la capacidad de diseñar y organizar bloques moleculares individuales de construcción, en arquitecturas bien definidas en el agua, sigue siendo un desafío.

Inicialmente, utilizamos nuestra experiencia en química orgánica, coloidal e interfacial para desarrollar un sistema fotomodulador de membrana, de potencial utilidad debido tanto a su estructura química simple, como a las propiedades interfaciales y en solución del sistema solo, y en un entorno constituido por una biomembrana. A tal efecto, se presenta la síntesis y caracterización de cuatro anfífilos no iónicos, 3A, 3B, 4A y 4B, basados en un núcleo de azobenceno. A continuación, evaluamos su capacidad de fotoisomerización y su comportamiento como cristales líquidos termotrópicos. Sólo 4A, $C_{12}OazoE_3OH$, presentó utilidad como molécula funcional. En segundo lugar, se realizó la evaluación de 4A puro en la interfase por monocapas de Langmuir y microscopía de ángulo de Brewster. Por otra parte, se comprobó la fotomodulación y la capacidad de penetración de $C_{12}OazoE_3OH$ en un modelo de membrana biológica (Lipoid s75TM), presentándose como un sistema de administración inteligente, lo cual representa un objetivo primordial a la hora de realizar investigación traslacional, en el ejercicio del control remoto adecuado para estudios biofísicos en células. En la biomembrana lipídica, el cambio geométrico *E-Z* de $C_{12}OazoE_3OH$, indujo cambios de fase que aumentan o disminuyen la fluidez y la temperatura de transición de la mezcla. El éxito de la capacidad de respuesta y la funcionalidad resultante son debidos al tamaño de la cabeza y al carácter no iónico que juega un papel esencial en el parámetro de empaquetamiento. Sorprendentemente, experimentos de monocapas de Gibbs demostraron que ambas isoformas de $C_{12}OazoE_3OH$ penetraron la membrana lipídica, resultados promisorios para su utilización como sonda externa en sistemas reales.

Las vesículas fotoconmutables utilizadas en la administración controlada de fármacos, conocida como “drug delivery”, emplean el ensamblaje dirigido de fosfolípidos y polímeros conteniendo grupos azobencenos unidos covalentemente, o mezclados con un cierto porcentaje de azobencenos, de forma no covalente. Nosotros proponemos la aplicación de un proceso de ensamblaje dirigido sencillo, mediante la utilización de un rotavapor, el cual consiste en la evaporación del disolvente y la formación de un cristal líquido, seguido de autoensamblaje inducido por agua. Este proceso resulta en la construcción de un sistema azovesicular puro o azoniosoma a base de $C_{12}OazoE_3OH$. Esta metodología es similar a la empleada en la producción de liposomas a partir de lípidos, sin embargo, desde nuestro conocimiento, es la primera vez que es utilizada con bloques de construcción π -conjugados puros con características anfifílicas, como lo son las moléculas anfifílicas constituidas por azobencenos. Los sistemas vesiculares obtenidos se evaluaron mediante microscopía óptica y de luz polarizada, espectroscopia UV-Vis, microscopía electrónica y dispersión dinámica de la luz. Además, la capacidad de delivery y las características de fotoisomerización del sistema se evaluaron por espectroscopia de fluorescencia usando la sonda calceína. Aunque se obtuvo un rendimiento de fotoconversión con un PSS de $E:Z$ (36: 54), el cambio en la sección transversal promovido por la isomerización $E-Z$ fue suficiente para liberar el 97% de calceína. Adicionalmente, se comprobó la interacción del colorante Rojo Nilo con las azovesículas E , evidenciándose después de la fotoisomerización $E-Z$, un desplazamiento de la emisión de fluorescencia hacia la zona azul del espectro de absorción, efecto similar al observado en las vesículas lipídicas.

Estos hallazgos en el desarrollo de azoanfílicos no iónicos pueden abrir nuevas perspectivas en el área de estudio del control remoto de membranas y vesículas, materia de incesante innovación, con sus consecuencias en el desarrollo de sistemas citomiméticos fotomodulables y en la administración inteligente de fármacos.

Finalmente, se informa la síntesis y caracterización de un sistema peptídico $AcFFCNH_2$, llamado péptido A capaz de formar nanoestructuras promovidas inicialmente por el cambio en las condiciones del medio acuoso a pH 3.0 y 8.0. Además, se evaluó el rol del aditivo TCEP, conocido reductor de enlaces disulfuros, en el proceso de organización dirigida del péptido A, a ambos pH. En estas condiciones observamos que el péptido A, forma nanoestructuras tipo vesículas, las cuales sufren una transición vesícula-cinta-fibra en función del tiempo. Se pudo determinar en todos los casos a las 24 horas, la formación de manojos de fibras, las cuales fueron más robustas a pH 3.0 en condiciones oxidantes. Finalmente se modificó la organización de las fibras maduras obtenidas a pH 8.0, por el agregado de TCEP. En esta

condición experimental se observó la ruptura inmediata de los manojos de fibras en nanoestructuras esféricas y tubos que se organizaron en anillos; finalmente el sistema evoluciono a la formación de nano- y micro vesículas. Puesto que la funcionalidad de estas arquitecturas está intrínsecamente ligada a su estructura jerárquica y sus morfologías, que a su vez son consecuencia de una compleja historia de auto-ensamblaje, nuestros resultados contribuyen a avanzar en el estudio de la elucidación de los mecanismos de autoagregación proteica. De esta forma y como fin último podríamos intervenir racionalmente en el diseño de nuevas drogas dirigidas a controlar la no deseada agregación proteica, asociada a diferentes patologías humanas incurables.

ABSTRACT

Taking inspiration on the concept of translational research, our research projects are directed towards the development of chemical systems from basic knowledge to application. Chemical systems can be defined as self-assembled systems that is able to do something interesting and useful. There are two basic assembly processes used in their construction. First, there is the spontaneous assembly of amphiphilic molecules which is referred to as self-assembly. Then, there are energy-requiring processes that lead to long-lived metastable or steady state structures that are not necessarily the thermodynamically most favored structures or true equilibrium states, which are referred to as directed assembly. Therefore, the ability to design and arrange individual molecular building blocks into well-defined architectures in water remains a challenge.

Initially, we took advantage of our organic chemistry, colloidal and interfacial expertise to develop a membrane photoswitch with potential utility because its simple chemical structure, interfacial and bulk properties alone and a biomembrane environment. In this regard, we present the synthesis and characterization four non ionic amphiphiles 3A, 3B, 4A and 4B based on azobenzene core. Then, we evaluate their photoisomerization capability and thermotropic liquid crystal behavior. Only 4A, $C_{12}OazoE_3OH$, showed to be useful as functional molecule. Second, the evaluation of 4A pure at the interface by Langmuir monolayers and Brewster Angle Microscopy was performed. Moreover, the membrane photoswitch and penetration behavior of $C_{12}OazoE_3OH$ in a biological membrane model was tested (Lipoids75TM), which is a major goal to the translation into the area of remote control suitable for biophysical studies in cells and as a smart delivery system. In the lipid biomembrane E-Z geometrical change of $C_{12}OazoE_3OH$ induces phase changes increasing or decreasing the fluidity and the transition temperature of the mixture. The success of the responsiveness and the resulted functionality is because of the size of the head and the non-ionic character which plays an essential role in the packing parameter. Interestingly, Gibbs monolayers showed that both $C_{12}OazoE_3OH$ penetrate lipid membrane allowing their use as external probes in real systems.

Phototunable vesicles used in drug delivery employed directed assembly of phospholipids and polymers bounded with azobenzene groups covalently, or mixed non-covalently with a certain azobenzene percentage. We reported that easy directed assembly using a rotary evaporator employing, by solvent evaporation and liquid crystal assembly followed by water induced self-assembly builds a pure azovesicular systems or azoniosome based on $C_{12}OazoE_3OH$. The entire methodology is similar to these employed in the production of

liposomes from lipids, however up to our knowledge it is the first time to use it with a pure small π conjugated building blocks with amphiphilic features, like an amphiphilic azobenzene. The obtained vesicular systems were evaluated by optical and polarized optical microscopy, UV-Vis spectroscopy, electron microscopy and dynamic light scattering. Moreover, the delivery capabilities and the characteristics of the system upon E-Z photoisomerization were evaluated by fluorescence spectroscopy using calcein dye. Although the photoconversion proceeded only to E:Z (36: 54), the cross-section change promoted by the E-Z isomerization was sufficient to release calcein dye up to 97%. Additionally, Nile red interacts with E azovesicles, showing a blueshift emission after E-Z photoisomerization similar to those observed in lipids vesicles.

Our findings in the development of non-ionic azo amphiphiles may open new perspectives in the area of remote control of membranes and vesicles on demand with its consequences in the development of photoswitchable cytomimetic systems and in drug delivery.

Finally, we report the synthesis and characterization of a peptide system AcFFCNH₂, called peptide A capable of forming nanostructures initially promoted by the solvent change at two aqueous conditions at pH 3.0 and pH 8.0. In addition, the role of the TCEP additive, known as disulfide - reduction agent, was evaluated in the process of the directed organization of peptide A at both pH. In these conditions we observed that peptide A, forms vesicles-like nanostructures, which undergoes a vesicle-ribbon-fiber transition as a function of time. It was determined in all cases at 24 h., the formation of fiber bundles, which were more robust at pH 3.0 under oxidizing conditions. Finally the organization of the mature fibers obtained at pH 8.0 was modified by the addition of TCEP. In this experimental condition it was observed the immediate rupture of the fiber bundles in spherical nanostructures and tubes that were further organized in rings. Finally the system evolved to the formation of nano- and micro-vesicles. Since the functionality of these architectures is intrinsically linked to its hierarchical structure and its morphologies, which in turn are the result of a complex history of self-assembly, our results contribute to the study of the elucidation of the mechanisms of protein self-aggregation. In this way and as a final aim we could rationally take part in the design of new drugs aimed at controlling the unwanted protein aggregation associated with different incurable human pathologies.

Acrónimos*Símbolos:*

Å = Amstrong

Cs⁻¹ = Módulo de compresibilidad

ΔCp = Cambio de capacidad calorífica

ΔH = Cambio de entalpía

ΔG = Cambio de energía de Gibbs

ΔS = Cambio de entropía

ε = Coeficiente de extinción molar

λ = Longitud de onda

λ_{máx} = Longitud de onda máxima

MΩ = megaOhmio

mN = miliNewton

μM = micromolar

Π = Presión superficial

μ = Momento dipolar

ACN = Acetonitrilo

AN = Número de aceptor de electrones

BAM = Microscopía de Ángulo de Brewster

CAC = Concentración de Agregación Crítica

CH₂Cl₂ = Diclorometano

CHCl₃ = Cloroformo

CoA= Coagel

Cr = Sólido Cristalino

DIEA = N,N- diisopropiletilamina

DLS = Dispersión de Luz Dinámica

DMF = Dimetilformamida

DN = Número de donador de electrones

DSC = Calorimetría Diferencial de Barrido

EISA = Autoensamblado controlado por evaporación

EM-AR = Masas de alta resolución

EM-ESI = Espectrometría de Masas de Ionización mediante electro-spray

EM-FAB = Espectrometría de Masas de Ionización mediante bombardeo de átomos rápidos
EM-Maldi-TOF = Espectroscopía de masas de ionización/desorción mediante láser asistida por matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.

Et₃N = Trietilamina

EtOH = Etanol

FF = Difenilalanina

GUV = Vesículas Unilaminares Gigantes

HBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato

HEPES = Ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1-etano sulfónico

HFIP = Hexafluoroisopropanol

HOBT = 1-hidroxibenzotriazol

I = Fase Isotrópica

IA = Índice de agregación

ⁱPrOH = Isopropanol

Kcps = Kilocuentas por segundo

LC = Cristales líquidos

Ln = Fase Laminar

LUV = Vesículas unilaminares

ME = Microscopía electrónica

MeOH = Metanol

MLV = Vesículas multilaminares

MMA = Área molecular promedio

MO = Microscopía Óptica

N = Nemática

NaCl = Cloruro de Sodio

NaHCO₃ = Bicarbonato de Sodio

NaOH = Hidróxido de Sodio

NT = Nanotubo

NW = Nanocable

Pf = Punto de fusión

PI = Fase Pseudoisotrópica

PM = Peso molar

Phe = fenilalanina

PI = Punto Isoeléctrico

POM = Microscopía óptica de luz polarizada.

PSS = Estado foto-estacionario

R_f = Frente de solvente

RMN = Resonancia Magnética Nuclear

RN = Rojo Nilo

SEA = Sustitución electrofílica aromática

SEM = Microscopía Electrónica de Barrido

SmA = Esméctica A

SmC = Esméctica C

SUV = Vesículas unilaminares pequeñas

TBTU = Tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'- tetrametiluronio

TCEP = Tris (B-Cloroetil) Fosfato

TEM = Microscopía electrónica de transmisión

TFA = Ácido Trifluoro acético

TIS = Triisopropilsilano

TLC = Cromatografía de Placa Fina

T_{pen} = Temperatura de penetración

UV-Vis = Espectroscopía Ultravioleta-Visible

INDICE

Resumen	<i>i</i>
Abstract	<i>iv</i>
Acrónimos	<i>vi</i>
Capítulo I: Introducción General	1
1.1. Autoorganización en biología	2
1.2. Química Orgánica y su relación con la Nanoquímica	3
1.3. Química Supramolecular como herramienta para diseñar modernos materiales.....	5
1.4. Fuerzas involucradas en el proceso de autoorganización en Química Supramolecular.....	7
1.5. Procesos de agregación molecular. Autoensamblado versus ensamblado dirigido	10
1.6. Bloques de Construcción usados en esta tesis y sus generalidades estructurales	12
1.6.1. Azobencenos como interruptores moleculares	12
1.6.2. Péptidos.....	16
1.6.2.1. Estructura jerárquica de los péptidos y proteínas	21
Capítulo II: Hipótesis y Objetivos	24
2.1 .Objetivos Generales	25
2.2 .Objetivos Específicos.....	25
Capítulo III: Diseño, síntesis y caracterización estructural y térmica de anfifilos no iónicos basados en azobencenos	26
3.1 . Breve introducción	27
3.2 . Diseño e hipótesis	29
3.3 . Síntesis de anfifilos basados en azobenceno	29
3.4 . Caracterización estructural por Espectroscopía RMN.....	35
3.5. Capacidad de fotomodulación de los anfifilos	35
3.5.1. Fotoisomerización E-Z por Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	35
3.5.2. Fotoreversión Z-E por Espectroscopía UV-Vis.....	38
3.5.3. Fotoisomerización y reversión por Espectroscopía ¹ H-RMN	39
3.6. Comportamiento Líquido Cristalino. Breve introducción	41
3.6.1. Cristales líquidos termótropos. Generalidades.....	42
3.6.2. Comportamiento termotrópico y observación morfológica.....	44
3.7. Conclusión	53
Capítulo IV: Comportamiento interfacial de 4A e interacción con una biomembrana modelo	55
4.1 . Breve introducción y Planteamiento.....	56
4.2 . Autoorganización en la interfase aire/líquido: Isotermas de Langmuir.....	57
4.3 . Visualización de autoorganización en la interfase aire/líquido: Microscopía de Angulo de Brewster (BAM)	61
4.4 . Fotoisomerización de 4A en la interfase aire/líquido	66
4.5 . Comportamiento interfacial de 4A integrado a una biomembrana modelo	66
4.5.1. Monocapas de Langmuir de la mezcla entre 4A y un biomimético de membrana	67
4.5.2. Fotoisomerización de membranas vesiculares mixtas.....	68

4.5.3 Cambios físicos de la membrana biomimética promovidos por 4A.....	69
4.5.4. Penetración en una membrana modelo: monocapas de Gibbs.....	74
4.6. Conclusión.....	75
Capítulo V: Síntesis de nanoazovesículas funcionales de 4A	78
5.1 . Planteamiento y Diseño	79
5.2 . Comportamiento liótrópico: breve introducción y descripción del Método de Penetración de Lawrence	81
5.2.1 . Caracterización del comportamiento liotrópico y observación morfológica de 4A.....	83
5.3 . Determinación de la Concentración de Agregación Crítica (CAC).....	84
5.4 . Síntesis de agregados por la técnica EISA	85
5.5 . Caracterización morfológica de los agregados.....	87
5.5.1 . Caracterización de las vesículas gigantes de 4A.....	87
5.5.2 . Síntesis y Caracterización de las nanoazovesículas de 4A	88
5.6 . Evaluación de la fotoisomerización de las nanoazovesículas de 4A	89
5.6.1 . Evaluación por Espectroscopia de Absorción UV/Vis.....	89
5.6.2 . Evaluación por Dispersión de Luz Dinámica.....	92
5.7 . Evaluación de la estabilidad térmica de las nanoazovesículas de 4A	93
5.8 . Evaluación de la funcionalidad de las nanoazovesículas de 4A	95
5.8.1 . Estudio de liberación fotocontrolada: encapsulamiento y liberación de la sonda calceína.....	95
5.8.2 . Liberación total de la sonda calceína utilizando Tritón X-100	97
5.8.3 . Evaluación de la interacción con el colorante Rojo Nilo.	98
5.9 . Conclusión.....	100
Capítulo VI: Ensamblado dirigido de Ac-FFC-NH2 (Péptido A).....	102
6.1 . Breve Introducción	103
6.1.1 . Difenilalaninas como motivo estructural sencillo para la formación de nanoestructuras	104
6.2 . Hipótesis y Diseño	108
6.3 . Síntesis del Péptido A	110
6.4 . Estudio de la agregación mediada por cambio de solvente. Consideraciones Generales.....	112
6.4.1 . Autoorganización a pH 3.0 en condiciones oxidantes.....	117
6.4.2 . Autoorganización a pH 3.0 en condiciones reductoras (TCEP)	120
6.4.3 . Autoorganización a pH 8.0 en condiciones oxidantes.....	121
6.4.4 . Autoorganización a pH 8.0 en condiciones reductoras (TCEP)	124
6.5 . Modulación de la capacidad de autoorganización mediada por estímulos externos.....	126
6.6 . Conclusión y Perspectivas	129
Capítulo VII: Parte Experimental	131
7.1 . Materiales y Métodos del Capítulo III	132
7.1.1 . Materiales.....	132
7.1.2 . Síntesis de compuestos anfífilicos.....	133
7.1.2.1 . <i>Reacción de obtención de 4, 4'-hidroxiazobenceno</i>	133
7.1.2.2 . <i>Reacción de obtención de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno</i>	134

7.1.2.3 . Reacción de obtención de 1-dodeciloxi-4-nitrobenceno (1A).....	135
7.1.2.4 . Reacción de obtención de 4-dodeciloixianilina (2A).....	136
7.1.2.5 . Reacción de obtención de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3A).....	136
7.1.2.6 . Reacción de obtención de 4-dodeciloxi-4' - (1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4A)	138
7.1.2.7 . Reacción de obtención de 3-dodeciloxi-nitrobenceno (1B)	139
7.1.2.8 . Reacción de obtención de 3-dodeciloixianilina (2B).....	140
7.1.2.9 . Reacción de obtención de 3-dodeciloxi-4' - hidroxiazobenceno (3B).....	141
7.1.2.10 . Reacción de obtención de 3-dodeciloxi-4' - (1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B)	142
7.1.2.11 . Reacción de obtención de trietilenglicol p-toluenesulfonato	143
7.1.3 . Espectroscopía Uv-Vis	143
7.1.4 . Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	144
7.1.5 . Microscopía Óptica de Luz Polarizada (POM) con platina de temperatura controlada y placa de retardación de 1λ	146
7.2 . Materiales y Métodos del Capítulo IV	149
7.2.1 . Materiales.....	149
7.2.2 . Monocapas de Langmuir	149
7.2.3 . Medidas de BAM	151
7.2.4 . Fotoisomerización de las monocapas	152
7.2.5 . POM.....	152
7.2.6 . DSC	152
7.2.7 . Monocapas de Gibbs.....	153
7.3 . Materiales y Métodos del Capítulo V	154
7.3.1 . Determinación de la concentración de agregación crítica (CAC).....	154
7.3.2 . Síntesis de vesículas por evaporación inducida (EISA).....	154
7.3.3 . POM.....	154
7.3.4 . Microscopía electrónica (EM)	154
7.3.4.1 . Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	155
7.3.4.2 . Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	156
7.3.5 . Dispersión de Luz Dinámica.....	157
7.3.6 . Espectroscopía Uv-Vis	157
7.3.7 . Espectroscopía de Fluorescencia	157
7.3.7.1 . Encapsulamiento y liberación de calceína	158
7.3.7.2 . Liberación total de calceína utilizando Tritón X-100 (TX-100)	158
7.3.7.3 . Interacción con Rojo Nilo	159
7.4 . Materiales y Métodos del Capítulo VI	160
7.4.1 . Materiales.....	160
7.4.2 . Síntesis de Péptidos en Fase Sólida.....	160
7.4.2.1 . Montaje	160
7.4.2.2 . Reactivos y disolventes utilizados	161
7.4.2.3 . Método analítico para la determinación de aminas libres: test de Kaiser	161

7.4.2.4 . Preparación de la resina.....	162
7.4.2.5 . Proceso sintético	163
7.4.3 . Caracterización estructural	166
7.4.4 . Espectroscopía UV-Vis.....	166
7.4.5 . MO y POM	167
7.4.6 . TEM.....	167
7.4.7 . SEM.....	168
Capítulo VIII: Anexo	169
8.1 . Publicaciones.....	170
8.2 . Espectros de la moléculas sintetizadas	174

Capítulo I

Introducción General

1.1 Autoorganización en biología

Desde simples biomoléculas hasta los sistemas biológicos más complejos, la Naturaleza se nos revela como una maquinaria compleja y sofisticada, maravillándonos. Si bien esta maquinaria está gobernada por leyes sencillas que conducen al reconocimiento y la autoorganización, hasta el momento es muy difícil mimetizar el exquisito control espacial y temporal ejercido por la Naturaleza.¹

Los sistemas autoorganizados² se caracterizan por su diversidad tal que se presentan tanto en un complejo receptor-ligando a nivel biomolecular, pasando por el autoensamblado de partículas de virus microscópicos³, hasta la formación de estructuras macroscópicas fibrilares como las producidas por arañas y gusanos de seda.⁴ La información para el ensamblaje de las macromoléculas en agregados nanoestructurados de gran complejidad está contenida en las propias subunidades que las forman. En las condiciones adecuadas, es posible promover la agregación espontánea de las subunidades originando la estructura final. El virus del mosaico del tabaco fue el primer autoagregado macromolecular modelo para el estudio del proceso de agregación (Figura 1.1), el cual es capaz de formarse a partir de sus componentes disociados, ARN y subunidades proteicas, al mezclarlos en solución.

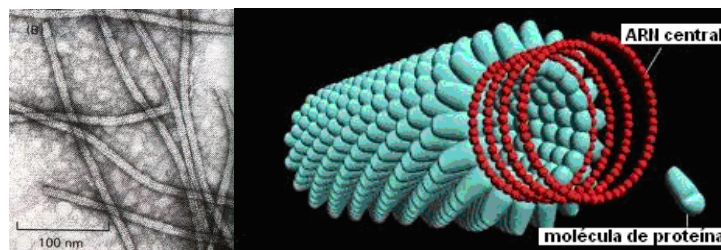


Figura 1.1 Virus del mosaico del tabaco. TEM (derecha) y esquema de sus constituyentes (izquierda).

Además de las proteínas y ácidos nucleicos, otras moléculas responsables de las funciones vitales de las células, como los lípidos, pueden autoorganizarse en nanoestructuras ordenadas tales como las bicapas, constituyentes de la membrana celular.

Las membranas biológicas no solo confinan estructuras delimitando su espacio funcional, sino que mantienen las diferencias esenciales entre el interior y el entorno exterior inmediato que las rodea. La membrana citoplasmática celular contiene los diferentes tipos de organelas

¹ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson, *Molecular Biology of the cell*, 6ta ed. Garland Publishing: New York,, 641 (2015).

² G.M. Whitesides, B. Grzybowski, 'Self-assembly at all scales'(2002) 295 *Science* 2418.

³ T. Pawson y P.Nash, 'Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains' (2003) 300 *Science* 445.

⁴ S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibe, A.R. Bausch, 'Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins' (2008) 105 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 6590.

tales como núcleo, retículo endoplasmático rugoso y liso, mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi, entre otros. Las organelas, a su vez, también constituyen sistemas autoensamblados conformadas por proteínas y una membrana interna con actividad funcional similar a la membrana plasmática de la célula (Figura 1.2). Estas organelas responsables del funcionamiento celular tienen morfologías características las cuales están directamente relacionadas con sus funciones biológicas.¹

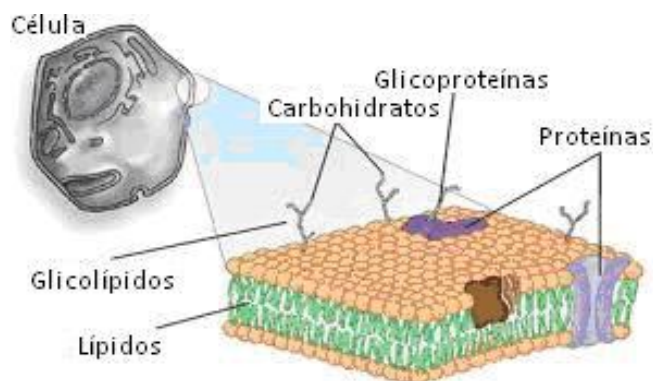


Figura 1.2 Dibujo de una célula y los constituyentes de la membrana celular.

La importancia de la morfología en relación a su función es obvia en el mundo biológico, pero no resulta tan evidente desde la perspectiva química. Así el estudio de la relación entre estructura química-morfología ha emergido como un área de la química con muchas potencialidades ya sea en el estudio de sistemas biológicos como en el desarrollo de materiales biomiméticos.

1.2 Química Orgánica y su relación con la Nanoquímica

Podemos referirnos al estudio y la síntesis de sistemas químicos con características y funcionalidad en la escala de longitud del orden nanométrico como la nanoquímica, y a aquellos compuestos con características de tamaño del orden de 1 a 100 nm como nanomateriales, definidos como materiales cuyas propiedades cambian según su tamaño, o el tamaño de sus componentes. En términos generales, hay dos enfoques para la dimensión de la nanoescala: “botton-up” y “botton-down”.⁵ El enfoque de “botton-down” incluye las modernas técnicas para la producción de componentes electrónicos y es el que se aplica en la nanotecnología. La ingeniería a la nanoescala implica seguir un procedimiento, como un ingeniero o un artesano hace a escala macroscópica, pero utilizando técnicas especializadas con el fin de miniaturizar los procesos. Al contrario, el enfoque de “botton-up” mimetiza la autoorganización biológica, y

⁵G. Ozin y A. Arsenault, *Nanochemistry*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, (2005).

tiene como objetivo producir componentes funcionales a través de la autoorganización de moléculas. A este proceso nos referimos como nanoquímica. También podemos incluir en la nanoquímica al diseño de los sistemas moleculares que aportan características, funcionalidad o propiedades emergentes en la escala nanométrica. Así el autoensamblaje molecular puede definirse como el proceso por el cual dos o más componentes se organizan y asocian, de forma autónoma, para dar lugar a superestructuras de forma espontánea. El autoensamblaje molecular puede ser de dos clases: dinámico o estático.⁶

En el primer caso, la interacción responsable de la organización de la estructura, tiene lugar disipando energía, como por ejemplo: sistemas solares, y reacciones de difusión.⁷ En el segundo caso el sistema está en equilibrio global o local, y no se disipa energía, en este caso la organización de la estructura puede requerir el aporte de energía, como es el caso de los cristales líquidos⁸ y cristales moleculares.⁹

Por otro lado la química medicinal se relaciona principalmente con la aplicación de técnicas de investigación química dirigida principalmente a la síntesis de fármacos. Durante las primeras etapas del desarrollo de la química medicinal, los científicos se interesaron principalmente por el aislamiento de compuestos bioactivos que se encuentran en plantas y animales y recientemente este área ha tenido un gran resurgimiento debido al desarrollo de otras áreas de la ciencia como la genómica.^{10, 11} Hoy en día, el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas está más relacionado con la química orgánica sintética, tales como la química combinatoria.¹² Sin embargo, los arreglos supramoleculares tienen especial interés en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, debido principalmente a su importancia en la bioactividad y en el transporte de las moléculas en los sistemas vivos.¹³ Por otro lado, en los últimos años la agregación proteica se ha convertido en un tema de elevada importancia en biología, biotecnología y medicina.¹⁴ Un número creciente de evidencias demuestran fehacientemente que el mal plegamiento de proteínas y su agregación, muchas veces en forma de fibras amiloides, conlleva la formación de depósitos celulares insolubles que son los responsables finales de un creciente número de enfermedades humanas. Este tipo de enfermedades,

⁶ G. M. Whitehouse, B. Grzybowski, 'Self-assembly at all scales' (2002) 295(5564) *Science* 2418.

⁷ S. Jakubith, H. Rotermund, W. Engel, A. von Oertzen, G. Ertl, 'Spatiotemporal concentration patterns in a surface reaction: Propagating and standing waves, rotating spirals, and turbulence' (1990) 65 *Phys. Rev. Lett.* 3013.

⁸ J.C. Loudet, P. Barois, P. Poulin, 'Colloidal ordering from phase separation in a liquid-crystalline continuous phase' (2000) 407 *Nature* 611.

⁹ L. Isaacs, D. N. Chin, N. Bowden, Y. Xia, G. M. Whitesides, *Supramolecular Materials and Technologies*, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1-46 (1999).

¹⁰ E. Fischer, 'Nobel Lecture: Syntheses in the Purine and Sugar Group' Nobelprize.org. Nobel Media AB (2013) Web. 30 Sep 2013.

¹¹ A. L. Harvey, R. A. Edrada-Ebel y R. J. Quinn, 'The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era' (2015) 14 *Nature Reviews Drug Discovery* 111.

¹² R.B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, 2da ed, Academic Press, (2004).

¹³ K.K. Jain, *Drug Delivery Systems Series. Methods in Molecular Biology*, 437, Humana Press, (2008).

¹⁴ F. Geneser, '*Introducción*', *Histología* Editorial Panamericana, (2000).

agrupadas bajo el concepto de enfermedades conformacionales, engloban una gran diversidad de afecciones tanto neurodegenerativas como sistémicas de las que cabría destacar enfermedades con una gran relevancia socioeconómica como pueden ser la enfermedad de Alzheimer¹⁵, de Parkinson¹⁶, la amiloidosis sistémica¹⁷ y el cáncer.¹⁸

Por lo expuesto, la comprensión del proceso de autoorganización podría proporcionar herramientas racionales en la lucha contra estas enfermedades, no sólo para comprenderlas sino también para proporcionar formulaciones de fármacos eficaces, selectivas y específicas.

1.3 Química Supramolecular como herramienta para diseñar modernos materiales

La Química Supramolecular ha sido definida por Jean-Marie Lehn, quién ganó el Premio Nobel por su trabajo en el área de química supramolecular en 1987, como la "química de los conjuntos moleculares y de la unión intermolecular".¹⁹ Más coloquialmente, podría expresarse como "química más allá de la molécula". Otras definiciones incluyen frases como "la química del enlace no covalente" y "la química no molecular. Originalmente la química supramolecular se definía en términos de la interacción no covalente entre una molécula "anfitrión" y una molécula "huésped".

¹⁵ S. Sadigh-Eteghad et al, 'Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease' (2015) 24(1) *Med Princ Pract* 1.

¹⁶ L. Breydo, J. W. Wu y V. N. Uversky, 'Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease' (2012) 1822(2) *Biochim Biophys Acta* 261.

¹⁷ L. M. Blancas-Mejia y M. Ramirez-Alvarado, 'Systemic amyloidoses' (2013) 82 *Annu Rev Biochem* 745.

¹⁸ L. P. Rangel et al, 'The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer' (2014) 8(1) *Prion* 75.

¹⁹ J.-M. Lehn, 'Nobel Lecture: Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives: Molecules - Supermolecules - Molecular Devices' *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 14 Jan 2017. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/lehn-lecture.html>

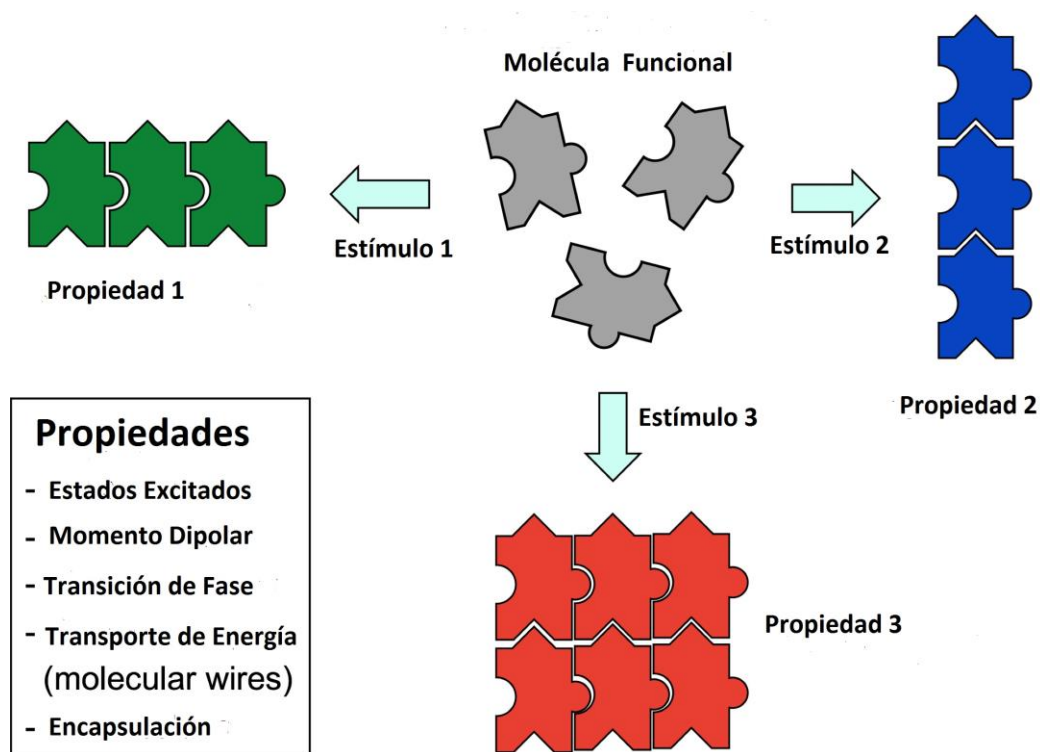


Figura 1.3. Dibujo que representa la idea de química supramolecular moderna.

El trabajo en la química supramolecular moderna no sólo abarca los sistemas anfitrión-huésped, sino también dispositivos y maquinarias moleculares, procesos de reconocimiento molecular, también llamados "auto-procesos", tales como el autoensamblaje y autoorganización y presenta una importancia singular en la interface con la nanoquímica. Una máquina de nivel molecular se puede definir como "un conjunto de un número distinto de componentes moleculares que están diseñados para realizar movimientos similares a una máquina (salida) como resultado de una estimulación externa apropiada (entrada).²⁰ Además, una máquina requiere un suministro de energía para su funcionamiento, y puede ser impulsado por fuentes de energía adecuadas. En paralelo con su influencia en muchas otras áreas, Richard Feynman (Premio Nobel de Física 1965) también ha sido una fuente de inspiración en este campo. En su charla visionaria en la Reunión Anual de la Sociedad Americana de Física en 1959, llamó la atención sobre la posibilidad de construir pequeñas máquinas a partir de átomos, y al reto de, por ejemplo, hacer una máquina infinitesimal como un automóvil. Destacó algunas de las posibilidades y problemas asociados con la escala atómica²¹, que en cierta medida se convirtió en una inspiración para seguir avanzando hacia la maquinaria molecular.

²⁰ V. Balzani, A. Credi, F. Raymo, J. Stoddart, 'Artificial Molecular Machines' (2000) 39 (19) *Angew. Chem. Int. Ed.* 3348.

²¹ R. P. Feynman, R. B. Leighton y M. Sands, 'The Feynman Lectures on Physics' (1966) 46 (1) *Addison-Wesley, Reading, MA.*

Con el fin de construir una máquina compleja, generalmente se requieren varios bloques constructivos, y la función del dispositivo está destinada a ser una consecuencia de su montaje. El diseño de los componentes, y el control de su conectividad integral, está así en el corazón del desarrollo de la máquina. Además, un alto grado de movimiento relativo controlado entre sus partes es esencial para que la máquina produzca la operación deseada. Controlando la traducción y los movimientos de rotación de los componentes de la máquina, acoplados a una entrada de energía externa, es posible obtener la función predeterminada. Una máquina también necesita interactuar con su entorno, cuando sus operaciones ocurren a escala molecular, para poder superar la fluctuación térmica (movimiento browniano) que influye en su acción mecánica. Este desafío ha sido abordado por químicos y físicos (teóricos) con el objetivo de escapar al ruido aleatorio o de aprovecharlo para el movimiento controlado.^{22, 23} En última instancia, el control y la conducción de la máquina mediante el abastecimiento externo de luz u otras fuentes de energía le llevarán a funcionar fuera del equilibrio en sistemas disipativos. Esta acción es esencialmente mantenida por los componentes del motor de la máquina, que impulsan el movimiento relativo y el funcionamiento de otras partes incorporadas.

Dos importantes avances tecnológicos han demostrado ser particularmente útiles para abordar el complejo reto de construir máquinas a escala molecular. El primero de ellos consiste en el entrelazamiento topológico y los denominados enlaces mecánicos,^{24, 25, 26, 27} mientras que el segundo se basa en enlaces isomerizables (insaturados),²⁸ y ambos avances han dado lugar a amplios rangos de estructuras complejas con funciones similares a las máquinas. Por estos trabajos se ha otorgado el Premio Nobel de Química 2016 a Jean-Pierre Sauvage, J. Fraser Stoddart and Ben L. Feringa.²⁹

1.4 Fuerzas involucradas en el proceso de autoorganización en Química Supramolecular

En un medio acuoso, los enlaces covalentes son entre 10 y 100 veces más fuertes que el resto de las fuerzas de atracción entre los átomos, por lo cual este tipo de unión es la que

²² A. Ajdari y J. Prost, 'Drift Induced by a Spatially Periodic Potential of Low Symmetry – Pulsed Dielectrophoresis' (1992) 315 (13) *C. R. Acad. Sci. Paris* 1635.

²³ R. D. Astumian, 'Thermodynamics and Kinetics of a Brownian Motor' (1997) 276 (5314) *Science* 917.

²⁴ C. O. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage y J. P. Kintzinger, 'Une nouvelle famille de moléculas: Les métallos-caténanes' (1983) 24 (46) *Tetrahedron Lett.* 5095.

²⁵ M. Cesario, C. Dietrich-Buchecker, J. Guilhem, C. Pascard y J.-P. Sauvage, 'Molecular Structure of a Catenand and Its Copper(I) Catenate: Complete Rearrangement of the Interlocked Macrocyclic Ligands by Complexation' (1985) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 244.

²⁶ P. L. Anelli, N. Spencer y J. F. Stoddart, 'A Molecular Shuttle' (1991) 113 (13), *J. Am. Chem. Soc.* 5131.

²⁷ R. A. Bissell, E. Córdova, A. E. Kaifer y J. F. Stoddart, 'A Chemically and Electrochemically Switchable Molecular Shuttle' (1994) 369 (6476) *Nature* 133.

²⁸ N. Koumura, R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delden, N. Harada, B. L. Feringa, 'Light-Driven Monodirectional Molecular Rotor' (1999) 401 (6749) *Nature* 152.

²⁹ L. Feringa, 'The 2016 Nobel Prize in Chemistry - Press Release' Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 4 Jan 2017. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/press.html>

determina las conexiones entre los átomos de las moléculas. Considerando la biología, es importante destacar la importancia de las uniones específicas entre las moléculas, las cuales son mediadas por un grupo de atracciones no covalentes que son bastante débiles individualmente, pero que sumadas energéticamente son decisivas en la creación de fuerzas efectivas de unión entre las superficies complementarias de dos macromoléculas capaces de interactuar entre ellas.

Las uniones no covalentes son: las atracciones electrostáticas (enlaces iónicos); las uniones puente hidrógeno; las atracciones de van del Waals; y el efecto hidrofóbico (Figura 1.4).

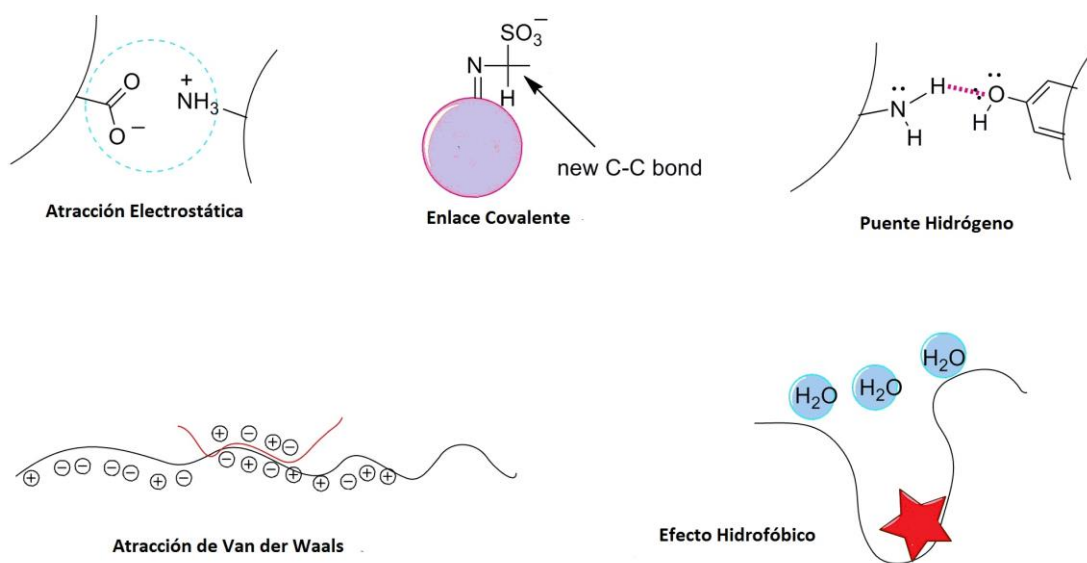


Figura 1.4 Dibujos de diferentes tipos de interacciones entre moléculas (modificado de Veuthey et. al).³⁰

La tabla 1.1 compara las fuerzas de los tres primeros tipos de enlaces no covalentes, con la de un enlace covalente típico, ambos en presencia y en ausencia de agua. El efecto hidrofóbico no está especificado en la tabla por no considerarse estrictamente un enlace.^{31, 32}

³⁰ T.V. Veuthey, M. G. Herrera y V. I. Dodero. 'Dyes and Stains: from molecular structure to histological application' (2014) 1 T *Frontiers in Bioscience* Landmark Edition 91.

³¹ J. W. Steed y J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2nd edition John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 978-0-470-51233-3 (2009).

³² P. Metrangolo, F.Meyer, T.Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, 'Halogen Bonding in Supramolecular Chemistry' (2008) 47(33) *Angewandte Chemie* 6114.

TIPO DE ENLACE	DISTANCIA (nm)	FUERZA (kcal/mol)	
		EN VACÍO	EN AGUA
·Covalente	0,15	90	90
No covalentes:			
·Atracción electrostática iónica	0,25	80	3
·Puente hidrógeno	0,30	4	1
·Van del Waals	0,35	0,1	0,1

Tabla 1.1 Uniones químicas covalentes y no covalentes.

A continuación se comenta brevemente cada uno de estos tipos de interacciones supramoleculares:

- Atracciones electrostáticas: son las fuerzas de atracción entre átomos de cargas opuestas y son de marcada importancia en ausencia de agua. Están presentes en moléculas polares con dipolos permanentes pero son mucho más fuertes cuando los átomos involucrados están completamente cargados (enlaces iónicos). En el entorno biológico, la presencia de moléculas polares de agua rodea a los átomos cargados (tanto iones como dipolos permanentes) formando clusters que reducen considerablemente la atracción de las especies cargadas.
- Uniones puente hidrógeno: este enlace representa una forma especial de interacción polar en la cual un átomo de hidrógeno electropositivo es parcialmente compartido por dos átomos electronegativos. Esta disposición de un hidrógeno asociado a un átomo donador para ser compartido por un segundo átomo aceptor es altamente direccionada, originando una unión muy fuerte cuando forma una línea recta entre los tres átomos involucrados. La presencia de moléculas de agua debilita esta unión por la competencia en la formación de los puentes de hidrógeno intermoleculares.
- Atracciones de tipo van der Waals: la nube electrónica alrededor de cualquier átomo no polar fluctúa produciendo un dipolo oscilante, el cual va a inducir transitoriamente un dipolo de polarización opuesta en otro átomo cercano. Aunque esta interacción genera una atracción muy débil entre átomos, al involucrar muchos átomos simultáneamente, el efecto final resulta significativo. El agua no debilita este tipo de atracción.
- Efecto hidrofóbico: son fuerzas causadas por la expulsión de las superficies no polares fuera del entramado puente hidrógeno del agua, de manera de evitar su interferencia física en las interacciones altamente favorables entre las moléculas de agua. Son

consideradas fuerzas no específicas porque las superficies no polares son recluidas juntas como resultado de reducir su contacto con el agua. Son las fuerzas que intervienen principalmente en la autoensamblado de anfifilos en estructuras bien definidas como micelas y bicapas, así como en el adecuado plegamiento de las moléculas de una proteína en su estructura cuaternaria, responsable de su función.

Estas cuatro fuerzas de interacción son conocidas como fuerzas de intra-agregación porque determinan el empaquetamiento entre moléculas del mismo tipo, formando diferentes estructuras supramoleculares que pueden ser transformadas unas en otras al cambiar las condiciones de la solución, tales como fuerza iónica, pH o temperatura. Un tipo particular, pero muy común, de moléculas que forman este tipo de estructuras supramoleculares en solución acuosa son aquellas llamadas moléculas anfifílicas. Un ejemplo típico de este tipo de moléculas lo componen los ácidos cólicos y derivados, presentes en la bilis, encargados de emulsionar los componentes oleosos en el intestino delgado.³³ Son moléculas que presentan tanto características lipofílicas como hidrofílicas, debido a que en su estructura molecular hay dos o más zonas con diferente hidrosolubilidad. Esta diferencia de hidrosolubilidad entre los segmentos de una molécula genera que estén presentes varias interacciones intermoleculares en los sistemas donde participan las moléculas anfifílicas, tanto consigo mismas como con el medio continuo.

1.5 Procesos de agregación molecular. Autoensamblado versus ensamblado dirigido³⁴

La agregación molecular tiene lugar según dos tipos de procesos básicos. En primer lugar, el ensamblado de moléculas en clusters, nanopartículas, o inclusive agregados coloidales más grandes, puede ocurrir de forma espontánea, este proceso es conocido como *autoagregación*. Por otra parte, hay procesos que requieren de energía (impulsados por un campo externo) que conducen a estructuras no necesariamente favorecidas termodinámicamente, de tipo metaestables, de larga vida media, o que corresponden a un pseudo-estado estacionario. Estos últimos no alcanzan un verdadero estado de equilibrio y son denominados procesos de *agregación dirigida (Directed-Assembly)*. La energía puede ser entregada en forma de trabajo mecánico (flujo o presión), calor, luz, electricidad, magnetismo o energía química.

Las estructuras biológicas en general se encuentran en un estado de no equilibrio. Desafortunadamente, a diferencia de los sistemas termodinámicos, las estructuras y procesos de

³³ J. Maldonado-Valderrama, P. Wilde, A. Macierzanka, y A. Mackie, 'The role of bile salts in digestion' (2011) 165(1) *Advances in Colloid and Interface Science* 36.

³⁴ J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, 3ª Edition, DOI: 10.1016/B-978-0-12-391927-4.10021-0, Elsevier Inc. Pag 629 (2011).

no-equilibrio o equilibrio de fluctuación lento, no tienen ecuaciones fundamentales, similares a las leyes de la Termodinámica, que puedan predecir qué tipo de estructura va a ser formada, incluso cuando la velocidad y el tipo de energía suministrada sean específicas, si bien ciertas “ecuaciones maestras” han sido propuestas desde la física teórica.^{35, 36} Las estructuras en el estado estacionario pueden ser las mismas que las estructuras en el estado de equilibrio, aunque obtenidas bajo condiciones experimentales distintas; o pueden ser totalmente diferentes, no equivalentes con un estado de equilibrio en particular, por ejemplo, una fase laminar en equilibrio cambiando a una fase micelar ordenada o a una fase hexagonal cuando es sometida a fricción. Son conocidas como estructuras en estado estacionario fuera del equilibrio, que requieren un continuo suministro de energía para mantenerse.

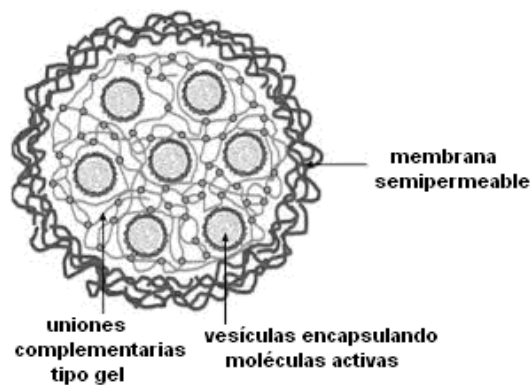


Figura 1.5 Esquema de estructura biomimética producida por agregación dirigida con aplicaciones biomédicas como la liberación controlada de drogas o drug-delivery.

Organizaciones altamente complejas, como la que se muestra en la Figura 1.5, pueden ser diseñadas únicamente a través de la combinación de ambos procesos de *autoagregación* y *agregación dirigida*, requiriendo de varias etapas en la mayoría de los casos. Estructuras formadas por agregación dirigida, que mimetizan estructuras biológicas, pueden ser controladas reversiblemente a través de la modulación de las fuerzas involucradas entre las estructuras, por ejemplo, por aplicación de luz de diferentes longitudes de onda para fotoisomerizar reversiblemente las moléculas que las constituyen. Este tipo de materiales fluidos complejos son corrientemente denominados “inteligentes”, “controlados”, “conmutables”, y/o “adaptables”.

³⁵ J. Schnakenberg, 'Network theory of microscopic and macroscopic behavior of master equation systems' (1976) 48 *Rev. Mod. Phys.* 571.

³⁶ M. Bier, y R. van Roij, 'Relaxation dynamics in fluids of platelike colloidal particles' (2007) 76 *Phys. Rev. E* (2Pt1):021405.

1.6 Bloques de Construcción usados en esta tesis y sus generalidades estructurales

1.6.1 Azobencenos como interruptores moleculares.³⁷

Los azobencenos son una familia de compuestos que poseen dos restos aromáticos unidos a través de un grupo azo (-N=N-). Estos compuestos se caracterizan por ser muy coloreados, propiedad que los lanzó a la industria de los denominados colorantes FD&C [de las siglas inglesas comida (food), medicamentos (drug) y cosméticos (cosmetics)]. Actualmente estos colorantes azoicos representan aproximadamente el 60% de la producción industrial.^{38, 39, 40} Las más recientes aplicaciones están relacionadas con su utilización como interruptores ópticos.^{41, 42}

El grupo azobenceno puede ser considerado como un material fotocromico, es decir, que cambia de color al ser irradiado con luz, ya que al igual que los dobles enlaces carbonados, los azobencenos poseen dos isómeros geométricos (*E/Z*) en torno al -N=N- que absorben a diferente longitud de onda, el isómero *trans* (*E*) es ~ 12 Kcal mol⁻¹ (0,6 eV) más estable que el isómero *cis* (*Z*).⁴³

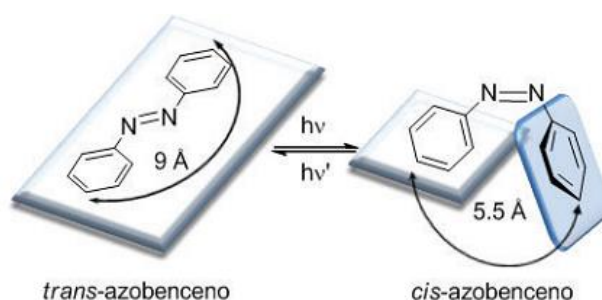


Figura 1.6 Fotoisomerización del grupo azobenceno.

La barrera de energía del estado foto-excitado es del orden de ~ 23 Kcal mol⁻¹ (1,0 eV).⁴⁴ El *trans* azobenceno se isomeriza en el confórmero *cis* por absorción de un fotón de una frecuencia determinada, al ser irradiado con luz de longitud de onda entre 320-350 nm. La reacción es reversible y el isómero *trans* es recuperado por irradiación del isómero *cis* con luz de 400-450 nm, o por reversión térmica. Para muchos azobencenos, ambas conversiones fotoquímicas

³⁷ E. Merino y M. Ribagorda, 'Control over molecular motion using the cis–trans photoisomerization of the azo group' (2012) 8 *Beilstein J. Org. Chem.* 1071.

³⁸ P. F. Gordon y P. Gregory, *Organic Chemistry in Colour*, Springer, 95 (1983).

³⁹ H. Zollinger, *Color Chemistry. Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, 3rd ed., Wiley-VCH, (2003).

⁴⁰ K. Hunger, *Industrial Dyes: Chemistry, Properties and Applications*, Wiley-VCH, 14, (2003).

⁴¹ K. G., Yager, C. J. Barrett, 'Novel photo-switching using azobenzene functional materials' (2006) 182 *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 250.

⁴² Y. Gong, T. Jiao, Q. Hu, N. Cheng, W. Xu, Y. Bi y L. Yu, 'Rational Design of Multiple-Stimulus-Responsive Materials via Supramolecular Self-Assembly' (2015) 119 *J. Phys. Chem. C* 16349.

⁴³ H. Rau, 'Spectroscopic Properties of Organic Azo-Compounds' (1973) 12 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 224.

⁴⁴ E. V. Brown, G. R. Gruneman, (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, 621.

ocurren en la escala de picosegundos, mientras que la relajación térmica del isómero *cis* al *trans* es mucho más lenta (milisegundos a días). Si tanto el isómero *trans* como el isómero *cis* absorben luz en la frecuencia incidente, se genera un estado foto-estacionario (PSS) donde existe equilibrio entre los dos isómeros. El proceso de foto-isomerización *trans*→*cis*, lleva implícito un cambio notable de sus propiedades físicas como la geometría molecular, momento dipolar y el espectro de absorción.^{45, 46, 47, 48}

En el proceso de isomerización la distancia entre las posiciones más alejadas de los anillos aromáticos disminuye desde 9,0 Å (*trans*) hasta 5,5 Å (*cis*) (Figura 1.6).⁴⁹ El isómero *trans* es prácticamente plano ($\mu \sim 0$), mientras que el isómero *cis* adopta una geometría angular, en la que uno de los anillos gira para evitar repulsiones estéricas, enfrentando una de las nubes π de un anillo aromático al otro, dando como resultado un $\mu \sim 3.0$ D.^{50, 51} Esta disposición de los anillos aromáticos se refleja también en los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN). Las señales correspondientes al isómero *cis* sufren un apantallamiento, debido al efecto anisotrópico de la nube π del anillo aromático, apareciendo a campo más alto que las señales correspondientes del isómero *trans*.⁵²

El espectro de absorción de UV de un azobenceno presenta dos bandas de absorción características, correspondientes a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se encuentra generalmente en la región de UV-cercano y es también común a sistemas carbonados referibles como el estilbena (Figura 1.7).⁵³ La transición electrónica denominada $n \rightarrow \pi^*$ se suele situar en la región del visible, y se debe a la presencia del par de electrones sin compartir de los átomos de nitrógeno.⁵⁴ Esta segunda transición electrónica hace que los azobencenos tengan un proceso dinámico de fotoisomerización diferente a los sistemas carbonados.

⁴⁵ H. Sugimoto, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, Eds.: W. M. Horspool, P. S. Song, CRC Press: Boca Ra-ton, FL, USA, 824, (1995).

⁴⁶ H. Rau, 'Azo Compounds. In Photochromism, Molecules and Systems'(2003) Vol. 1, Dürr, H.; Bouas-Laurent, H., Eds.; Elsevier: 165.

⁴⁷ K. Morgenstern, 'Isomerization Reactions on Single Adsorbed Molecules' (2009), 42 (2) *Acc. Chem. Res.* 213.

⁴⁸ J. Henzl, M. Mehlhorn, H. Gawronski y K.-H. Rieder y K. Morgenstern, 'Reversible cis-trans isomerization of a single azobenzene molecule' (2006) 45 *K. Angew. Chem* 603.

⁴⁹ H. Koshima, N. Ojima, H. Uchimoto, 'Mechanical motion of azobenzene crystals upon photoirradiation' (2009) 131 *J. Am. Chem. Soc.* 6890.

⁵⁰ G. S. Kumar, D. C. Neckers, 'Photochemistry of azobenzene-containing polymers' (1989) 89 *Chem. Rev.* 1915.

⁵¹ H. Rau, *Photoisomerization of Azobenzenes. In Photochemistry and Photophysics*, Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 119, (1990).

⁵² S. Peris, B. Tylkowski, J. C. Ronda, R. Garcia-Valls, J. A. Reina y M. Giamberini, 'Photoisomerization of Azobenzene Derivatives Confined in Gold Nanoparticle Aggregates' (2009), 47, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 5426.

⁵³ R. J. Sension, S. T. Repinec, A. Z. Szarka y R. M. Hochstrasser, (1993), 98, *J. Chem. Phys.*, 6291.

⁵⁴ T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, 'Femtosecond laser studies of the cis-stilbene photoisomerization reactions' (1997) 272, *Chem. Phys. Lett.*, 489.

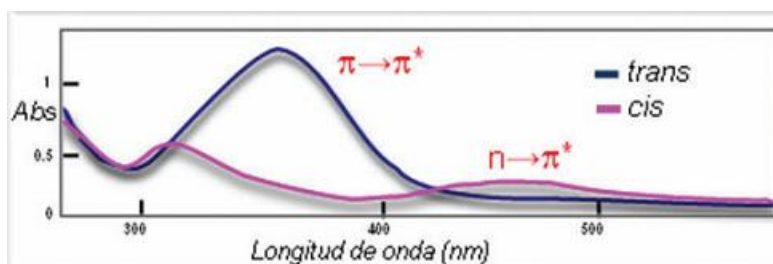


Figura 1.7 Espectro UV- Vis característico de un azobenceno tipo estilbeno

Los azocromóforos aromáticos se pueden clasificar en tres tipos en función del orden energético de sus estados electrónicos: la transición de energía más baja indicada como S_1 ($n-\pi^*$), que ocurre en la región del visible; y la segunda transición que ocurre en la región UV del espectro, denotada como S_2 ($\pi-\pi^*$).⁵⁵ Este orden depende en gran medida de la naturaleza electrónica de los anillos aromáticos del azobenceno. Cada tipo de azocromóforo además tiene un color predominante definido por la longitud de onda de la banda de absorción máxima (λ_{max}) (indicado entre paréntesis en cada caso):

i) Tipo azobenceno: aquellos que presentan una banda $\pi-\pi^*$ muy intensa en la región del UV, y una $n-\pi^*$ más débil en el visible (color amarillo). La naturaleza electrónica de los anillos aromáticos es muy parecida al azobenceno más sencillo (Ph-N=N-Ph).

ii) Tipo aminoazobenceno (para- o orto-(X)- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-N=N-Ph}$): las bandas $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ aparecen muy juntas o incluso colapsan en la región del UV-visible cercano. Son azocompuestos que presentan sustituyentes dadores de electrones (X) en las posiciones orto o para (color naranja).

iii) Tipo pseudo-estilbeno [(X)- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_6\text{H}_4\text{-(Y)}$]: la banda de absorción correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ se desplaza al rojo, cambiando incluso el orden de aparición con la banda $n-\pi^*$. Presentan sustituyentes dadores (X) y aceptores de electrones (Y) en las posiciones 4- y 4'-respectivamente (sistema push/pull) (color rojo).

El proceso de isomerización *trans-cis* suele ir también acompañado de un cambio de color a tonalidades más intensas. Los espectros de absorción de ambos isómeros se diferencian fundamentalmente en los siguientes aspectos:⁵⁶

- Isómero *trans*: la banda de absorción $\pi-\pi^*$ es muy intensa, con un coeficiente de extinción molar⁵⁷ (ϵ) en torno a $2-3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mientras que la segunda banda ($n-\pi^*$) aparece

⁵⁵ H. Rau, *Photocromism, Molecules and Systems*, Eds.: H. Dürr, H. Bounas-Lau-rent, Elsevier, Amsterdam, 165, (1990).

⁵⁶ N. Tamai, H. Miyasaka, 'Ultrafast Dynamics of Photochromic Systems' (2000), 100, *Chem. Rev.*, 1875.

mucho más débil ($\epsilon \sim 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), debido a que esta transición en el isómero *trans* no está permitida por las reglas de simetría (Figura 1.7, línea azul).

- Isómero *cis*: la banda $\pi\text{-}\pi^*$ se desplaza a longitudes de onda más cortas (efecto hipsocrómico), disminuyendo notablemente en intensidad ($\epsilon \sim 7\text{-}10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Por otro lado, la transición electrónica $n\text{-}\pi^*$ (380-520 nm) en el isómero *cis* está permitida, lo que se traduce en un aumento de su intensidad ($\epsilon \sim 1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con respecto al isómero *trans* (Figura 1.7, línea rosa).

Estas diferencias permiten llevar a cabo una interconversión fotoquímica, irradiando con una luz de una determinada longitud de onda (λ) obteniéndose diferentes proporciones de los estados fotoestacionarios (PSS) *cis* y *trans*. La longitud de onda que provoca la excitación depende de la naturaleza de los sustituyentes de los grupos arilo, aunque en la mayoría de los casos, la isomerización *trans*→*cis* se promueve irradiando a longitudes de onda entre 320 y 380 nm, mientras que exposiciones a $\lambda \sim 400\text{-}450$ nm favorecen la fotoreversión *cis*→*trans*. Aunque se han llevado a cabo varios estudios mecanísticos sobre la isomerización *cis-trans* de los azobencenos⁵⁸ y se han estudiado los efectos de los sustituyentes sobre los anillos de benceno, así como la influencia de varios parámetros,^{59, 60, 61, 62, 63} el mecanismo no está perfectamente aclarado. Los datos disponibles hasta ahora sugieren que la isomerización de los azocompuestos puede transcurrir mediante la inversión de uno de los enlaces N-C o por la rotación del doble enlace N=N (Figura 1.8). El par de electrones no enlazante de cada átomo de nitrógeno, puede dar lugar a una transición electrónica $n\text{-}\pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$) con inversión del átomo de nitrógeno (mecanismo de inversión).⁶⁴ Por otro lado, también puede darse la isomerización mediante un mecanismo de rotación,⁶⁵ en el que se produce una transición $\pi\text{-}\pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_2$). Este mecanismo es similar al que se produce en la isomerización del estilbena.⁵⁶ La isomerización *cis-trans* o

⁵⁷ Capacidad que tiene una sustancia de absorber la radiación electromagnética a cada longitud de onda, $\epsilon = A/c \cdot l$ donde A = Absorbancia, c = concentración molar del soluto y l = longitud de la cubeta (habitualmente 1 cm)

⁵⁸ A. Cembran, F. Bernardi, M. Garavelli, L. Gagliardi y G. Orlandi, 'On the Mechanism of the *cis-trans* Isomerization in the Lowest Electronic States of Azobenzene: S_0 , S_1 , and T_1 ' *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126 3234.

⁵⁹ T. Asano, T. Yano y T. Okada, 'Mechanistic study of thermal Z-E isomerization of azobenzenes by high-pressure kinetics' (1982) 104 *J. Am. Chem. Soc.* 4900.

⁶⁰ C.-W. Chang, Y.-C. Lu, T.-T. Wang y E. W.-G. Diau, 'Photoisomerization Dynamics of Azobenzene in Solution with S_1 Excitation: A Femtosecond Fluorescence Anisotropy Study' (2004) 126 *J. Am. Chem. Soc.* 10109.

⁶¹ C. Crecca y A. Roitberg, 'Theoretical study of the isomerization mechanism of azobenzene and disubstituted azobenzene derivatives' (2006) 110 *The Journal of Physical Chemistry A* 8188.

⁶² L. Wang, X. Wang, 'Ab initio study of photoisomerization mechanisms of push-pull p,p'-disubstituted azobenzene derivatives on S_1 excited state' (2007) 847 *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 1.

⁶³ G. Feraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet y E. Marceca, 'Photodissociation UV-VIS spectra of cold protonated azobenzene and 4-(dimethylamino)azobenzene and their benzenediazonium cation fragment' (2016) 120 *Journal of Physical Chemistry A*.

⁶⁴ N. Nishimura, T. Tanaka, M. Asano, Y. Sueishi, 'A volumetric study on the thermal *cis-to-trans* isomerization of 4-(dimethylamino)-4'-nitroazobenzene and 4,4'-bis(dialkylamino)azobenzenes: evidence of an inversion mechanism' (1986), *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1839.

⁶⁵ D. M. Shin, D. G. Whitten, (1988), 110, *J. Am. Chem. Soc.*, 5206.

fotoreversión, ocurre por excitación en el estado S_1 o S_2 , de acuerdo al mecanismo, a partir de calor o luz visible.

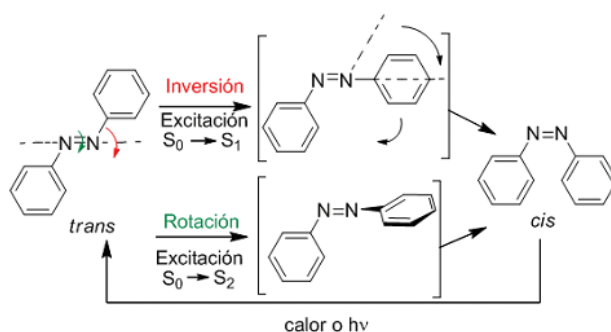


Figura 1.8 Posibles mecanismos de isomerización de azobencenos.

1.6.2 Péptidos

Los péptidos y las proteínas son estructuras de vital importancia en los organismos vivos, siendo el pilar fundamental para su crecimiento.⁶⁶ Los péptidos son polímeros de aminoácidos, mínimas unidades estructurales que se encuentran unidas entre sí a través de enlaces covalentes de tipo amida. Están constituidos por cadenas cortas de aminoácidos y son en su mayoría hormonas, neuromoduladores y neurotransmisores. Entre ellos cabe citar algunas hormonas como la oxitocina (nueve residuos aminoácidos), que estimula las contracciones del útero durante el parto; o la bradiquinina (nueve residuos), que inhibe la inflamación de los tejidos; las encefalinas, péptidos cortos sintetizados en el sistema nervioso central que actúan sobre el cerebro produciendo analgesia; algunos venenos extremadamente tóxicos producidos por algunas setas como *Amanita phalloides*, también son péptidos, al igual que muchos antibióticos.

Los péptidos forman conglomerados, los cuales presentan diferentes conformaciones y a su vez, promueven al desarrollo de las macromoléculas comúnmente llamadas proteínas, constituidas por un número de aminoácidos mayor de las 100 unidades. Las proteínas como “instrumentos moleculares”, materializan la transducción de la información genética constituyendo muchos tejidos y dotándolos de funcionalidad.

Los aminoácidos (AA) son ácidos alfa - amino carboxílicos, cuyo carbono central llamado alfa comparte un grupo ácido y un grupo amino. Para completar el octeto electrónico, este carbono se une además a un hidrógeno y a una cadena lateral representada generalmente con la letra R, la cual varía en tamaño, carga, forma, y composición química de un aminoácido a otro.

⁶⁶ J. Clayden, N. Greeves y S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University Press. (2012)

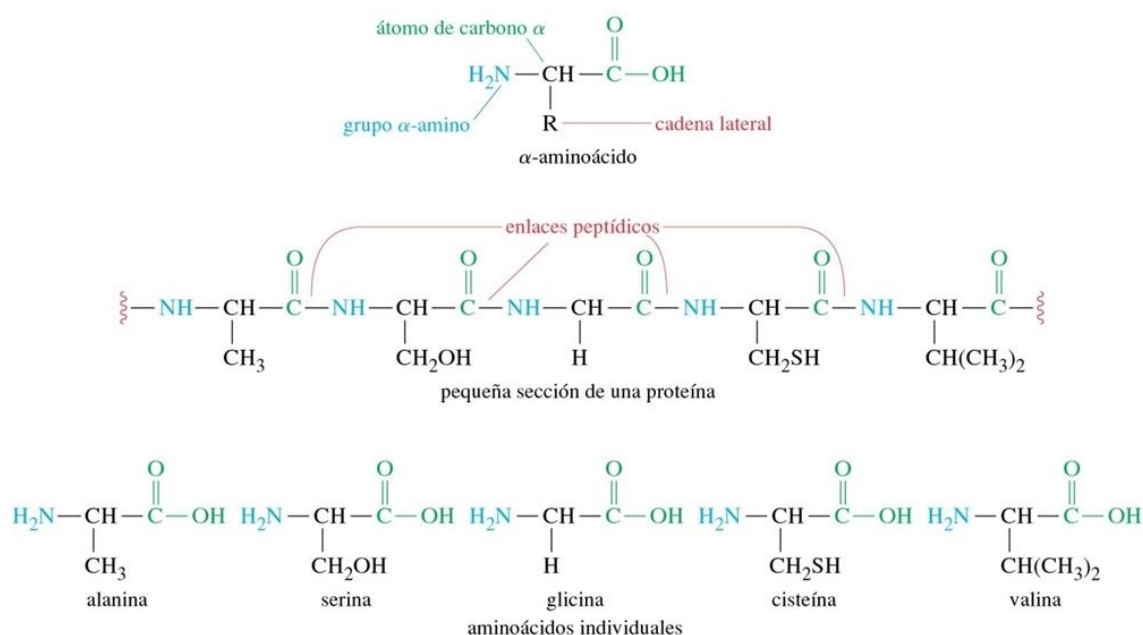


Figura 1.9 Representación esquemática de un aminoácido, en celeste se encuentra el grupo amino, en verde el grupo ácido carboxílico y en negro el carbono alfa asimétrico. La letra R representa la cadena lateral, que le da el nombre a cada aminoácido. También se representa una sección de una proteína, mostrando los enlaces peptídicos (enlaces amida) entre los aminoácidos y por debajo el péptido de cinco residuos que le da origen.⁶⁷ Por convención, el extremo amino terminal o N-terminal se lo considera el comienzo de la cadena peptídica, mientras que el carboxilo terminal o C-terminal, se lo considera el final. El nombre del pentapéptido es: Ala- Ser- Gly- Cys- Val, desde su extremo N- terminal al C-terminal.

En todos los aminoácidos excepto en la glicina, en la cual el grupo R es un hidrógeno, existen cuatro grupos diferentes unidos al carbono alfa, por lo que se genera un centro asimétrico con actividad óptica. Sin embargo de los dos posibles isómeros ópticos, conocidos como L y D, solo el enantiómero con configuración L se encuentra en las proteínas naturales.

La presencia de un grupo ácido y un grupo amino hace que los aminoácidos se encuentren como especies con carga. El estado de ionización varía con el pH. A pH neutro se encuentran en forma de ión dipolar, con carga neta nula, conocido también como *ion zwitterion*, ambos grupos, carboxilato y amonio, están ionizados, llevando una carga negativa ($-\text{COO}^-$) y una positiva ($-\text{NH}_3^+$) respectivamente. En soluciones ácidas la misma molécula de AA compartirá los grupos ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) y amonio ($-\text{NH}_3^+$); y contrariamente, en soluciones alcalinas estarán coexistiendo los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) y amino ($-\text{NH}_2$).

Teniendo en cuenta la polaridad y las características de ionización de las cadenas laterales de algunos residuos de los grupos presentes en la cadena lateral, los 20 aminoácidos

⁶⁷ Extraído de Wade, Química Orgánica, Quinta Edición.

presentes en la naturaleza pueden ser divididos en seis grupos, los cuales se presentan en la Tabla 1.2.

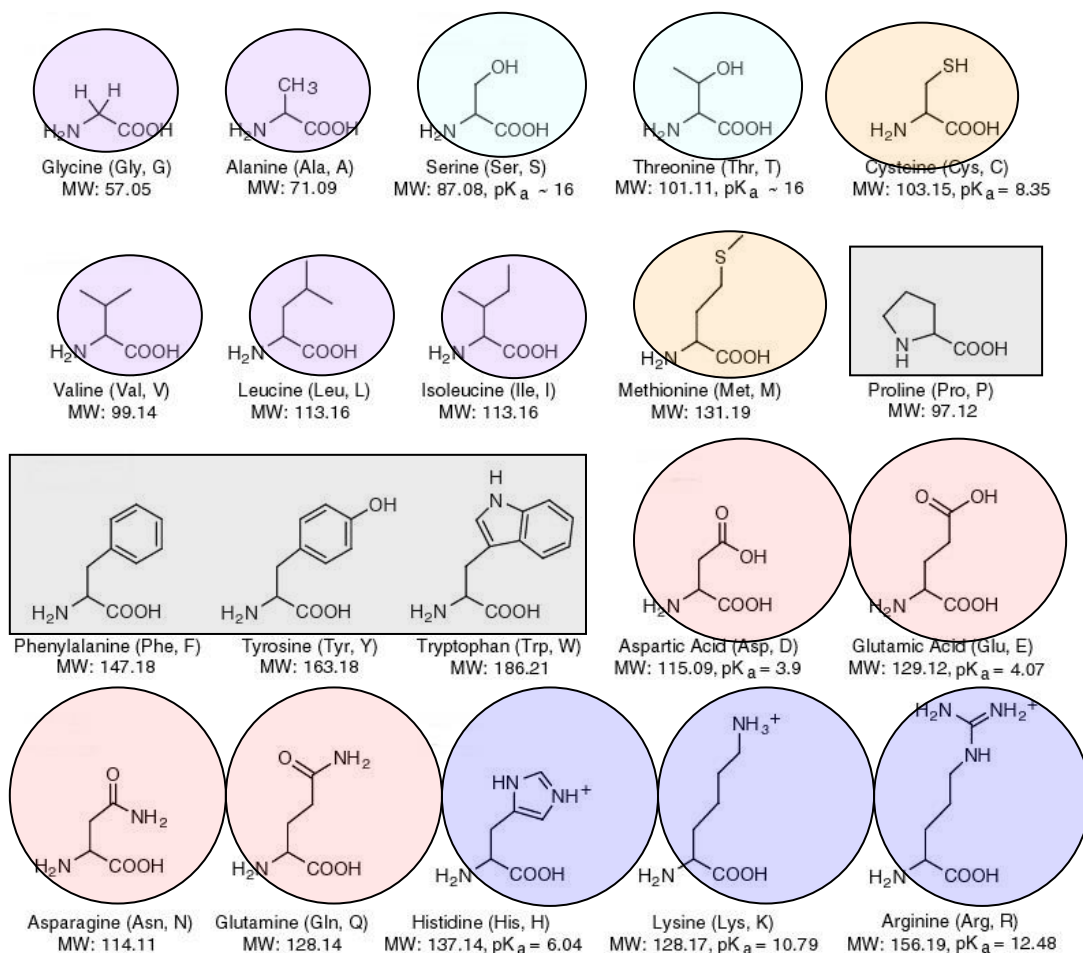


Tabla 1.2 Esquema presentando los 20 aminoácidos ordenados de acuerdo a las características de las cadenas laterales.⁶⁸ Los colores hacen referencia a los 6 grupos. Violeta: AA alifáticos, muy poco solubles en agua; celeste: AA hidroxílicos, polares y muy solubles en agua; rojo: AA ácidos y sus correspondientes amidas, muy polares en condiciones fisiológicas; azul: AA básicos, muy polares en entornos ácidos; gris: AA cíclicos, poco solubles en agua; y anaranjado: AA conteniendo azufre, de los cuales la metionina posee una cadena apolar y en cambio la cisteína un grupo sulfhídrico polar.

Los aminoácidos se unen entre sí mediante un enlace amida que se produce entre un grupo ácido y amino de dos unidades distintas, con pérdida de una molécula de agua, constituyéndose de ese modo la *unión peptídica*. Este enlace posee dos estructuras resonantes, por lo que presenta un carácter de doble enlace parcial (Figura 1.10). Como consecuencia, la libre rotación del enlace C-N se encuentra restringida y los átomos unidos al carbono carbonílico y al nitrógeno, se encuentran en un mismo plano.

⁶⁸ A. J. Cozzone, *Proteins: Fundamental Chemical Properties*. eLS, (2002).

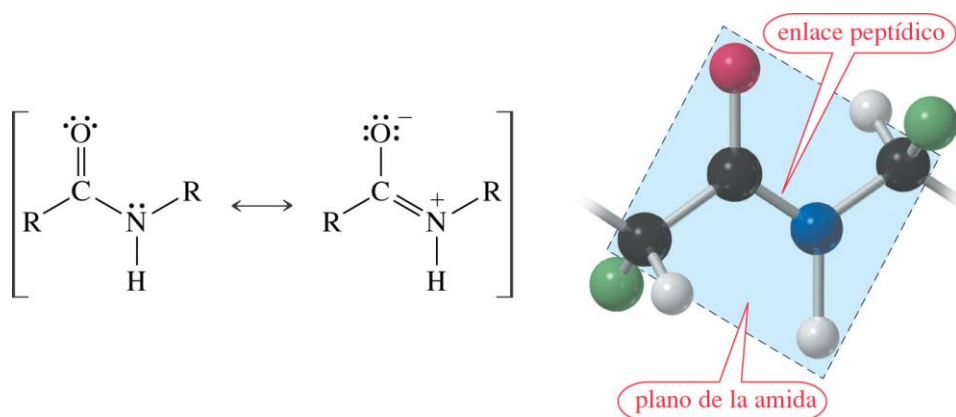


Figura 1.10 Representación del enlace amida, observándose a la derecha las estructuras resonantes de este enlace; y a la izquierda el plano que este forma en la cadena polipeptídica.⁵²

Debido a estas características, el enlace peptídico puede presentar dos tipos de configuraciones, una configuración *trans*, donde los carbonos alfa asociados al enlace peptídico se encuentran opuestos al doble enlace, o *cis*, al encontrarse del mismo lado (Figura 1.11). En las proteínas, la configuración *trans* se encuentra más favorecida debido a que los impedimentos estéricos son menores.



Figura 1.11 Configuración *trans* y *cis* del enlace peptídico.

Por otro lado, el carbono alfa presenta enlaces sencillos, que permite la libre rotación de los enlaces adyacentes. Esto genera que los planos peptídicos adyacentes puedan rotar uno con respecto al otro. Los ángulos definidos entre estos enlaces simples se conocen como **ángulos diedros**. El ángulo definido entre el carbono alfa y el nitrógeno se lo conoce como *phi* (Φ), mientras que el definido entre el carbono alfa y carbonilo se conoce como *psi* (ψ). Además se encuentra un tercer ángulo, llamado *omega* (ω) el cual se define entre el carbono carbonílico y el nitrógeno. Generalmente este ángulo se caracteriza por poseer valores fijos de 0° o 180° , para las configuraciones *cis/trans* respectivamente. Los giros de estos ángulos definen la arquitectura de la cadena polipeptídica o estructura secundaria del péptido (sección 1.6.2.1), ya que no todas las combinaciones angulares son posibles a causa de impedimentos estéricos. Los valores permitidos se grafican en un diagrama bidimensional

conocido como **diagrama de Ramachandran**.⁶⁹

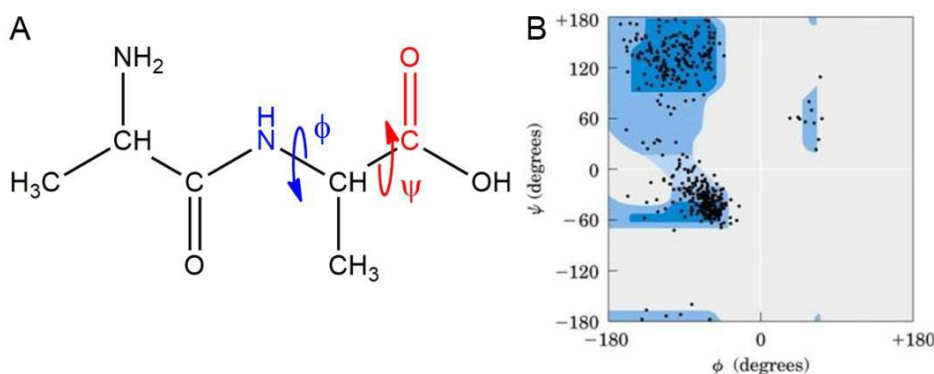


Figura 1.12 Rotación de los enlaces simples en una cadena peptídica. En **A)** se muestran los ángulos diedros alrededor del carbono alfa. En **B)** se presenta un diagrama de Ramachandran, las zonas azul oscuras responden a las combinaciones de ángulos más favorables, mientras que las regiones celestes corresponden a ángulos límites; los puntos representan esquemáticamente valores obtenidos para una proteína ejemplo.

De una unión peptídica, el compuesto resultante recibe el nombre de dipéptido. Por ser el enlace peptídico una unión "cabeza-cola" (grupo amino con grupo carboxilo) un dipéptido conserva siempre un grupo amino libre, que puede reaccionar con el grupo carboxilo de otro aminoácido, y un grupo carboxilo libre, que puede reaccionar con el grupo amino de otro aminoácido. Esta circunstancia permite que mediante enlaces peptídicos se puedan enlazar un número elevado de aminoácidos formando largas cadenas. Los péptidos se clasifican según el número de restos de aminoácidos que los forman. Así los péptidos formados por 2, 3, o 4, aminoácidos se denominan respectivamente dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos. En general cuando el número de aminoácidos implicados es menor o igual a 10 se denomina oligopéptido, cuando es mayor que 10 se trata de un polipéptido. Es también frecuente el uso de la expresión cadena polipeptídica en lugar de polipéptido. La mayoría de las proteínas poseen entre 50 a 2000 residuos, con un peso molecular medio entre 5500 y 220000 Daltons (Da) (un dalton equivale a una unidad de masa atómica). Los péptidos, al poseer un menor número de residuos, constituyen cadenas cortas de construcción, extremadamente versátiles y simples de diseñar. Presentan polaridad debido a los grupos amino y carboxílico terminal, a la que se le debe sumar la posibilidad de ionización de las cadenas laterales de algunos residuos. Esto genera que algunas proteínas o péptidos tengan regiones con distinta polaridad. Esta propiedad depende de su secuencia aminoacídica, y tienen una gran influencia en la organización estructural de péptidos y proteínas.

⁶⁹ J. M. Berg, L. Tymoczko y L. Stryer, *Bioquímica*, 6ta ed., Reverté, (2007).

1.6.2.1 Estructura jerárquica de los péptidos y proteínas

Tanto los péptidos como las proteínas constituyen macromoléculas que debido a su composición química son susceptibles de llevar a cabo interacciones intramoleculares e intermoleculares en función de su entorno, dando lugar a la organización en diferentes niveles de estructuras más complejas.⁷⁰ El correcto plegamiento y la formación de una estructura tridimensional energéticamente más favorable originan la conformación nativa de una proteína, que es fundamental para su actividad. En la Figura 1.13 se muestran los niveles jerárquicos de su organización, constituidos por la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.⁷¹

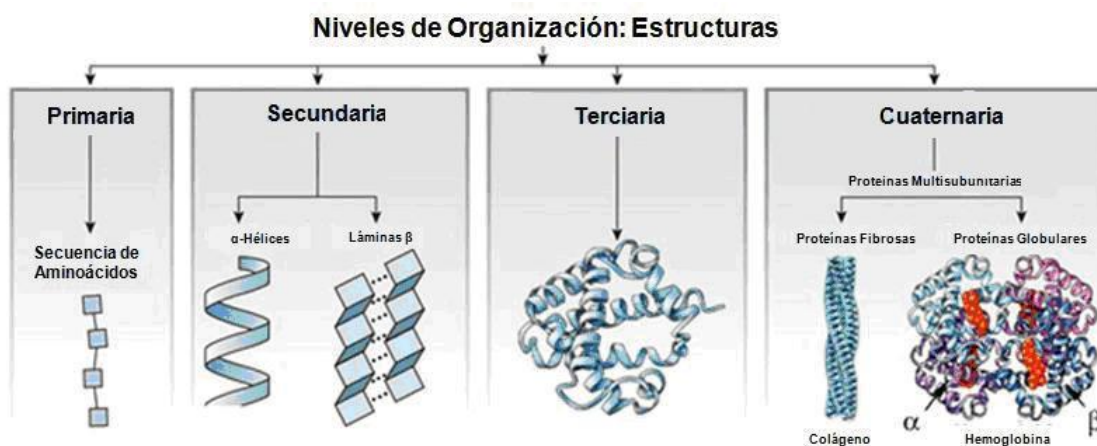


Figura 1.13 Representación jerárquica de las estructuras de las proteínas. (Extraído de Alberts, Biología Molecular de la Célula, 5^{ta} Edición)

La *estructura primaria* describe la secuencia lineal de los aminoácidos que conforman un péptido o proteína, mientras que la *estructura secundaria*, constituye el próximo nivel organizacional y describe la disposición espacial regular asumida por los segmentos de aminoácidos que constituyen la cadena peptídica. Comparativamente, la estructura primaria identifica a un péptido, determina sus características químicas (solubilidad y estabilidad) y contiene la información necesaria para que estas biomoléculas se plieguen o adquieran una estructura tridimensional específica para desarrollar una función. La estructura secundaria define el plegamiento de regiones locales del esqueleto polipeptídico. Los puentes de hidrógenos intracatenarios que se generan entre los grupos amino y carbonilo que participan en los enlaces peptídicos son responsables de la estructura secundaria, que presenta una gran diversidad y está

⁷⁰ D. E. Koshland, 'Kinetics of Peptide Bond Formation1' (1951) 73(9), *Journal of the American Chemical Society*, 4103.

⁷¹ A. Guerler, B. Govindarajoo y Y. Zhang, 'Mapping Monomeric Threading to Protein-Protein Structure Prediction' (2013) 53 (3) *Journal of Chemical Information and Modeling* 717.

determinada en función de los ángulos diedros Φ y ψ característicos que se repiten en toda la estructura. Ejemplos de estructura secundaria son las alfa-hélices y las láminas beta (Figura 1.13).

La *estructura terciaria* describe la conformación tridimensional del péptido o proteína en su totalidad. Esta se encuentra determinada por las interacciones intermoleculares que se producen entre las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos (Figura 1.14), tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro entre pares de residuos cisteína, interacciones no covalentes, de las cuales las interacciones hidrofóbicas entre los residuos apolares, son las que mayormente contribuyen a la estabilidad de la estructura secundaria peptídica.⁵³ El componente hidrofóbico / hidrofílico de las cadenas laterales juega un papel importante en el comportamiento fisicoquímico del péptido y en su posible plegamiento en estructuras tridimensionales. Si una proteína tiene más de una cadena polipeptídica, se puede hacer referencia a una cuarta categoría, la *estructura cuaternaria* que es el modo en que las cadenas polipeptídicas individuales interaccionan unas con otras.

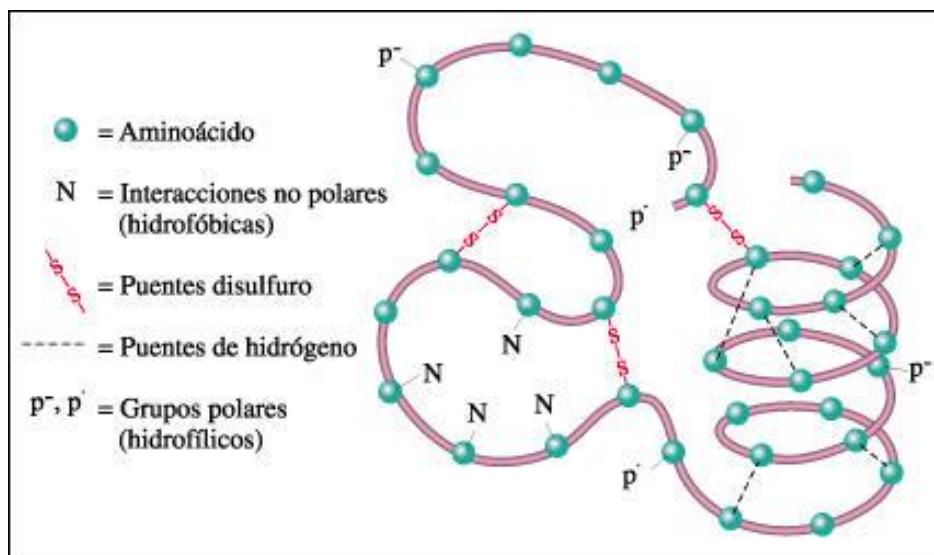


Figura 1.14 Esquema representando algunas de las interacciones intermoleculares responsables de la estructura terciaria de una proteína.

Existen proteínas en las que predomina un solo motivo de estructura secundaria. Estas proteínas se caracterizan por formar fibras, por lo que se las denomina *fibroproteínas* o *proteínas fibrosas*.⁶⁵ Las proteínas fibrosas contienen largas cadenas de polipéptidos que se asocian formando paquetes de fibras. Estas proteínas son insolubles en agua y ejemplos de ellas lo constituyen la queratina y el colágeno. Existen otras proteínas cuya conformación tridimensional no puede especificarse totalmente considerando sólo sus estructuras primaria y secundaria y se conocen como *proteínas globulares*. En ellas, las cadenas polipeptídicas se hallan plegadas de un modo complejo formando arrollamientos globulares compactos que

tienden a adoptar una forma aproximadamente esférica. Se caracterizan por ser solubles en agua y desempeñan un gran número de funciones biológicas, por ejemplo las enzimas son proteínas globulares.

De esta manera una proteína puede adoptar diversas estructuras secundarias, y los diferentes parámetros que influyen en su estabilidad y organización estructural terciaria incluyen el tamaño, forma, carga, enlaces de hidrógeno, carácter hidrofóbico y grado de libertad de las cadenas laterales de sus residuos aminoacídicos. Asimismo, un péptido aislado, proveniente de una proteína puede presentar la misma estructura secundaria que la proteína, con lo cual es posible avanzar en el estudio de estas interacciones supramoleculares a través del análisis de un sistema modelo más sencillo.

Capítulo II

Hipótesis y Objetivos

Los sistemas químicos pueden ser definidos como sistemas auto-ensamblados que son capaces de hacer algo interesante y útil, podemos mencionar al menos dos tipos diferentes de sistemas químicos con relevancia en medicina como las vesículas sintéticas transportadoras de drogas, y los arreglos supramoleculares peptídicos capaces de inhibir la formación de fibras amiloides. Existen dos procesos básicos de ensamblado molecular; el primero es el más estudiado en ciencia básica y se basa en el ensamblado espontáneo de moléculas conocido como proceso de autoorganización molecular. Sin embargo, para que el sistema químico pueda ser llevado a la práctica es necesario recurrir a la segunda forma de ensamblado molecular, llamado autoorganización dirigida. Este método es un proceso con requerimiento de energía que conducen a estructuras metaestables o en “equilibrio permanente”, es decir, de larga duración, que no son necesariamente las estructuras termodinámicamente más favorecidas o estados de equilibrio verdaderos. A pesar de que el estudio de estructuras autoorganizadas es un campo de la química ampliamente utilizado, la idea de que los químicos podamos dirigir el proceso de autoorganización de moléculas pequeñas de manera externa y controlable en agua, para obtener sistemas químicos a demanda, sigue siendo en la actualidad un desafío.

Hipotetizamos que a través del uso de herramientas sintéticas y metodológicas de la química orgánica, podríamos diseñar estrategias sencillas para la obtención de sistemas químicos.

2.1 Objetivos Generales

Como objetivo general para esta tesis, se planteó utilizar moléculas pequeñas con propiedades modulables como bloques de construcción de sistemas químicos capaces de controlar su morfología/función a través de estímulos externos.

2.2 Objetivos Específicos

Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Síntesis y caracterización de azobencenos anfifílicos no iónicos para su utilización como fotointerruptores de membrana y vesículas fotomodulables.
- b) Síntesis de un tripéptido funcional capaz de modular su autoorganización por el mecanismo de oxido-reducción.

Capítulo III

*Diseño, síntesis y caracterización
estructural y térmica de anfifilos no
iónicos basados en azobencenos*

3.1 Breve introducción

Los anfifilos derivados de azobencenos de una sola cola constituyen los bloques más simples de construcción para desarrollar sistemas químicos foto-modulables, combinando a menudo interacciones huésped-anfitrión, o en presencia de lípidos.^{1, 2, 3, 4, 5, 6}

El grupo azobenceno, expuesto a la luz visible, adopta su configuración *E* (*trans*), asemejándose su geometría molecular a la morfología de una varilla. Al ser iluminado con luz UV, la geometría molecular en torno al grupo azobenceno cambia significativamente en la configuración conocida como *Z* (*cis*). La longitud molecular medida como la distancia entre las posiciones 4 y 4' pasa de ser 9.9 Å en el *E* azobenceno, 5.6 Å en el isómero *Z*.⁷ A su vez, el isómero *E* puede ser regenerado de su forma *Z* siguiendo una cinética de isomerización térmica diferencial en función del tipo molecular de azobenceno. Muchas de las moléculas de tipo amino azobencenos presentan cambios muy pequeños en el espectro de absorción y dependientes del tiempo, simulando una incapacidad de isomerizar durante la irradiación. La razón es la rápida reversión térmica que evidencia el isómero *Z* en estos sistemas.⁸ Asimismo, se ha observado que los isómeros *Z* de los derivados que presentan sustituyentes dadores y aceptores de electrones en las posiciones 4- y 4', respectivamente (sistema push/pull), también isomerizan rápidamente a temperatura ambiente, siendo su vida media del orden de los milisegundos, como fuera determinado por experimentos de espectroscopía tipo flash.⁹ En este contexto, de acuerdo a cómo esté construido el azobenceno, es posible optimizar su capacidad de fotoisomerización, convirtiéndolo en un interruptor molecular espacio-temporal de dos puntos, capaz de experimentar un gran cambio geométrico y un momento dipolar en función de las condiciones de iluminación.¹

¹ M. El Garah, F. Palmino y F. Cherioux, 'Reversible Photo-switching of Azobenzene-Based Monolayers Physisorbed on a Mica Surface', (2010) 26 *Langmuir* 943.

² Y. Gong, T. Jiao, Q. Hu, N. Cheng, W. Xu, Y. Bi y L. Yu, 'Rational Design of Multiple-Stimulus-Responsive Materials via Supramolecular Self-Assembly' (2015) 119 *J. Phys. Chem.* 16349.

³ Y. Wang, N. Ma, Z. Wang y X. Zhang, 'Photocontrolled Reversible Supramolecular Assemblies of an Azobenzene-Containing Surfactant with Alpha-Cyclodextrin' (2007) 46 *Angew. Chem. Int. Ed.* 2823..

⁴ U. Kauscher, A. Samanta, B. J. Ravoo, 'Photoresponsive Vesicle Permeability Based on Intramolecular Host-Guest Inclusion', (2014) 12 *Org. Biomol. Chem.* 600.

⁵ F. M. Mansfeld, G. Feng y S. Otto, 'Photo-Induced Molecular-Recognition-Mediated Adhesion of Giant Vesicles' (2009) 7 *Org. Biomol. Chem.* 4289.

⁶ J. H. A. Folgering, J. M. Kuiper, A. H. de Vries, J. B. F. N. Engberts y B. Poolman, 'Lipid-Mediated Light Activation of a Mechanosensitive Channel of Large Conductance' (2004) 20 *Langmuir* 6985.

⁷ B. Feringa, *Photoswitchable Polypeptides. In Molecular Switches*, Ed.; Wiley-VCH, Verlag GmbH, pag 399 (2001).

⁸ J. F. Rabek y G. W. Scott, *Photochemistry and Photophysics*, Vol II pag 127 (1990).

⁹ P.D. Wildes, J. G. Pacifici, G. I Irick y D. G. Whitten, 'Solvent and substituent on the thermal isomerization of substituted azobenzenes. Flash spectroscopic study' (1971) 93 *J. Am. Chem. Soc.* 2004.

La capacidad de fotomodulación de anfifilos compuestos por azobencenos es predecible principalmente en disolventes orgánicos¹⁰, sin embargo, en el estado agregado dependerá fuertemente de la interacción entre las moléculas vecinas. En el caso de los anfifilos basados en azobencenos que poseen una cabeza iónica polar, al ser mezclados con fosfolípidos, el tamaño de las cabezas cargadas del azoderivado ejerce un efecto preponderante en el empaquetamiento del sistema, causando que el cambio de geometría molecular como resultado de la fotoisomerización, no pueda ser transferido al sistema en su conjunto.^{11, 12, 13, 14}

Recientemente, se publicó un trabajo sobre un anfifilo de cabeza iónica constituida por una sal de amonio cuaternario conectada a un grupo azobenceno, capaz de formar vesículas al mezclarse con surfactantes, cuyas propiedades de liberación controlada por la luz podrían ser útiles.¹⁵ Por otro lado, existen muy pocas publicaciones en bibliografía sobre azobencenos anfifílicos (azoanfifilos) cuyas cabezas son polares pero no iónicas. En bibliografía fueron documentados dos ejemplos basados en azoanfifilos no iónicos, los cuales eficientemente fotomodularon la tensión superficial del agua.^{7, 16} El primero, basado en una cabeza simple de hidroxil-dietilenglicol¹⁷ y una cola de 4 átomos de carbono, en su estado *E*, forma espontáneamente vesículas en agua. Las mismas fotoisomerizan, formando en su estado *Z* una fase bicontinua. El segundo ejemplo está basado en una cabeza dendrítica de glicerol, la cual debido a su gran tamaño, forma espontáneamente micelas en agua que se desordenan luego de la fotoirradiación con luz ultravioleta.¹⁸ Ambos sistemas, aunque se mostraron eficientes en el

¹⁰ T. Asano, T. Okada, 'Thermal Z-E Isomerization of Azobenzenes. The Pressure, Solvent, and Substituent Effects' (1984) 49 *J. Org. Chem.* 4387.

¹¹ D. G. Whitten, L. Chen, H. C. Geiger, J. Perlstein y X. Song, 'Self-Assembly of Aromatic-Functionalized Amphiphiles: The Role and Consequences of Aromatic-Aromatic Noncovalent Interactions in Building Supramolecular Aggregates and Novel Assemblies' (1998) 102 *J. Phys. Chem. B* 10098.

¹² S. Wu, L. Niu, J. Shen, Q. Zhang y C. Bubeck, 'Aggregation-Induced Reversible Thermochromism of Novel Azo Chromophore-Functionalized Polydiacetylene Cylindrical Micelles' (2009) 42 *Macromolecules* 362.

¹³ L. Yang, N. Takisawa, T. Hayashita, K. Shirahama, 'Colloid Chemical Characterization of the Photosurfactant 4-Ethylazobenzene 4'-(Oxyethyl) trimethylammonium Bromide' (1995) 99 *J. Phys. Chem.* 8799.

¹⁴ J. Zou, F. Tao y M. Jiang, 'Optical Switching of Self-Assembly and Disassembly of Noncovalently Connected Amphiphiles' (2007) 23 *Langmuir* 12791..

¹⁵ Z. K. Cui, T. Phoeung, P. A. Rousseau, G. Rydzek, Q. Zhang, C. G. Bazuin, M. Lafleur, 'Nonphospholipid Fluid Liposomes with Switchable Photocontrolled Release' (2014) 30 *Langmuir* 10818.

¹⁶ C. Kordel, C. S. Popeney y R. Haag, 'Photoresponsive Amphiphiles Based on Azobenzene-Dendritic Glycerol Conjugates Show Switchable Transport Behavior' (2011) 47 *Chem. Commun.* 6584.

¹⁷ T. Shang, K. A. Smith y T. A. Hatton, 'Self-Assembly of a Nonionic Photoresponsive Surfactant Under Varying Irradiation Conditions: A Small-Angle Neutron Scattering and Cryo-TEM Study' (2006) 22 *Langmuir* 1436.

¹⁸ B. Trappmann, K. Ludwig, M. R. Radowski, A. Shukla, A. Mohr, H. Rehage, C. Bottcher, R. Haag, 'A New Family of Nonionic Dendritic Amphiphiles Displaying Unexpected Packing Parameters in Micellar Assemblies' (2010) 132 *J. Am. Chem. Soc.* 11119.

fotocontrol, son sintéticamente complejos, en el caso del dendron y poco versátil, en el caso del que presenta la cola de 4 carbonos, por estar directamente unida al grupo azobenceno.

3.2 Diseño e hipótesis

A partir de estos antecedentes es que surge la idea de obtener nuevos azoanfifilos sencillos no iónicos a través de química modular. Los anfifilos diseñados constan de tres regiones bien definidas: cabeza polar no iónica, segmento rígido y cola flexible. La introducción de átomos de oxígeno como conectores entre el segmento rígido azobenceno y la cabeza y la cola, respectivamente (sustitución de tipo donador-donador), es sintéticamente simple y permite una fotoisomerización eficiente con reversión térmica lenta. Basándonos en publicaciones anteriores^{16, 17, 18, 19} planteamos la hipótesis de que la cabeza de hidroxil-trietilenglicol aumentaría el área efectiva de la sección transversal, favoreciendo así el movimiento molecular de las colas en el agregado, promovido por la iluminación con luz de diferentes longitudes de onda. Finalmente, la incorporación de una cola hidrofóbica de 12 carbonos favorecería la formación de bicapas, así como induciría la potencial interacción con lípidos naturales en membranas biológicas.²⁰ (Figura 3.1)

Para evaluar la importancia de la geometría de estas moléculas, no solo estudiamos los azobencenos sustituidos en 4 y 4' sino también aquellos menos estudiados 3, 4'.

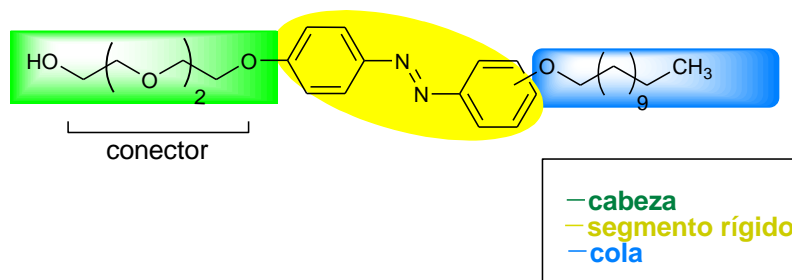


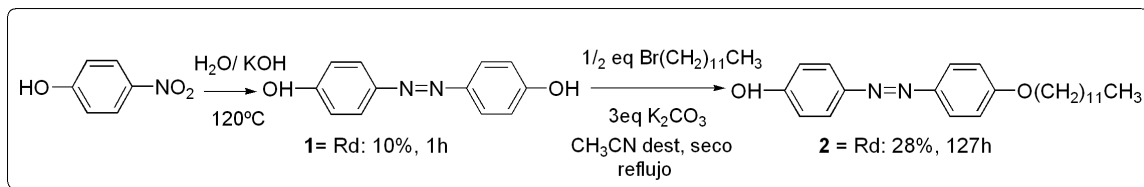
Figura 3.1 Esquema del compuesto azoanfifílico evaluado.

3.3. Síntesis de anfifilos basados en azobenceno

Utilizando como reactivo de partida p-nitrofenol comercial, inicialmente se llevó a cabo una síntesis económica para la obtención del derivado **2** (Esquema 3.1).

¹⁹ T. Shang, K. A. Smith y T. A. Hatton, 'Photoresponsive Surfactants Exhibiting Unusually Large, Reversible Surface Tension Changes under Varying Illumination Conditions' (2003) 19 *Langmuir* 10764.

²⁰ J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, 'Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles' (1977) 470 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 185.



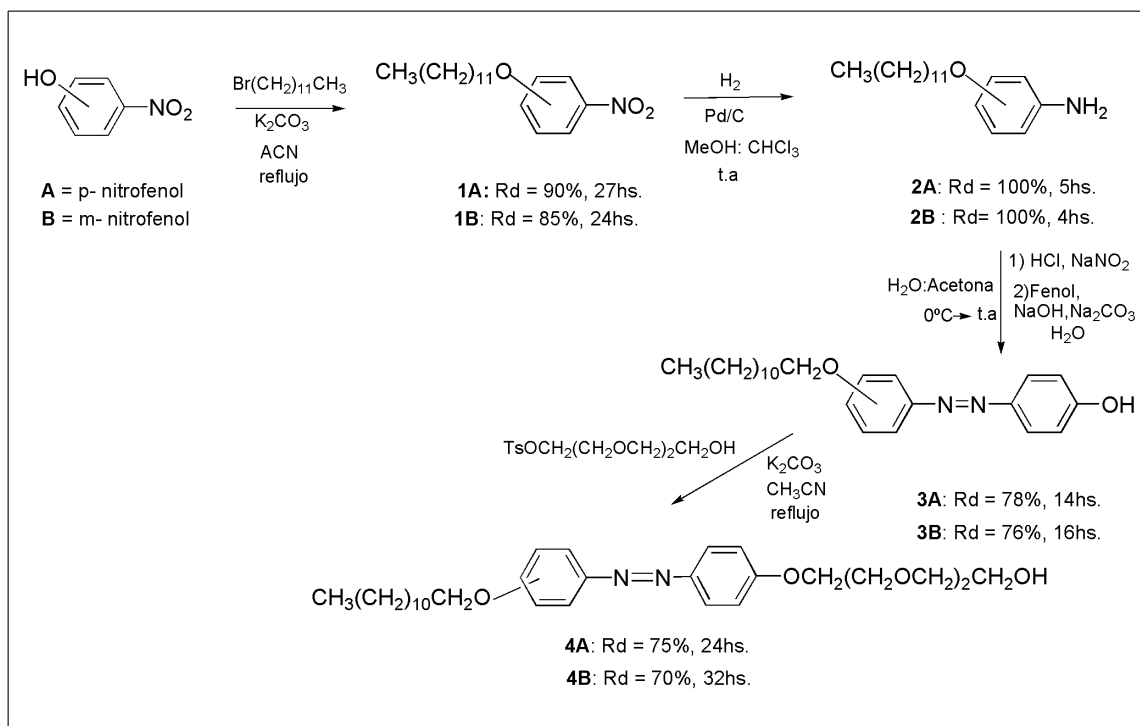
Esquema 3.1 Síntesis del derivado **2**.

Los bajos rendimientos observados se debieron a que la reacción de obtención de **1** fue incompleta y el producto fue difícil de purificar.

Debido principalmente a que la formación de los agregados tiene una importante dependencia de la estructura molecular de los anfifilos, es que nos interesó plantear una ruta sintética versátil que nos permita a través de pasos sencillos introducir pequeñas o bien grandes modificaciones en la cabeza polar y en la cola hidrofóbica, con el objeto de mejorar y/o reformular el diseño molecular en función de los resultados de la evaluación supramolecular final. Tras una optimización inicial, se desarrolló una ruta sintética versátil que nos permitiría en un futuro lograr diversidad molecular partiendo de los mismos precursores.

Optimización de la ruta sintética: En principio para la síntesis de los ligandos **1A** y **1B** (Esquema 3.2) a partir de la reacción entre nitrofenol comercial y bromuro de dodecilo, se utilizó acetona como solvente (15-30hs de reflujo con 35% de rendimiento), que luego fue reemplazado por acetonitrilo (ACN) previamente destilado y secado con el fin de disminuir los tiempos de reacción prolongados. No se evaluó la posibilidad de cambiar el solvente a otro de mayor polaridad, como puede ser la dimetilformamida (DMF), ya que debe considerarse que la etapa de purificación del compuesto presentaría mayores complicaciones debido a sus elevados puntos de ebullición. El avance de la reacción fue controlado por TLC corridas en una cámara $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1). Los productos fueron purificados por cromatografía en columna. Se utilizaron como mezclas de eluyentes hexano, hexano: éter etílico (90:10) y hexano: éter etílico (80:20). El seguimiento de la cromatografía se llevó a cabo por cromatografía de capa delgada (TLC) en una cámara de hexano. En ambas síntesis se observaron notables cambios en el color del contenido del balón durante el transcurso de la reacción, lo que puede utilizarse como un indicador de su correcta evolución. Para el caso del 3-dodeciloxi-nitrobenceno (**1B**), la coloración inicial de la solución al comenzar la reacción pasó de anaranjada brillante a roja, para luego virar a un color anaranjado pardo. El crudo de reacción presentó una leve tonalidad amarillenta, difiriendo de la apariencia del producto purificado, que se caracteriza por tener un color blanco brillante. En la reacción para obtener el 4-dodeciloxi-nitrobenceno (**1A**), en principio se observó

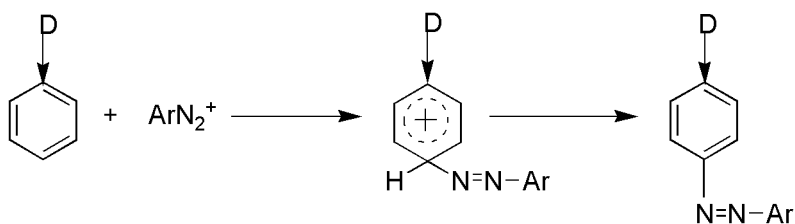
un color amarillo intenso y luego la solución se tornó incolora. También el producto purificado es un sólido blanco cristalino.



Esquema 3.2 Síntesis optimizada de los azoderivados.

La reducción de los nitrobenzenos alquilados se llevó a cabo a temperatura ambiente con presión positiva de gas hidrógeno. El seguimiento del avance de la reacción se llevó a cabo por TLC en cámara de hexano: éter etílico (1:1). Fueron obtenidos rendimientos cuantitativos de las aminas **2A** y **2B**, las cuales difirieron notablemente en aspecto cristalino de los compuestos de partida: la presencia de un sólido rosado brillante al final de la reacción comprueba el éxito de la reducción. Se mantuvieron en frío y bajo atmósfera inerte, ó fueron inmediatamente sometidas a la reacción de diazotación siguiente sin mayor purificación.

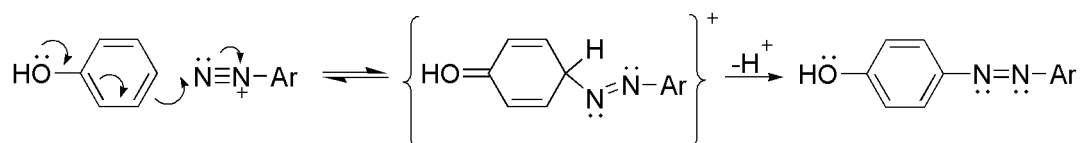
La reacción de diazotación, activada mediante grupos alcoxi, donores de electrones, es una reacción de acoplamiento de tipo *sustitución electrofílica aromática (SEA)*, donde el ión diazonio constituye el *reactivo electrofílico* (Esquema 3.3).



Esquema 3.3 Reacción de diazotación con un nucleófilo activado.

La sal de diazonio de dodeciloxi-benceno es generada a través del ácido nitroso formado *in situ* por la acción del HCl sobre la amina aromática. Seguidamente, por reacción de copulación con el fenol en medio básico, se forma el azobenceno correspondiente.

Las estructuras resonantes que se muestran en el Esquema 3.4 se generan debido a la presencia de un sustituyente donador como es el grupo OH.

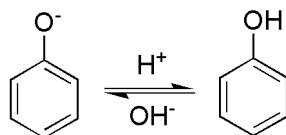


Esquema 3.4 Estructuras resonantes en el nucleófilo activado con un grupo OH.

Las condiciones experimentales de la reacción de diazotación debieron ponerse a punto ajustando el pH del medio de reacción para que la reacción de SEA que origina los azoderivados **3A** y **3B** procediera con mayor velocidad frente a otras reacciones secundarias. Es de máxima importancia que el medio se ajuste al grado correcto de acidez o alcalinidad, lo que se logra agregando las cantidades adecuadas de hidróxido o sales como acetato o carbonato de sodio.

El ión diazonio, ArN_2^+ , estando en presencia del ión hidróxido se encuentra en equilibrio con un compuesto no ionizado y con sales que derivan de él que no tienen capacidad de llevar a cabo el acoplamiento. Por consiguiente, en lo referente al reactivo electrofílico, la copulación se favorece con en medio *ácido*.

Desde el punto de vista de los compuestos con grupos activantes, también es necesario interpretar los efectos del pH sobre la factibilidad de la reacción de acoplamiento. El fenol, que es apreciablemente ácido; en solución acuosa se encuentra en equilibrio con el ión fenóxido correspondiente (Esquema 3.5).



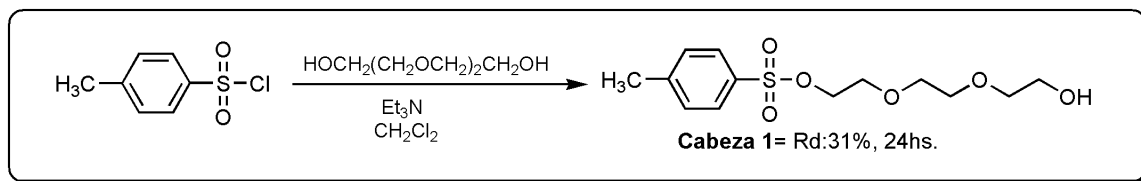
Esquema 3.5 Equilibrio ácido-base del fenol.

La carga negativa del fenóxido hace que el O^- sea mucho más activante que el OH , por lo que el fenóxido es mucho más reactivo que el fenol para la sustitución electrofílica aromática. Cuanto más ácido sea el medio, menor proporción del fenóxido y, por ende, menor velocidad tendrá la reacción de copulación. En consecuencia, *las condiciones para el acoplamiento más rápido son resultado de un compromiso*. La solución no debe ser demasiado alcalina, para evitar una concentración excesivamente baja de ión diazonio; no debe ser muy ácida, pues se reduce considerablemente la concentración de ión fenóxido. Como consecuencia, las aminas reaccionan más rápidamente en soluciones ligeramente ácidas, mientras que los fenoles lo hacen en un medio levemente básico. La técnica fue optimizada teniendo en cuenta estos datos sobre el tipo de mecanismo propuesto y los posibles efectos de las condiciones del medio. La amina sin purificar obtenida a partir de la reducción fue disuelta con la mezcla de solventes H_2O : Acetona (1:1) y, posteriormente se mantuvo en solución levemente ácida a través del agregado de HCl 37%. El NaNO_2 produce la formación de la sal de diazonio. Por tal motivo, fue muy importante que se encontrara debidamente purificado antes de llevar a cabo la reacción: la cantidad efectiva de NaNO_2 agregada debía corresponder con la calculada para que se formara la mayor proporción de sal de diazonio posible, y así poder obtener óptimos rendimientos. La purificación se realizó dos días antes de ser utilizado por sucesivas recristalizaciones en agua MilliQ.²¹ Una vez seco tras haber sido colocado en un desecador con vacío, se realizaron puntos de fusión confirmatorios. Se procedió inicialmente bajo atmósfera inerte y con las soluciones y el material debidamente enfriados, a obtener la solución de la sal de diazonio, respetando las condiciones de reacción y los cuidados requeridos para la manipulación, para posteriormente sintetizar el correspondiente compuesto azobenceno utilizando fenol en medio básico. El esquema de síntesis completo realizado se detalla en el Capítulo 7, sección 7.1.2.5.

La purificación de los azoderivados se realizó a través de sucesivos lavados con agua MilliQ²¹ hasta comprobar por TLC la ausencia de fenol. Se obtuvo un rendimiento práctico del **76-78%** para **3A** y **3B**.

²¹ Perring, *Purification of laboratory chemicals*, 6ª Edición, Elsevier Inc. 495, (2009).

Para la reacción final de incorporación de la cabeza polar no iónica a los azoderivados, fue previamente sintetizado y purificado la cabeza **1** utilizando cloruro de p-toluensulfonilo (Esquema 3.6), el cual fue adicionado a **3A** y **3B** en medio básico (K_2CO_3) utilizando ACN a reflujo para promover la sustitución nucleofílica.



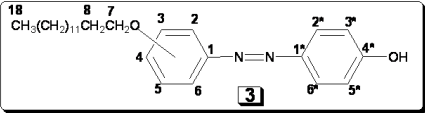
Esquema 3.6 Síntesis de la cabeza 1.

A la par fue llevada a cabo la síntesis de anfifilos con el mismo diseño estructural presentando un número impar de carbonos en la cola hidrocarbonada, la cual presentó dificultades en la purificación de los análogos finales, obtenidos con rendimientos menores al 20% y cuya purificación no fue exitosa. Se intentaron cambios en las condiciones de reacción, sin éxito. En literatura es poco frecuente la síntesis de anfifilos con números de carbonos impar en la cola hidrofóbica. Por lo que presentamos solo la caracterización de los derivados con 12 átomos de carbono en la cola hidrocarbonada.

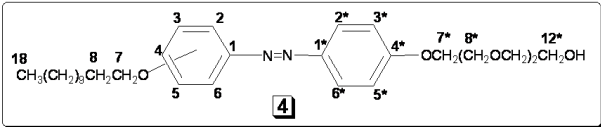
Todos los nuevos azoanfifilos fueron purificados por columna cromatográfica de alúmina neutra y tanto el control de las cromatografías como el avance de las reacciones fueron realizados por Cromatografía en Capa Fina (TLC). Los compuestos sintetizados fueron caracterizados estructuralmente a través de experimentos de RMN (300MHz), determinación del punto de fusión y espectroscopia de masas MALDI-TOF y ESI, estos últimos realizados en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

3.4 Caracterización estructural por Espectroscopía RMN

¹³CRMN_a



Compuesto N°	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₁₈	C _{1'}	C _{2'}	C _{3'}	C _{4'}	a	EM-FAB (M+1H ⁺)
3A	146,91	124,30	114,72	161,27	115,76	124,33	68,40	31,91	14,07	147,23	124,51	115,81	nd	(b)	382,10
3B	148,00	110,50	158,22	123,30	127,94	114,21	75,30	30,30	12,35	146,91	123,35	115,93	114,82	(c)	nd



Compuesto N°	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₁₈	C _{1'}	C _{2'}	C _{3'}	C _{4'}	C _{7'}	C _{8'}	C _{12'}	a	EM-FAB (M+1H ⁺)
4A	146,97	124,32	114,85	161,28	114,71	124,26	72,50	31,91	14,10	147,32	124,3	114,8	160,65	70,90	69,15	70,59	(d)	515,40
4B	153,00	105,40	158,90	116,61	128,60	115,4	76,40	30,90	13,10	153,10	123,70	115,50	160,20	71,40	68,72	70,30	(e)	515,40

a) En CDCl₃, desplazamiento químico δ en ppm con respecto a TMS; nd: no determinada. Otras señales: (b) 22,67; 26,03; 29,22; 29,33; 29,38; 29,56; 29,58; 29,62; 29,65 (CH₂); (c) 21,00; 24,40; 27,70- 28,00; (CH₂); (d) 22,68; 26,00; 29,22; 29,33; 29,40; 29,50; 29,60; 29,63; 29,65; 61,80; 69,71; 70,45 (CH₂); (e) 21,70; 25,10; 28,30; 28,60; 60,80; 67,20; 68,71; 69,45 (CH₂).

¹HRMN

Compuesto N°	Desplazamiento químico (δ , en ppm)
3A	0,88 (t, 3H $J^2 = 6,9$ Hz, CH ₃); 1,27-1,47 (m, 18H, CH ₂); 1,81 (m, 2H, CH ₂); 4,03 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, OCH ₂); 4,63 (s, 1H, OH); 6,93 (d, 2H, $J^2 = 9$ Hz, Ar ₃ '-H); 6,98 (d, 2H, $J^2 = 9$ Hz, Ar ₃ -H); 7,81 (d, 2H, $J^2 = 9$ Hz -Ar ₂ '-H); 7,85 (d, 2H, $J^2 = 9$ Hz, Ar ₂ -H).
3B	0,81 (t, 3H, $J^2 = 6,9$ Hz, CH ₃); 1,10 – 1,40 (m, 18H, CH ₂); 1,73 (m, 2H, CH ₂); 3,96 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, OCH ₂); 4,50 (s, 1H, OH); 6,79 – 7,00 (m, 3H, Ar-H); 7,14 – 7,22 (m, 3H Ar'-H); 7,73 – 7,88 (m, 2H, Ar-H).
4A	0,88 (t, 3H $J^2 = 6,9$ Hz, CH ₃); 1,27-1,47 (m, 18H, CH ₂); 1,81 (m, 2H, CH ₂); 2,08 (s, 1H-OH); 3,61-3,74 (m, 8H, CH ₂); 3,90 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, OCH ₂); 4,03 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, CH ₂); 4,22 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, CH ₂); 6,99 (d, 2H, $J^2 = 8,93$ Hz, Ar ₃ -H); 7,00 (d, 2H, $J^2 = 8,96$ Hz, Ar ₃ '-H); 7,87 (d, 4H, $J^2 = 8,90$ Hz -Ar ₂ -H, Ar ₂ '-H).
4B	0,81 (t, 3H $J^2 = 6,9$ Hz, CH ₃); 1,05 – 1,45 (m, 16H, CH ₂); 1,63 – 1,67 (m, 4H, CH ₂); 3,84 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, CH ₂); 3,90 (t, 2H, $J^2 = 6,0$ Hz, OCH ₂); 7,00 (d, 1H, $J^2 = 8,10$ Hz, Ar ₄ -H); 7,03 (d, 2H, $J^2 = 8,89$ Hz, Ar ₃ '-H); 7,37 (d, 1H, $J^2 = 8,31$ Hz Ar ₅ -H); 7,39 (s, 1H, Ar ₂ -H); 7,49 (d, 1H, $J^2 = 7,79$ Hz, Ar ₆ -H); 7,90 (d, 2H, $J^2 = 8,90$ Hz, Ar ₂ '-H)

3.5 Capacidad de fotomodulación de los anfífilos

3.5.1. Fotoisomerización E-Z por Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La capacidad de fotomodulación de los compuestos **3A**, **3B**, **4A** y **4B** fue evaluada a través de experimentos de espectroscopía UV-Vis utilizando como solvente CHCl₃. Todos los compuestos fueron disueltos en CHCl₃ y expuestos a irradiación con luz UV a un $\lambda = 360$ nm durante diferentes tiempos, considerando como máximo 100 minutos.

En el caso de los compuestos, **3A** (color amarillo claro) y **3B** (color amarillo amarronado), ambos presentaron en solución clorofórmica la banda de absorción correspondiente a la transición π - π^* del grupo azobenceno, observándose los $\lambda_{\text{máx.}}$ de 357 nm y 342 nm,

respectivamente (Figura 3.2A y B). Es de destacar que estos dos compuestos mostraron una reversión térmica muy rápida frente a las mismas condiciones de exposición de luz UV que los anteriores (360 nm, 8 watts, 1 min.), incluso a mayor potencia y tiempos de irradiación, por lo que no fue posible medir la fotoisomerización por las técnicas de espectroscopía UV-Vis convencionales. Tampoco fue evidenciable para ellos un cambio en la coloración luego de los diferentes tiempos de exposición a la luz UV.

El compuesto **4A** en CHCl₃ es una solución de color amarillo que inicialmente posee un equilibrio fotoestacionario (PSS) en el que prevalece la isoforma *E*, de mayor estabilidad, sobre la *Z*, en un porcentaje *E*: *Z* (95:5) determinada por H-RMN (sección 3.5.3). Después de la iluminación con luz UV (360 nm, 8 watts, 1 min.) se alcanza el segundo PSS con la variación del porcentaje de *E*: *Z* (10:90), cambiando significativamente el color de la solución a anaranjada. La relación de ambos equilibrios fotoestacionario de los isómeros *E* y *Z*, así como la fotoconversión fueron correlacionadas con experimentos de espectroscopía ¹H-RMN (ver sección 3.5.3). En el espectro UV-Vis de **4A** (*E*) se observó la transición π - π^* , característica de compuestos azobencenos, a través de la presencia de una banda de absorción con un $\lambda_{\text{máx}}$ 358 nm (estado S₂ π - π^*). Luego de la fotoisomerización *E*/*Z*, la banda de absorción de **4A** (*E*) a 358 nm decrece marcadamente detectándose un desplazamiento del máximo de absorción hacia la zona del azul del espectro ultravioleta, centrado en $\lambda_{\text{máx}}$ de 311 nm, correspondiente al mismo estado de transición. También aparece una segunda banda a $\lambda_{\text{máx}}$ 448 nm de **4A** (*Z*), correspondiente a la transición S₁ n- π^* (Figura 3.2C). Cuando la irradiación finalizó, el espectro de absorción de **4A** (*E*) fue lentamente recuperado debido a la reversión térmica²² (18 horas en la oscuridad) (ver sección 3.5.3).

El compuesto **4B** forma una disolución de color anaranjado brillante en CHCl₃, que se vuelve bermellón con la exposición a la luz ultravioleta. Fue evidenciada la presencia de un 2-8% de compuesto *Z* en el equilibrio fotoestacionario inicial de **4B**, observándose luego de la irradiación (360 nm, 8 watts, 1 min.) la modificación significativa en la relación de isómeros, a *E*/*Z* (25:75). Tanto la relación del equilibrio fotoestacionario inicial, como la final tras la fotoconversión, fueron correlacionadas con experimentos de espectroscopía ¹H-RMN (ver sección 3.5.3). En el espectro UV-Vis de **4B** se observa la transición π - π^* correspondiente con la aparición de una banda de absorción de $\lambda_{\text{máx}}$ 348nm (Figura 3.2D). Luego de la fotoisomerización *E*/*Z*, la transición π - π^* se manifiesta con un desplazamiento de la banda a longitudes de onda menores, 312 nm, con un decrecimiento de la banda de 348 nm y la aparición de una nueva banda correspondiente

²² J. H. Yoon y S. Yoon, 'Observation of Isomerization of an Azobenzene Derivative in Gold Nanoparticle Aggregates Using SERS' (2009) 30 *Bull. Korean Chem. Soc.* 2877.

a la transición S_1 $n-\pi^*$ a 433 nm. La reversión térmica $Z-E$ fue lo suficientemente lenta para permitir la evaluación de ambos PSS por separado (ver sección 3.5.3).

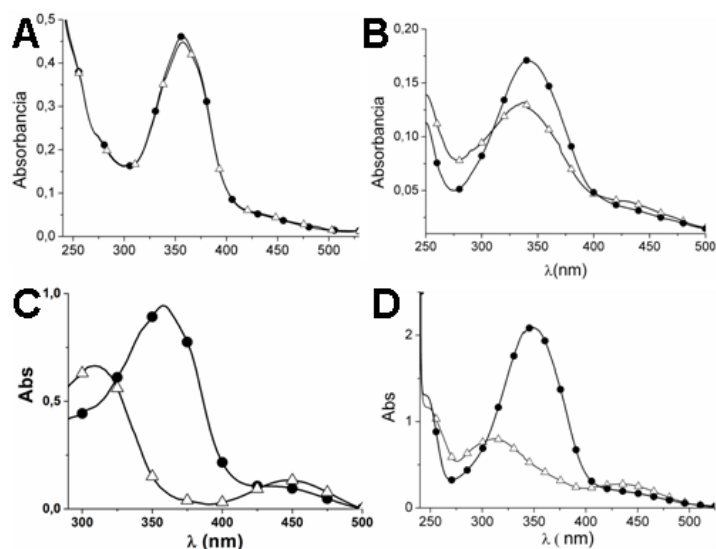


Figura 3.2 Espectro de absorción UV-Visible en CHCl_3 **A**) **3A** (E) (●) y (Z) (Δ), 15 μM ; **B**) **3B** (E) (●) y (Z) (Δ), 7,7 μM ; **C**) **4A** (E) (●) y (Z) (Δ), 7,5 μM ; **D**) **4B** (E) (●) y (Z) (Δ), 10 μM .

En la Tabla 3.1 se muestra el efecto hipsocrómico como consecuencia de la fotoconversión, en el cual las bandas de absorción correspondientes a la transición $\pi-\pi^*$ se desplazan hacia menores longitudes de onda (zona azul del espectro visible). En la misma se evidencia la importancia del sustituyente unido directamente al grupo azobenceno para que la fotoisomerización pueda ser medida en nuestro espectrofotómetro. El efecto de la sustitución 4:3' respecto a la 4:4' también produce diferencias en la posición del $\lambda_{\text{máx}}$ de los análogos.

COMPUESTO	Isómero <i>trans</i> (E) $\lambda_{\text{máx}}$. en nm ($\pi-\pi^*$)	Isómero <i>cis</i> (Z) $\lambda_{\text{máx}}$. en nm ($\pi-\pi^*$) $\lambda_{\text{máx}}$. en nm ($n-\pi^*$)	Porcentaje de fotoconversión (%)
3A	357	357 —	3
3B	342	338 430	25
4A	358	311 448	89
4B	348	312 433	75

Tabla 3.1 Comparación de los $\lambda_{\text{máx}}$ de las transiciones $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ antes y después de la fotoisomerización indicando el porcentaje de fotoconversión en cada caso.

3.5.2 Fotoreversión Z-E por Espectroscopía UV-Vis

En el caso de los compuestos **4A** y **4B**, en los cuales la fotoconversión procedió con máximos rendimientos, se estudio la capacidad de fotoreversión Z-E. Inicialmente, ambos compuestos fueron evaluados en condiciones de reposo bajo oscuridad y a temperatura ambiente (25°C) con el objeto de analizar la capacidad de reversión y el tiempo de relajación del sistema.

En la gráfica del espectro UV-Vis para **4A** se muestra que en la oscuridad la reversión térmica ocurre luego de 18 horas, obteniéndose la relación Z:E (5:95) (Figura 3.3A).

Para el sistema **4B** la reversión no fue total, observándose la estabilización del equilibrio fotoestacionario en un porcentaje Z: E (46:54), diferente del inicial, luego de 15 horas en condiciones de oscuridad (Figura 3.3B).

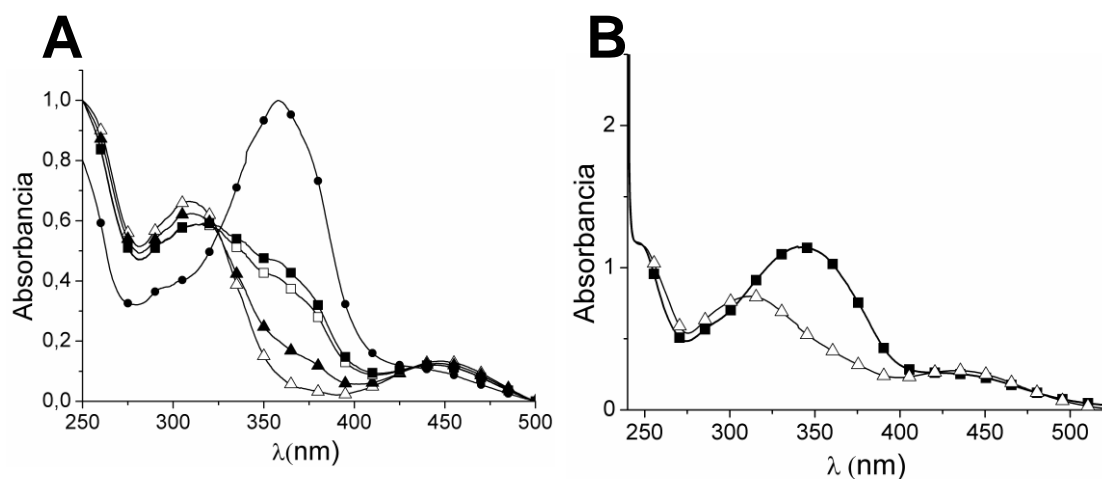


Figura 3.3 Espectro de absorción UV-Visible de la fotoconversión (Z-E) en cloroformo y oscuridad a diferentes tiempos **A)** **4A** (7,5 μM): 0 horas (Δ); 1 hora (\blacktriangle); 4 horas (\square); 6 horas (\blacksquare); 18 horas (\bullet). **B)** **4B** (10 μM): 0 horas (Δ); 15 horas (\blacksquare).

Considerando los resultados anteriores, para el compuesto **4A** se evaluó la aceleración de la isomerización Z-E por iluminación con luz blanca de 60 watts ($\lambda > 445\text{nm}$, 3 h). La relajación del sistema también fue total, observándose la recuperación del equilibrio Z: E (5:95) a las 3 horas (Figura 3.4).

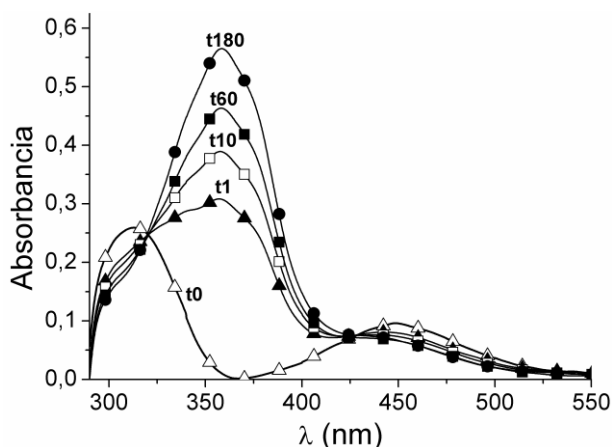


Figura 3.4 Espectro de absorción UV-Visible de la fotoconversión de 4A (Z) (Δ) a 4A (E) (\bullet) promovida por luz blanca a diferentes tiempos (7,5 μ M, cloroformo). La unidad de tiempo es minutos.

3.5.3 Fotoisomerización y reversión por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$

La capacidad de fotomodulación de los azoanfífilos **4A** y **4B** y los porcentajes de fotoisomerización también fueron evaluados a través de experimentos de $^1\text{H-RMN}$ (600MHz). El procedimiento experimental consistió en disolverlos en etanol y exponerlos a irradiación con luz UV a un $\lambda = 360$ nm (8 watts) durante 1 minuto, en una primera etapa. Los espectros de los compuestos irradiados fueron tomados en condiciones de oscuridad para minimizar la fotoreversión durante las medidas. Posteriormente se monitoreó en oscuridad a temperatura ambiente por un máximo de 20 horas. En primer lugar se estudió la fotoisomerización E/Z y durante la segunda etapa el tiempo de relajación de la fotoisomerización Z/E y el porcentaje de reversión del sistema.

La Figura 3.5 muestra la sección aromática del espectro $^1\text{HRMN}$ de **4A** antes y después de la fotoisomerización, y durante la relajación (2 horas en oscuridad). Fue evidenciada la presencia de un 5% del isómero Z en la región de campos altos (Figura 3.5A, marcado con una flecha) previo a la irradiación con luz a 360 nm. Luego de la misma se produjo la modificación del equilibrio fotoestacionario a $E: Z$ (10:90) (Figura 3.5B). El isómero Z se obtiene en un 90% detectándose el nuevo conjunto de señales $^1\text{H NMR}$ con la misma multiplicidad que el isómero E pero desplazadas hacia campos mayores. Los picos asignados a los protones más cerca de los centros de isomerización (a y b) se desplazaron significativamente a campos más altos que las señales correspondientes a los protones aromáticos restantes, más alejados del enlace $\text{N}=\text{N}$, (c y d). Estos también sufrieron un efecto de apantallamiento, aunque no tan marcado, siendo menos desprotegidos a causa de la isomerización. Estos cambios espectrales son consistentes

con observaciones previas para otros tipos de derivados azobencenos,²³ y se explican teniendo en cuenta que el isómero *E* es plano, mientras que el *Z* no lo es: los anillos aromáticos están retorcidos entre sí para evitar contactos estrechos entre los átomos de hidrógeno del anillo. En este nuevo microambiente, el apilamiento de anillos aromáticos (π -stacking) u otras interacciones físicas conducen a cambios en las señales de RMN.²⁴ Luego de 4 horas en la oscuridad, se obtiene una mezcla *E/Z* 60: 40. (Figura 3.5 C)

Finalmente, a las 18 horas en oscuridad se observó la recuperación del porcentaje total del isómero *trans* (95%), presente en el pss inicial, resultado en concordancia con los espectros UV-Vis en función del tiempo.

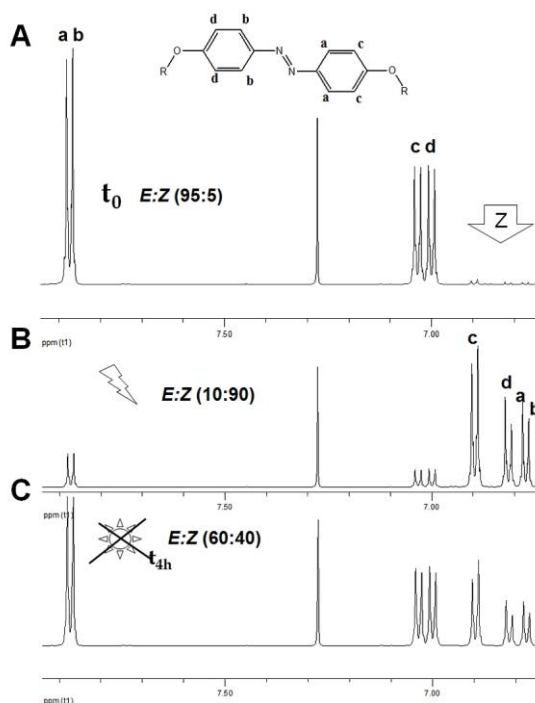


Figura 3.5 Zona aromática del espectro RMN de 4A. **A)** Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignado a 4A (*E*) con una flecha se identifican las señales del isómero *Z*. **B)** Después irradiar con luz UV (360 nm, 8watts, 1 min.), asignado a 4A (*Z*). **C)** Equilibrio fotoestacionario a las 4 horas en oscuridad luego de la irradiación.

La Figura 3.6 muestra los resultados del espectro RMN para 4B en las condiciones de trabajo ya descritas. El porcentaje del isómero *Z* previo a la irradiación fue de un 3% (Figura 3.6A, identificado con una flecha). Luego de la misma se obtuvo un nuevo estado fotoestacionario *E: Z*

²³ J. H. Yoon y S. Yoon, 'Photoisomerization of azobenzene derivatives confined in gold nanoparticle aggregates' (2011) 13 *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12900.

²⁴ S. Peris, B. Tylkowski, J. C. Ronda, R. Garcia-Valls, J. A. Reina y M. Giamberini, 'Synthesis, Characterization, and Photoresponsive Behavior of New Azobenzene-Containing Polyethers' (2009) 47 *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 5426.

(20:80), mostrando el efecto de apantallamiento de las señales *Z* ya observado para 4A (Figura 3.6B). La fotoisomerización *Z*→*E* evaluada en oscuridad mostró un PSS *E*: *Z* (54:46) estabilizado a las 15 horas, evidenciando una marcada diferencia cuantitativa en la recuperación del estado fotoestacionario inicial respecto de 4A. En las Figuras 3.5C y 3.6C se observa comparativamente el equilibrio fotoestacionario a las 4 horas en oscuridad para el compuesto 4A y 4B, *E*: *Z* (60:40) y (45:56), respectivamente.

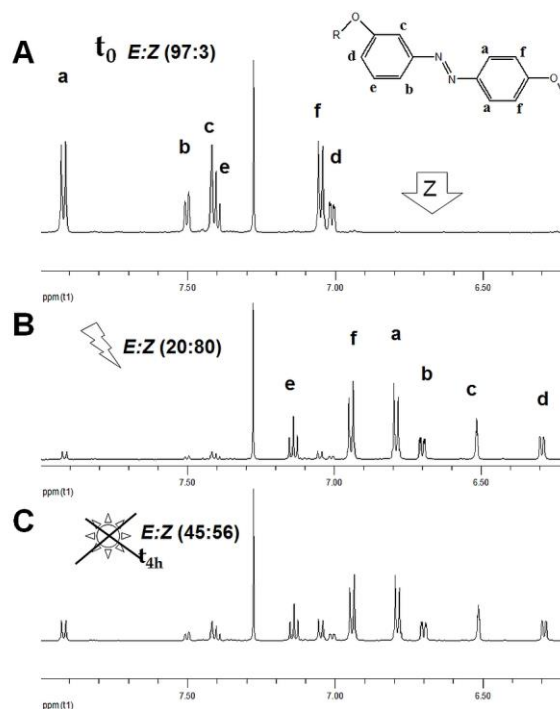


Figura 3.6 Zona aromática del espectro RMN de 4B. **A)** Antes de irradiar con luz UV (t_0), asignado a **4B** (*E*) con una flecha se identifican las señales del isómero *Z*. **B)** Después irradiar con luz UV (360 nm, 8 watts, 1 min.), asignado a **4B** (*Z*). **C)** A las 4 horas de reposo en oscuridad luego de la irradiación.

3.6 Comportamiento Líquido Cristalino. Breve introducción.

Los *cristales líquidos* (*LC*) son materiales que presentan al menos una fase intermedia entre la líquida isotrópica y la sólida cristalina. Esta fase intermedia se denomina *mesofase*, y a los compuestos que la generan, *mesógenos*. Su investigación tiene un gran interés tanto desde el punto de vista de la caracterización estructural como por su vasto campo de aplicaciones tecnológicas; por ejemplo dentro de la óptica, la optoelectrónica o incluso la medicina.

En este tipo de estado intermedio, las moléculas carecen del orden posicional de un cristal, pero se ordenan en cuanto a la orientación de las moléculas. Así, estos sistemas combinan las propiedades del estado cristalino (anisotropía óptica y eléctrica) y del estado líquido (movilidad y

fluidez molecular). Se pueden encontrar cristales líquidos de dos tipos principales, en función de cómo se genera la mesofase. Si se genera por acción de la temperatura, hablamos de *cristales líquidos termótropos* (los más comunes y los obtenidos en esta sección) y, si es por acción de un disolvente son *liótropos*.

Las moléculas de materiales mesógenos suelen tener una geometría determinada que facilita el empaquetamiento molecular en dichas fases anisótropas. Los sistemas anfífilos basados en sistemas π debido a su naturaleza constituyen mesógenos capaces de presentar comportamiento termotrópico y liotrópico a la vez.²⁵

La complementariedad de todas estas propiedades se pone claramente de manifiesto a la hora de enfocar las aplicaciones tecnológicas de estos materiales. En efecto, la posibilidad de alinear las moléculas mesógenas con relativa facilidad, bajo la aplicación de campos eléctricos, magnéticos, interacciones superficiales, etc.; cambiando de esta manera la dirección de los ejes principales de las mesofases, es de una gran utilidad en aplicaciones electro-ópticas. Así, es bien conocida la industria de dispositivos ópticos basados en cristales líquidos, como las pantallas LCD o los conmutadores electro-ópticos.²⁶

3.6.1. Cristales líquidos termótropos. Generalidades

Las mesofases termotrópicas de los líquidos cristalinos son termodinámicamente estables, pero se presentan como fases solo parcialmente ordenadas. Podemos encontrar como mesofases termotrópicas las nemáticas, las esmécticas, las de cinta, las fases de discos e incluso laminares. Dentro de esta clasificación puede haber subclasificaciones. Éste es el caso de las esmécticas, las cuales se encuentran diferenciadas de la A a la I. Otro ejemplo, es el de las mesofases en cinta que aparecen con anfífilos anhidros, que se diferencian en subwaxy, superwaxy y waxy, entre otras. Cada mesofase se describe por su grado de orden. Si la mesofase sólo tiene un orden de orientación, se le denomina nemática (N); si tiene un orden de orientación y un orden de posición se llama esméctica (Sm) (Figura 3.7).

²⁵ C, Tschierske, *Liquid Crystals: Materials Design and Self-assembly*, Springer – Verlag Heidelberg (2012).

²⁶ W. H. Kuo, P.H. Lin y S.L. Hwang, 'A framework of perceptual quality assessment on LCD TV' (2007) 28 *Displays* 35.

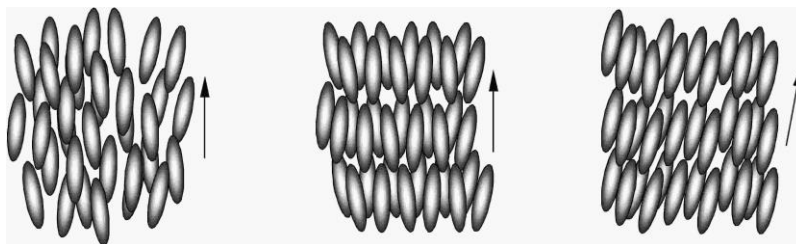


Figura 3.7 De derecha a izquierda: fase nemática, esméctica A y esméctica C. En la fase nemática (N), las moléculas carecen por completo de orden posicional, pero se orientan en la misma dirección. Dicha dirección preferente viene definida por el denominado vector director, n (flecha). Aumentando el grado de orden podemos tener mesofases esmécticas (Sm), donde las moléculas se distribuyen en planos (planos esmécticos o capas esmécticas). En cada uno de estos planos el orden local es nemático. Si las moléculas se disponen perpendicularmente a las capas, la mesofase es la esméctica A (SmA), si están inclinadas tenemos la fase esméctica C (SmC).

Los LC termotrópicos más convencionales tienen geometrías moleculares con núcleos rígidos alargados (cristales líquidos calamíticos, de morfología similar a una vara o rod-like)^{27, 28} y en forma de disco (cristales líquidos discóticos). Unidos a estos grupos rígidos, que son los responsables del empaquetamiento preferentemente uniaxial²⁹ en la mesofase, existen cadenas terminales flexibles y sustituyentes laterales, cuya función es la de servir de “lubricantes” entre las moléculas, confiriendo la estabilización de la alineación molecular y la fluidez propia del estado líquido cristalino.³⁰

En los LC calamíticos la longitud de la molécula (l) es significativamente mayor que su ancho (b) (Figura 3.8). Estas moléculas están constituidas por distintos grupos polares que, en general, confieren un momento dipolar neto a las mismas.



Figura 3.8 Esquema representativo donde la longitud molecular (l) \gg ancho (b).

²⁷ M. Kilic y Z. Cinar, 'Structures and mesomorphic properties of cyano-containing calamitic liquid crystal molecules' (2007) 808 *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 53..

²⁸ H.F. Hsu, H.C. Chen, C.H. Kuo, B.C. Wang y H.T. Chiu 'Design and investigation of calamitic liquid crystals with low aspect ratios: Rigid γ -shaped 1,2,4-tris(4-alkoxyphenylethynyl)benzenes' (2005) 15 *J. Mater. Chem.* 4854.

²⁹ Presentan un solo eje óptico, a lo largo del cual son isotrópicas.

³⁰ D. A. Dunmur, M. R. de la Fuente, M. A. Pérez-Jubindo, S. Diez, ' Dielectric studies of liquid crystals: the influence of molecular shape' (2010) 37 (6-7) *Liq. Cryst.* 723.

Las moléculas calamíticas forman mesofases tanto nemáticas como esmécticas dependiendo del tipo de los sustituyentes y sus combinaciones.^{30, 31} Los anfifilos **3** y **4** sintetizados pueden ser clasificados como cristales líquidos calamíticos debido a su estructura química general (Figura 3.9). Debido a su naturaleza anfifílica, todos los compuestos fueron muy difíciles de recrystalizar. Presentaban alta solubilidad en disolventes orgánicos como cloroformo, metanol, diclorometano, acetona y etanol. La re-cristalización en mezclas de agua o agua / etanol condujo a sólidos gomosos y cerosos. El tratamiento de los sólidos bajo condiciones de vacío a 35°C durante 24 horas nos permitió obtener sólidos estables para su caracterización.

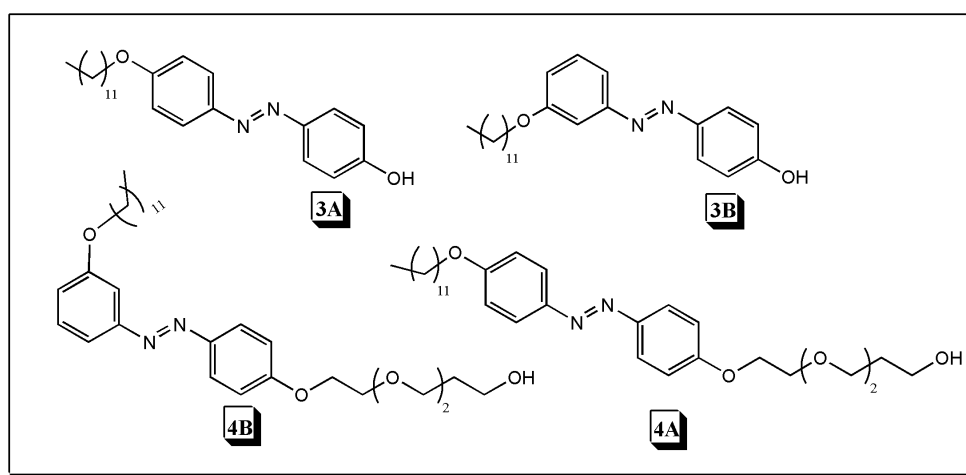


Figura 3.9 Resumen de las estructuras químicas de las moléculas anfifílicas estudiadas.

3.6.2 Comportamiento termotrópico y observación morfológica

Las propiedades LC termotrópicas de los azoanfifilos sintetizados fueron caracterizadas a través de termogramas obtenidos por *Calorimetría Diferencial de Barrido (del inglés, DSC)*. Una vez que se determinan los intervalos de temperaturas dentro de los cuales se producen las transiciones, es necesario conocer cuáles son las mesofases formadas dentro de estos. Para ello se utilizó la Microscopía Óptica de Luz Polarizada (POM) con platina de temperatura controlada y placa de retardación de 1λ . Estas técnicas se desarrollan en el Capítulo 7. Las temperaturas de transición de fase ($T/^\circ\text{C}$), así como los cambios de entalpía de transición de fase ($\Delta H \text{ J g}^{-1}$) corresponden a los segundos barridos de calentamiento y enfriamiento. Todos los valores de transiciones de fases fueron reproducibles en repeticiones de hasta 5 ciclos de calefacción-enfriamiento consecutivos. El resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 3.2.

³¹ O.D. Lavrentovich, *Defects in Liquid Crystals: Computer Simulations, Theory and Experiments*, Springer, (2001).

Compuesto	Temperatura de transición, T/°C (valores de entalpías de transición asociadas, ΔH J g ⁻¹)
3A	2º Calentamiento Cr 102,87 (116,3) I 2º Enfriamiento I 96,72 SmA 95,25 (83,49) Cr
3B	2º Calentamiento Cr1 66,27 (43,65) N-I 2º Enfriamiento I-N 48,31 (37,83) Cr2
4B	2º Calentamiento Cr 58,98 (111,7) I 2º Enfriamiento I 40,10 (96,56) SmA-SmC 30,27 (2,75) Cr
4A	2º Calentamiento Cr-SmC 91,67 (88,10) SmA 107,28 (33,77) PI-Ln 2º Enfriamiento Ln-PI 100,02 (27,51) SmA 89,00 SmC 87,24 (94,29) Cr

Tabla 3.2 Temperaturas de transición de fases con sus respectivas entalpías (entre paréntesis), datos obtenidos de 2º barrido de todos los compuestos en DSC. Abreviaturas: CoA= Coagel; Cr = Sólido Cristalino; SmA = Esmectica A; N = Nemática; I = Fase Isotrópica; PI= Fase Pseudoisotrópica; Ln = Fase Laminar.

El compuesto **3A**, posee la cabeza polar directamente unida al núcleo rígido y presenta una sustitución 4: 4' del azobenceno. En el termograma de DSC se observó un pico en el proceso de calentamiento y dos picos asociados en el enfriamiento (Figura 3.10A). Este comportamiento responde a un cristal líquido de tipo monotrópico debido a que la transición de fase ocurre solo al enfriar, por una disminución de temperatura a partir del líquido isotrópico.³² Durante el calentamiento, se observa solo una transición a 102,9 °C, sin evidencia de formación de mesofase. La entalpía de la transición (116, 3 J g⁻¹) puede asociarse a la fusión del sólido cristalino (Cr) a líquido isotrópico (I), confirmada por la observación en POM. En el ciclo de enfriamiento se pudieron observar por deconvolución dos picos uno a 96,7°C y otro a 95,3° C (83,49 J g⁻¹). Por POM, fue detectable la existencia de una transición I-SmA (97°C) cerca de la

³² F. Ammar-Khodja, S. Guermouche, M.-H. Guermouche, P. Judenstein y J.-P. Bayle, 'Phase Transition Behavior of a New Monotropic Liquid Crystal by Inverse GC' (2009) *70 Chromatographia* 497.

temperatura de cristalización (90 °C). Esto quiere decir que las moléculas, previo a la cristalización, se alinearon paralelamente en capas. La textura de abanicos observada es característica de las mesofases esmécticas A (Figura 3.10B).

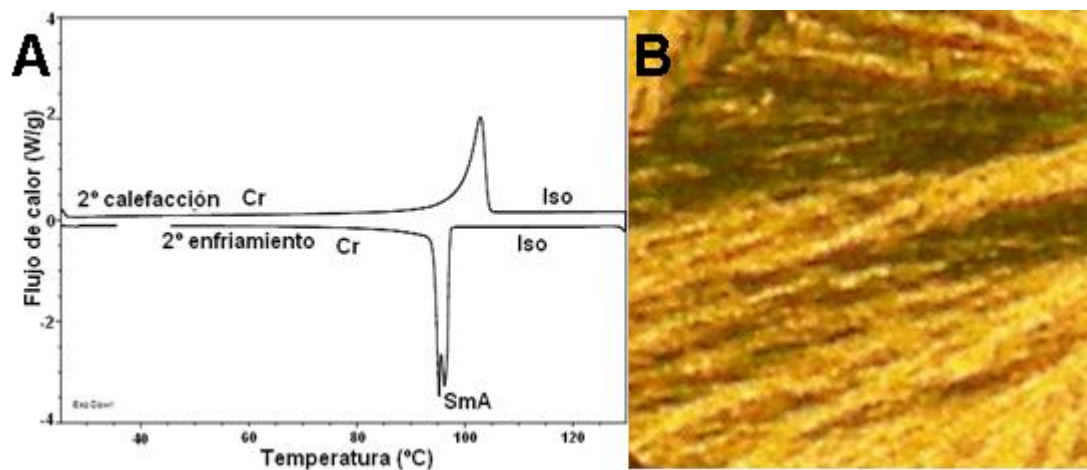


Figura 3.10 A) Termograma de DSC mostrando el 2º calentamiento y enfriamiento del compuesto **3A** (5°C min⁻¹). **B)** Mesofase Esméctica A observada a 96°C durante el enfriamiento del líquido isotrópico. Textura de abanicos. Polarizadores cruzados, magnificación 200x.

El compuesto **3B**, presenta los mismos grupos funcionales que **3A** pero la sustitución en el azobenceno es 4: 3'. Los experimentos de DSC mostraron solamente un pico ancho en el calentamiento (66,3°C, 43,65 J g⁻¹); y otro de similares características en el ciclo de enfriamiento (48,3°C; 37,87 J g⁻¹) (Figura 3.11).

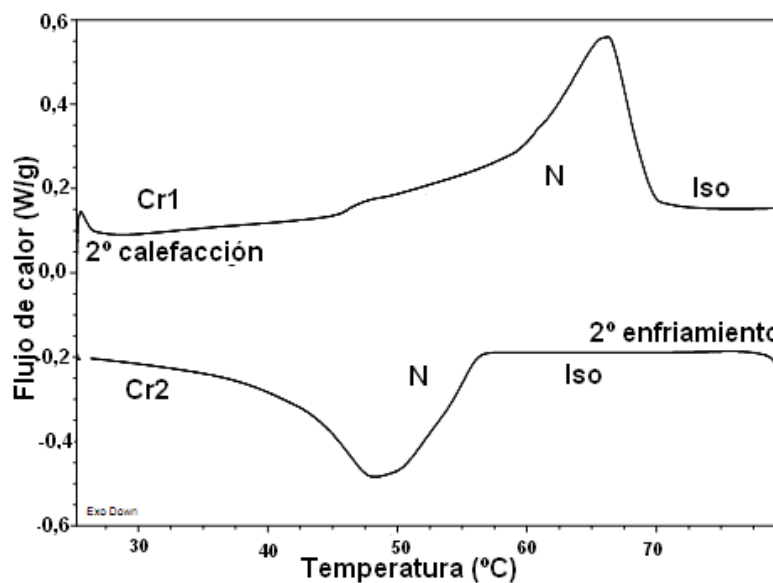


Figura 3.11 Termograma de DSC mostrando el 2º calentamiento y enfriamiento del compuesto **3B** (5°C min⁻¹).

La presencia de picos ensanchados en DSC podría corresponder a transiciones no cooperativas,³³ asociadas con la presencia de micro-dominios probablemente como consecuencia del empaquetamiento deficiente de las moléculas debido a la sustitución 4: 3'. El compuesto **3B** resultó difícil de manipular debido a su naturaleza de tipo "laca". Bajo observación microscópica puede asociarse a una estructura cristalina cerosa (Figura 3.12a), que se hizo fluida alrededor de los 48 °C. Se observó una transición de fase cristalina del sólido (Cr1) a Nemática (N) con la aparición de una textura no geométrica con forma "tipo mármol" característica de esta mesofase (Figura 3.12b). La fase nemática se mantuvo estable hasta alcanzar 65 °C, temperatura a la cual ocurrió la transición a líquido isotrópico.

Durante el enfriamiento la transición del líquido isotrópico a la fase nemática se observó alrededor de los 50°C. La presencia solo de esferulitas positivas y las características figuras uniaxiales confirmaron la mesofase nemática (Figura 3.12c). A 45 °C se observó una transición de fase nemática a cristalina tipo 2. La estructura cristalina granular brillante se determinó como una mesofase laminar, característica de los sistemas surfactantes cristalinos^{34, 35, 36, 37} y se mostró estable a temperatura ambiente (Figura 3.12c y d).

³³ K. Dusek y J.-F. Joanny, *Polymer Characterization: Rheology, Laser Interferometry, Electrooptics*, Springer Science & Business Media (2010).

³⁴ P. A. Thiessen y J. Z. Stauff, (1936), *Physik. Chem. A*, 176.

³⁵ M. J. Buerger, 'The Characteristics of Soap Hemihydrate Crystals' (1942), 28, *Proc. Natl. Acad. Sciences*, 529.

³⁶ N. H. Hartstone y A. Stuart, *Crystals and the Polarizing Microscope*, Arnold, London (1970).

³⁷ K. C. Gouden, P. Ganguli y G. Tiddy, (1992) 96 *J. Phys. Chem.* 4627.

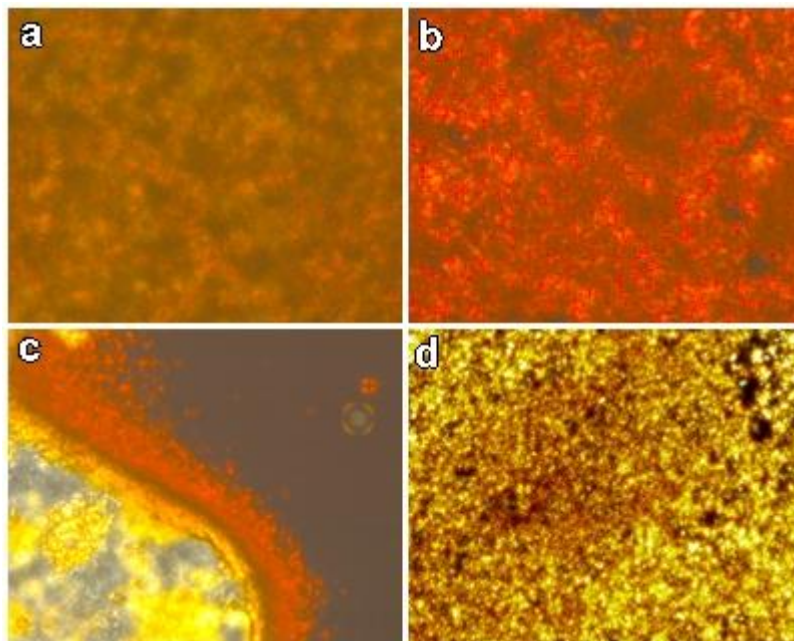


Figura 3.12 Fotomicrografías Ópticas del compuesto **3B** obtenidas por microscopía de luz polarizada **(a)** Estructura cristalina inicial (Cr1) a 25°C. **(b)** Fase Nemática obtenida al calentar a 57°C. Textura no geométrica marmolada. Notar el cambio de color de la estructura respecto de **(a)** bajo idénticas condiciones de obtención de la fotografía. **(c)** Enfriamiento desde la fase nemática (derecha) hasta la estructura cristalina (izquierda), 45 °C. **(d)** Estructura cristalina final a 30°C. **(a)(b)(d)**: Polarizadores cruzados, magnificación $\times 150$. **(c)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 40$.

El compuesto **4B** está sustituido en 4: 3' y tiene como cabeza una molécula de hidroxietilenglicol directamente unida al segmento rígido del anfifilo. El termograma de DSC correspondiente a **4B** mostró un pico por calentamiento (59 °C; 111,7 J g⁻¹) y dos picos al ser enfriado (40,1 °C; 96,6 J g⁻¹ y 30,3 °C; 2,8 J g⁻¹) evidenciando un comportamiento de cristal líquido monotrópico. (Figura 3.13).

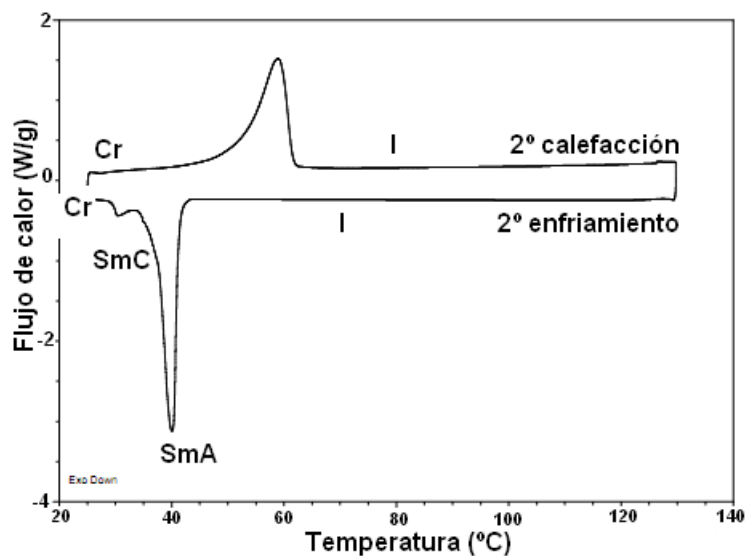


Figura 3.13 Termograma de DSC mostrando el 2º calentamiento y enfriamiento del compuesto **4B** ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

Por POM el compuesto **4B** mostró una estructura cristalina cerosa (Figura 3.14a) usualmente asociada a una estructura laminar en sistemas anfífilos.^{35, 36, 37, 38} La transición de sólido cristalino ceroso a líquido isotrópico se observó a 59°C (Figura 3.14b). En el enfriamiento la transición de líquido isotrópico a fase esméctica A ocurre a 40°C y se detecta otra fase esméctica diferente antes de llegar a los 30°C . La textura de abanicos característica de esméctica A (Figura 3.14c) y la textura de abanicos rotos propia de esméctica C (Figura 3.14d) confirmarían la transición de la primer mesofase a la segunda.³⁸ La baja entalpía detectada para la transición esméctica C - sólido cristalino ($30,3^{\circ}\text{C}$; $2,75 \text{ J g}^{-1}$), también reforzaría la presencia de una mesofase esméctica C hacia el final del enfriamiento.

³⁸ J. W. Goodby y G. W. Gray (1976) 6 *Journal de Physique Colloque C3* 17.

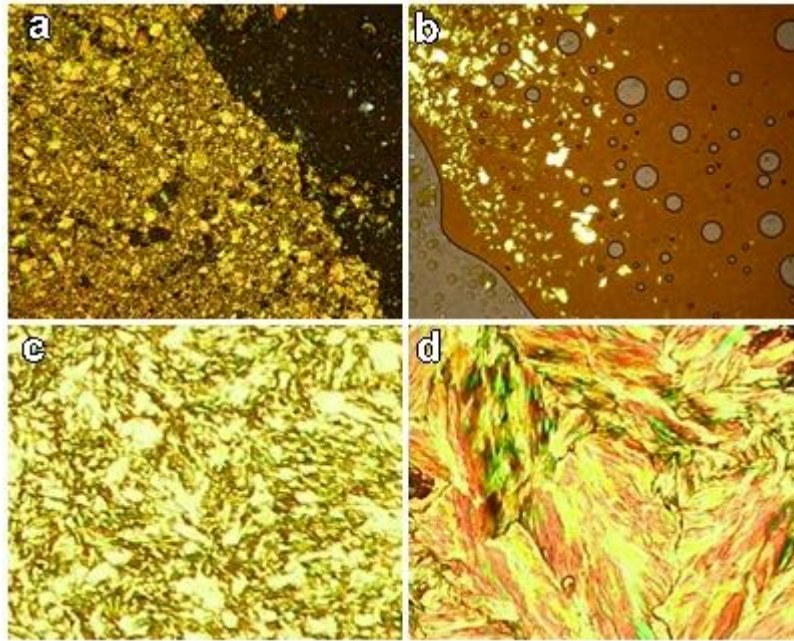


Figura 3.14 Fotomicrografías Ópticas del compuesto **4B** obtenidas por microscopía de luz polarizada **(a)** Estructura cristalina a 25 °C. **(b)** Durante la calefacción hacia el líquido isotrópico a 59 °C. **(c)** Fase esméctica A durante enfriamiento desde el líquido isotrópico, 37 °C. **(d)** Fase esméctica C a 32 °C. **(a)(b)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 40$. **(c)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 150$. **(d)** Polarizadores cruzados, con placa de retardación de 1λ , magnificación $\times 200$.

El compuesto **4A** está 4: 4' sustituido y presenta como cabeza una molécula de hidroxitrietilenglicol. El experimento de DSC de **4A** reveló dos transiciones durante el calentamiento a 91,7 °C ($88,10 \text{ J g}^{-1}$) y 107,28 °C ($33,77 \text{ J g}^{-1}$). Al enfriar, se produjo una transición trifásica a 100,02 °C ($27,51 \text{ J g}^{-1}$); 89 °C y 87,2 °C ($94,29 \text{ J g}^{-1}$). Se evidenció un comportamiento polimórfico de tipo enantiotrópico para este anfifilo, con la presencia de rangos de temperatura agudos mostrando la estabilidad de las diferentes mesofases (Figura 3.15). Las mesofases exhibidas pueden observarse durante el calentamiento y el enfriamiento de las muestras.

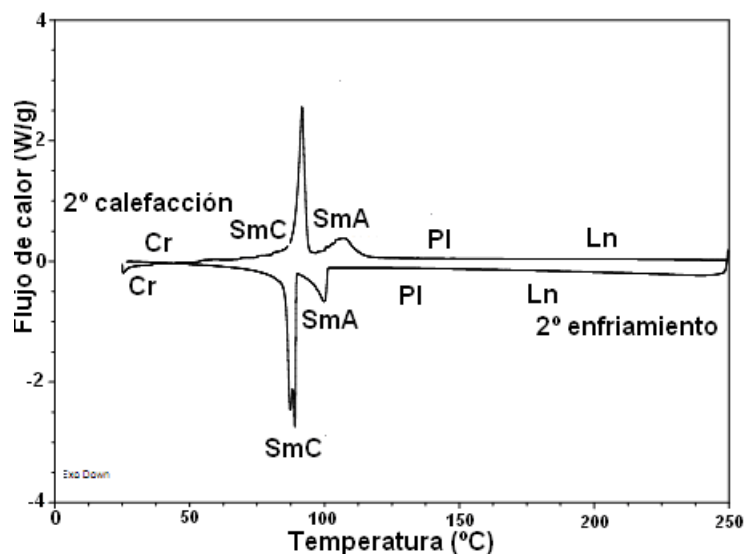


Figura 3.15 Termograma de DSC mostrando el 2º calentamiento y enfriamiento del compuesto **4A** ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

El polimorfismo en el comportamiento del anfifilo **4A** también fue detectado por POM. A temperatura ambiente presentó una estructura cristalina cerosa, del tipo waxy^{35, 36, 37, 38} característica de mesofases de cintas que aparecen en anfifilos anhidros (Figura 3.16a). En el calentamiento fue posible detectar la transición de sólido cristalino a las sucesivas mesofases esmécticas recientemente dilucidadas por difracción de rayos X (XRD).³⁹ Debido a las texturas observadas fue posible asignar una transición de esméctica C a esméctica A a $91,67^{\circ}\text{C}$ (Figura 3.16b), en concordancia con los resultados documentados por Tan y colaboradores. Se observa la presencia de las características esferulitas positivas y negativas involucradas en la transición entre las mesofases esmécticas (Figura 3.16c). En general, una mesofase esméctica, cuando es colocada entre cubre y portaobjetos de vidrio, no se comporta de forma simple. Las capas de compuesto, dispuestas de manera tal de formar una película, conservan su espesor pero se distorsionan para poder deslizarse unas sobre otras y así ajustarse a las condiciones superficiales. Las propiedades ópticas (textura cónica focal) del estado esméctico surgen de estas distorsiones de las capas.³⁰ En el rango transicional de temperatura (entre $87,5$ y 94°C) la mesofase esméctica C observada exhibe la típica textura de Schlieren²³ (Figura 3.16d, abajo), mientras que la esméctica A se diferencia por presentar vetas oleosas entre áreas homeotrópicas. (Figura 3.16d, arriba)

³⁹ X. Tan, R. Zhang, C. Guo, X. Cheng, H. Gao, F. Liu, J. R. Bruckner, F. Giesselmann, M. Prehm y C. Tschierske 'Amphotropic azobenzene derivatives with oligooxyethylene and glycerol based polar groups' (2015) 3 *J. Mater. Chem. C* 11202.

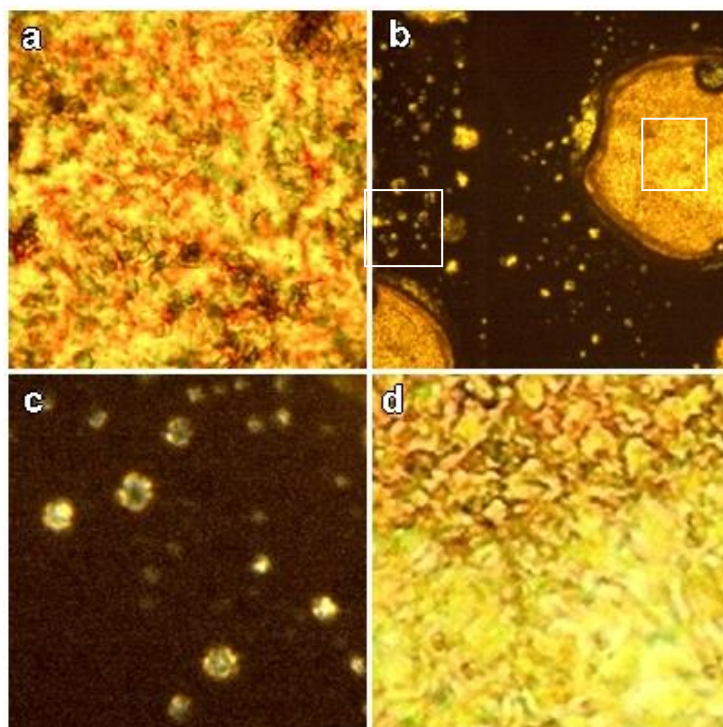


Figura 3.16. Fotomicrografías Ópticas del compuesto **4A** obtenidas por microscopía de luz polarizada **(a)** Estructura cristalina a 25°C. **(b)** Transición de mesofase esméctica C a esméctica A durante calefacción a 92°C. **(c)** Ampliación de **(b)** mostrando las esferulitas positivas. **(d)** Ampliación de **(b)** mostrando la transición de la mesofase esméctica C (abajo) a la esméctica A (arriba). **(a)(d)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 200$ **(b)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 40$ **(c)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 100$.

A 107 °C, el sistema comenzó a evolucionar a una mesofase pseudoisotrópica con la aparición de figuras uniaxiales (Figura 3.17a). A 240 °C, se produjo otra fase esmerilada o lamelar neta con una textura de líneas oleosas (oily-streak, del inglés). Los anfifilos iónicos anhidros presentan este tipo de mesofases laminares producidas térmicamente con características de labilidad debido a que aparecen a altas temperaturas. En este caso, la mesofase formada a alta temperatura se mostró estable hasta los 280 °C, temperatura a partir de la cual el compuesto se descompone irreversiblemente. Cuando el enfriamiento se inició a 250 °C, se observó la coexistencia de la mesofase lamelar oleosa junto con la fase pseudoisotrópica hasta los 103 °C, temperatura a partir de la cual comienza a observarse una morfología de tipo esferular, positiva, altamente brillante, creciendo durante el enfriamiento a partir de la fase isotrópica. A 89 °C se detectó una transición estructural de esméctica A, a esméctica C. Las texturas fueron similares a las observadas en el ciclo de calentamiento en el mismo rango de temperatura.

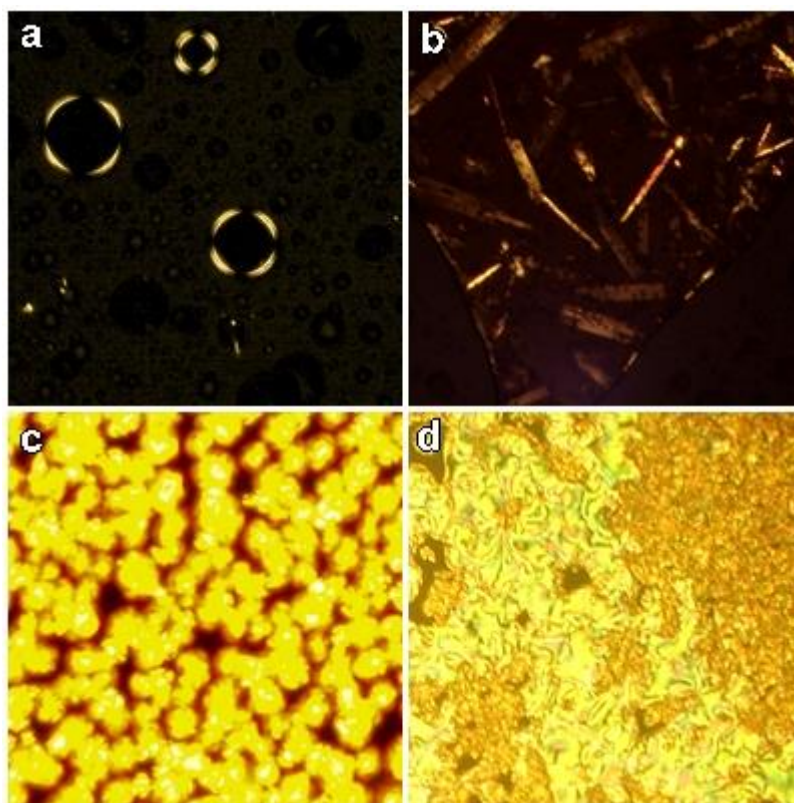


Figura 3.17 Fotomicrografías Ópticas del compuesto **4A** obtenidas por microscopía de luz polarizada. **(a)** Figuras uniaxiales observadas durante la calefacción hasta alcanzar la mesofase de líquido pseudoisotrópica a 110 °C. **(b)** Mesofase de arreglo lamelar con textura de cintas oleosas, 240 °C. **(c)** Esferas positivas de gran brillo creciendo desde el líquido isotrópico durante el enfriamiento a 103 °C **(d)** Transición desde esméctica A (derecha) a esméctica C (izquierda) durante el enfriamiento a 89 °C. **(a)(c)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 100$. **(b)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 40$. **(d)** Polarizadores cruzados, magnificación $\times 150$.

3.7. Conclusión

Debido principalmente a que la formación de los agregados supramoleculares tiene una importante dependencia de la estructura molecular de los anfifilos, hemos planteado una ruta sintética versátil que nos permitió a través de pasos sencillos introducir modificaciones en la cabeza polar y en la cola hidrofóbica necesarias para diseñar azoanfifilos con potencial funcionalidad como sistemas fotoconmutables.

Los nuevos anfifilos no iónicos sintetizados: **3A**, **3B**, **4B** y **4A**, presentaron un comportamiento de cristal líquido termotrópico, como pudo ser determinado por DSC y por POM. Esto los convierte en nuevos materiales basados en moléculas pequeñas, con posibles aplicaciones tecnológicas. Los compuestos **3A** y **4B** fueron caracterizados por su

comportamiento termótropro como cristales líquidos monotrópicos. El compuesto **3B** evidenció transiciones no cooperativas probablemente como consecuencia del empaquetamiento deficiente de las moléculas debido a la sustitución 4: 3'. El polimorfismo esméctico observado en el compuesto **4A** es similar al observado para los anfifilos iónicos, mostrando un comportamiento de tipo enantiotrópico en su termotropismo. Además, el compuesto **4A** presentó una mesofase lamelar a alta temperatura (240 °C), similar a la observada en anfifilos iónicos comunes. La reciente documentación de la evaluación de su comportamiento termótropro por XRD, realizada por Tan y colaboradores³⁹ confirma nuestra caracterización por POM.

Los experimentos de irradiación con luz UV por espectroscopía UV-Vis y RMN mostraron que de los cuatro anfifilos caracterizados, solo el anfifilo **4A** es capaz de fotomodular eficientemente, logrando un equilibrio fotodinámico estable, con óptimos resultados de reversión térmica y sin evidenciar descomposición.

Los resultados obtenidos de fotoisomerización conjuntamente con el mesomorfismo observado de 4A sugieren particularmente para este compuesto la posibilidad de ser utilizado como una sonda ópticamente controlada, tanto por sí mismo, como potencialmente en mezclas con otros anfifilos:

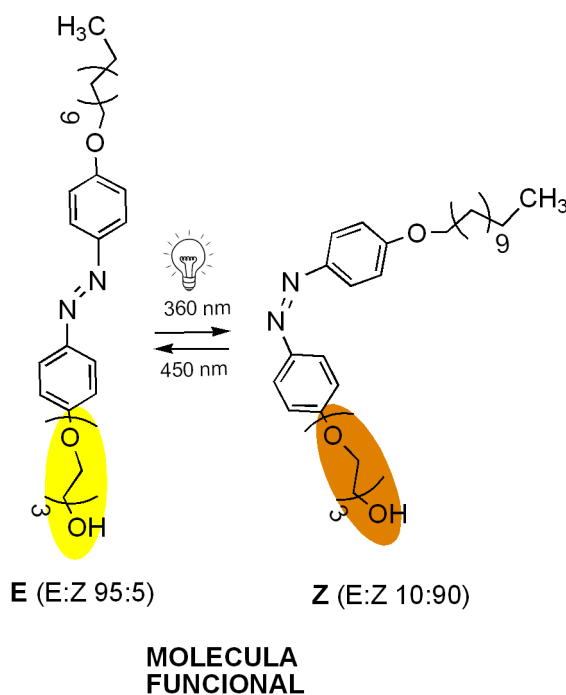


Figura 3.18 Nuevo anfifilo desarrollado como potencial molécula funcional con capacidad fotoconmutable.

Capítulo IV

*Comportamiento interfacial de
4A e interacción con una
biomembrana modelo*

4.1 Breve Introducción y Planteamiento

Se ha estudiado extensamente la relación estructura/morfología de anfifilos basados en azobencenos (azoanfifilos) iónicos, observando particularidades interesantes tales como la capacidad de formar monocapas en la interfase aire-agua y bicapas en medio acuoso.¹ Muchos han sido empleados en agregados tales como bicapas/vesículas,^{2, 3} monocapas de Langmuir-Blodgett (LB)⁴ y micelas.⁵ Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos compuestos de controlar la permeabilidad de membrana,⁶ modificando la apertura de canales de proteínas⁷, además de otras propiedades macroscópicas.^{5, 6} Sin embargo, la eficiencia de dichos eventos no ha sido excelente debido principalmente a la dificultad de fotoisomerización en el estado agregado.

Un número importante de azoanfifilos que responden a la luz han sido utilizados para proveer cambios estructurales con el objetivo de modificar las propiedades de la solución (estado de agregación) y de superficie (tensión superficial). Pero en su mayoría estos poseen características iónicas, las cuales plantean un inconveniente a la hora de definir su funcionalidad en sistemas reales, como en membranas biológicas o en formulaciones de liposomas. La causa es debida principalmente a que las cabezas cargadas tienen un efecto determinante sobre la configuración espacial del área de sección transversal de la molécula anfifílica, tal que el cambio conformacional logrado por las colas como resultado de la fotoisomerización, tiene muy poco efecto en el empaquetamiento del anfifilo en la capa absorbida interfacial, y consecuentemente

¹ T. Kunitake, 'Aqueous bilayer dispersions, cast multilayer films, and Langmuir—Blodgett films of azobenzene-containing amphiphiles' (1986) 19 *Colloids Surf.* 225.

² T. Kunitake, 'Synthetic Bilayer Membranes: Molecular Design, Self-Organization, and Application' (1992) 31 *Angew. Chem. Int. Ed.* 709.

³ D. G. Whitten, L. Chen, H. C. Geiger, J. Perlstein, X. Song, 'Self-Assembly of Aromatic-Functionalized Amphiphiles: The Role and Consequences of Aromatic—Aromatic Noncovalent Interactions in Building Supramolecular Aggregates and Novel Assemblies' (1998) 102 *J. Phys. Chem. B.* 10098.

⁴ T. Kinoshita, 'Photoresponsive membrane systems' (1998) 42 *J. Photochem. Photobiol. B.* 12.

⁵ a) T. Hayashita, T. Kurosagua, T. Miyata, K. Tanaka, M. Igawa, 'Effect of structural variation within cationic azo-surfactant upon photoresponsive function in aqueous solution Colloid' (1994) 272 *Polym. Sci.* 1611. b) L. Yang, N. Takisawa, T. Kaikawa, K. Shirahama, 'Interaction of photosurfactants, 2-[4-(4-alkylphenylazo)phenoxy] ethyltrimethylammonium bromides with γ -cyclodextrin and thermodynamics of complexation of photosurfactants with cyclodextrins' (1995) 99 *J. Phys. Chem. B.* 8799. c) H-C. Kang, B. M. Lee, J. Yoon, M. J. Yoon, 'Synthesis and Surface-Active Properties of New Photosensitive Surfactants Containing the Azobenzene Group' (2000) 231 *Colloid Interface Sci.* 255.

⁶ a) X. Song, J. Perlstein, D. G. Whitten, 'Supramolecular Aggregates of Azobenzene Phospholipids and Related Compounds in Bilayer Assemblies and Other Microheterogeneous Media: Structure, Properties, and Photoreactivity' (1997) 119 *J. Am. Chem. Soc.* 9144. b) J. M. Kuiper, J. B. Engberts, 'H-Aggregation of Azobenzene Substituted Amphiphiles in Vesicular Membranes' (2004) 20 *Langmuir* 1152.

⁷ J. H. A. Folgering, J. M. Kuiper, A. H. De Vries, J. B. F. N Engberts y B. Poolman, 'Lipid-mediated light activation of a mechanosensitive channel of large conductance' (2004) 20 *Langmuir* 6985.

en la tensión superficial del sistema. Es por esta razón que el estudio de azoanfílicos con cabezas no iónicas, del tipo hidroxilo, tienen interés en el desarrollo de sistemas que cambien no solo las características de la solución sino también las interfaciales.⁸ Este tipo de sistemas ha sido mucho menos explorado, aún cuando la posibilidad de cambiar las propiedades superficiales a través de estímulos constituya un tema de gran relevancia tanto en investigación básica como aplicada.

Las monocapas de Langmuir y Gibbs han ofrecido un gran potencial para el estudio de la organización de los compuestos anfílicos⁹, en particular de aquellos constituidos por lípidos, permitiendo dilucidar el empaquetamiento de las moléculas en base a su estructura química, las interacciones intermoleculares, y las interacciones con la subfase soporte.^{10, 11, 12} De hecho, las monocapas de Langmuir han sido utilizadas para modelar tanto el autoensamblaje de azobencenos en la interface aire/líquido, como los procesos que ocurren en membranas lipídicas.^{13, 14, 15} Sin embargo no existen antecedentes de su utilización para evaluar el comportamiento de mezclas de azoanfílicos con lípidos. El uso concomitante de diversos componentes en una monocapa, como en el presente trabajo, presta herramientas para desarrollar sistemas transportadores a base de anfílicos, entre otros.

Teniendo en cuenta el comportamiento de **4A** como sonda ópticamente controlada (Capítulo 3) y considerando sus propiedades mesomórficas (sección 3.6.2) se decidió evaluar sus características interfaciales y su capacidad de interacción con una membrana modelo como es el sistema Lipoids s75TM.

4.2. Autoorganización en la interfase aire/líquido: Isotermas de Langmuir

⁸ T. Shang, K. A. Smith, T. A. Hatton, 'Photoresponsive Surfactants Exhibiting Unusually Large, Reversible Surface Tension Changes under Varying Illumination Conditions' (2003) 19 *Langmuir* 10764.

⁹ A. S. Mikhailov, G. Ertl, 'Nonequilibrium Structures in Condensed Systems' (1996) 272 *Science* 1596.

¹⁰ R. Maget-Dana, 'The Monolayer Technique: a Potent Tool for Studying the Interfacial Properties of Antimicrobial and Membrane- Lytic Peptides and their Interactions with Lipid Membranes' (1999) 1462 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 109.

¹¹ V. M. Kaganer, H. Mohwald, P. Dutta, 'Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers' (1999) 71 *Rev. Mod. Phys.* 779.

¹² G. Brezesinski, H. Mohwald, 'Langmuir Monolayers to Study Interactions at Model Membrane Surfaces' (2003) 100 *Adv. Colloid Interface Sci.* 563.

¹³ A. Pulido-Companys, J. Ignes-Mullol, 'Thermodynamics and Mesoscopic Organisation in Langmuir Monolayers of an Azobenzene Derivative' (2010) 352 *J. Colloid Interface Sci.* 449.

¹⁴ J. Crusats, R. Albalat, J. Claret, J. Ignes-Mullol, F. Sagues, 'Influence of Temperature and Composition on the Mesoscopic Textures of Azobenzene Langmuir Monolayers' (2004) 20 *Langmuir* 8668.

¹⁵ A. Pulido-Companys, R. Albalat, J. Garcia-Amoros, D. Velasco, J. Ignes-Mullol, 'Supramolecular Chiral Azobenzene Surfactants' (2013) 29 *Langmuir* 9635.

Se analizaron comparativamente las isothermas o curvas de compresión de las monocapas de Langmuir tanto para la isoforma *E* del compuesto **4A** (equilibrio fotoestacionario *E:Z* 95:5), como para la isómero *Z* (equilibrio fotoestacionario *E:Z* 10:90) a 24 °C. Para ello se graficó el cambio en la presión superficial (π) en función del área molecular promedio (MMA), o sea, el área o sección promedio que ocupa cada molécula en todo el área circunscripta entre las barreras de compresión, en \AA^2 . Esta técnica se desarrolla en forma detallada en el Capítulo 7, sección 7.2.2.

En la Figura 4.1 se puede observar la exhibición de mayores valores de presión de colapso por parte de **4A (E)** (~ 53 mN/m) respecto de **4A (Z)** (42 mN/m). Las Áreas Media Moleculares (MMA), determinadas para ambos isómeros a los valores de máxima presión, fueron similares para ambos ($\sim 23 \pm 2$ $\text{\AA}^2/\text{molécula}$), mostrando que a la presión de colapso, el grupo azobenceno se ubicaría de forma perpendicular al plano de la superficie.¹⁶ Este valor se corresponde con datos previamente publicados⁷, de un compuesto constituido por una cabeza con un grupo hidroxilo unido a una molécula de dietilenglicol, y diferentes conectores entre el grupo azobenceno y la cabeza hidroxílica ($\text{C}_4\text{azoOconectorE}_2\text{OH}$). Además, es cercano al valor de área de sección transversal de una cadena hidrocarbonada ~ 18 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$.¹⁷

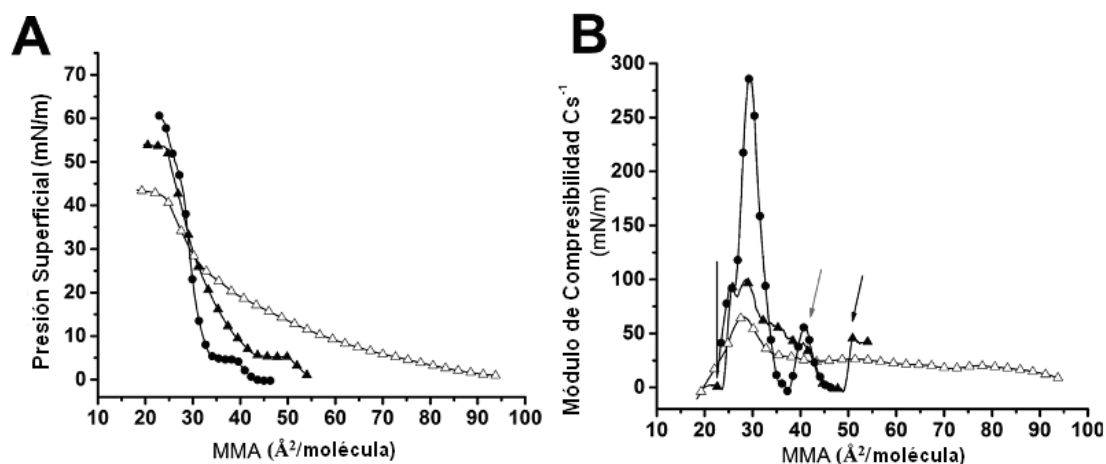


Figura 4.1 A) Isothermas de Langmuir a 24°C, velocidad de compresión de 2 ± 1 $\text{\AA}^2 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$: **4A (E)** (\blacktriangle), **4A (Z)** (\triangle) y **3A (E)** (\bullet). **B)** Módulo de compresibilidad de **4A (E)** (\blacktriangle), **4A (Z)** (\triangle) y **3A (E)** (\bullet). Las flechas indican el comienzo de la transición de fase. Las curvas mostradas fueron elegidas de un set de duplicados que difieren en menos de 2 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$.

Con el objeto de comparar la influencia de la longitud de la cabeza en la autoorganización de las moléculas en la interfase aire/líquido, se incluyó en este análisis la isoterma de compresión

¹⁶ T. Seki, T. Fukuchi, K. Ichimura, 'Langmuir Monolayers of Azobenzene Derivative with a Urea Head Group' (1998) 71 *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2807.

¹⁷ G. L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience Publishers: New York (1966).

del compuesto **3A (E)** (*E*: Z 90:10), el cual tiene un grupo hidroxilo directamente unido al grupo azobenceno. Se observó que las monocapas correspondientes a **4A (E)** (\blacktriangle) y **3A (E)** (\bullet) se comportaron de forma similar en solución salina $\text{pH}_b \sim 5.5$ (Figura 4.1A). Ambas mostraron una transición de fase a valores bajos de presión superficial ($\pi \leq 5$ mN/m), colapsando a ~ 55 y 60 mN/m, respectivamente. Las monocapas de **3A (E)** no mostraron signos de disminución de la presión después del colapso, evidenciando una alta estabilidad de la película a 24 °C. Este efecto se ha informado anteriormente en monocapas de azobencenos conteniendo alcoholes polivinílicos y de azobencenos derivados de urea,¹⁸ y ha sido asociado con interacciones intermoleculares fuertes. En este caso, las interacciones π -stacking de los anillos aromáticos de **3A (E)** serían máximas, debido a la menor repulsión estérica ejercida por la cabeza, constituida solo por un grupo hidroxilo directamente unido al grupo azobenceno. Las MMA en las transiciones de fase fueron de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para **4A (E)**, y de $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para **3A (E)**. Esto podría deberse a que el grupo hidroxil trietilenglicol más largo en el caso de **4A (E)**, ejercería una repulsión más fuerte en comparación con **3A (E)**, resultando en un MMA más alto cuando se produce la transición de fase.

Como observamos en el capítulo anterior, **3A (E)** tiene una reversión térmica (fotoisomerización *Z-E*) muy rápida por lo cual el equilibrio fotoestacionario enriquecido en *Z*, no fue medido en la interfase aire/agua. La curva de compresión de la monocapa de Langmuir de **4A (Z)** mostró una pendiente suave sin transición hasta colapsar. La conformación tridimensional de una geometría curvada en torno al grupo azobenceno, que adquiere **4A (Z)**, podría ser la razón de tal comportamiento. Resultados similares para los isómeros *E* y *Z* han sido previamente descritos para otros anfifilos constituidos por azobencenos y correlacionados con la organización supramolecular en la interfase aire/agua.^{18, 19}

Se evaluó la solubilidad en la subfase para las películas formadas por **4A (E)**, **4A (Z)** y **3A (E)**, mediante la estimación de la tasa promedio de pérdida de área de la monocapa, al ser mantenidas a una presión superficial constante de 35 mN/m (Figura 4.2). Las películas compuestas por **4A (E)** y **3A (E)** muestran después de 23 minutos, un promedio de pérdida de área de 13% y 5% respectivamente, siendo aproximadamente de 28% para las monocapas de **4A (Z)**. Este experimento evidenció una mayor solubilidad del isómero (*Z*) a presión elevada

¹⁸ M. K. Durbin, A. Malik, A. G. Richter, C. J. Yu, R. Eisenhower, P. Dutta, 'Ordered Phases in Langmuir Monolayers of an Azobenzene Derivative' (1998) *14 Langmuir* 899.

¹⁹ J.-M. Pedrosa, M. T. M. Romero, L. Camacho, D. Mobius, 'Organization of an Amphiphilic Azobenzene Derivative in Monolayers at the Air-Water Interface' (2002) *106 J. Phys. Chem. B*, 2583.

constante, en comparación con los isómeros (*E*), lo cual puede ser explicado por el aumento del momento dipolar del isómero *Z*.²⁰

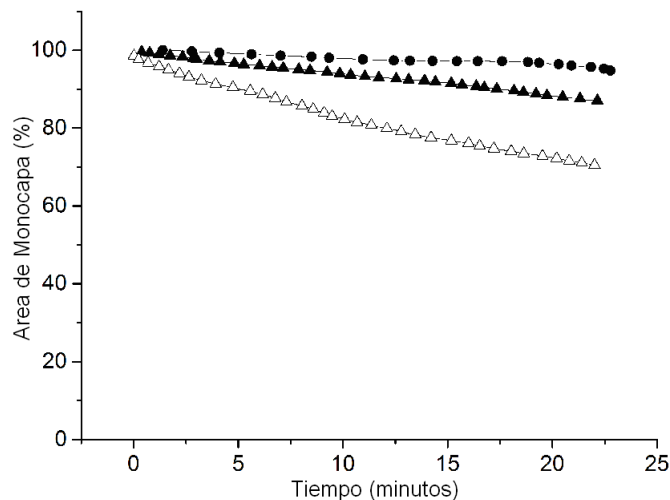


Figura 4.2 Estabilidad de monocapas de Langmuir a una presión superficial constante. Las áreas ocupadas por las monocapas conformadas por 4A (*E*) (▲), 4A (*Z*) (△) y 3A (*E*) (●) fueron registradas a una presión superficial constante de 35 mN/m en función del tiempo. En todos los casos las curvas experimentales mostradas son representativas y difieren en menos del 2 % respecto a sus réplicas.

Las curvas de las monocapas de **4A (*E*)** a 13 °C mostraron esencialmente las mismas características de colapso (MMA y presión superficial) que las ya presentadas a 24 °C, sin embargo, a 13 °C no se observó la transición de fase en 50 Å²/molécula (Figura 4.3). No obstante, las monocapas a 13 °C fueron más adecuadas para realizar los experimentos de BAM debido a su mayor reproducibilidad.

²⁰ B. Feringa, *Photoswitchable Polypeptides*. In *Molecular Switches* Ed. Wiley-VCH, Verlag GmbH, 399 (2001).

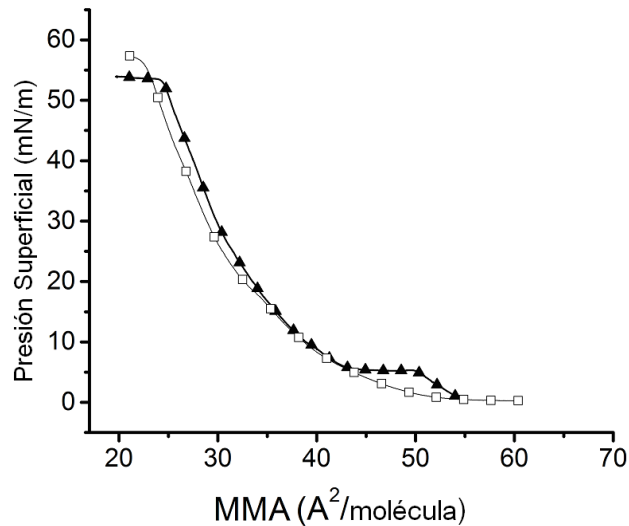


Figura 4.3 Isothermas de Langmuir de **4A (E)** a 13°C (□) y 24°C (▲).

La monocapa de **3A (E)** muestra un carácter condensado o sólido, evidenciado para valores relativamente altos de Cs^{-1} (300 mN/m, Figura 4.1B), muy por encima de 5 mN/m.²¹ Para las monocapas de **4A (E)** se observó que la misma es menos compacta, con $Cs^{-1} \sim 100$ mN/m, lo que sugiere un estado líquido cristalino a $\pi > 5$ mN/m. La diferencia de los valores de Cs^{-1} entre **4A (E)** y **3A (E)** refuerza la idea de que **3A (E)** formaría monocapas altamente condensadas debido a la fuerte interacción intermolecular, que no opera ni en las monocapas de **4A (E)**, ni en las de **4A (Z)** ($Cs^{-1} \sim 60$ mN/m).

4.3 Visualización de autoorganización en la interfase aire/líquido: Microscopía de Angulo de Brewster (BAM)

La Figura 4.4A muestra que **3A (E)** presenta un carácter de tipo sólido, detectándose esferulitas positivas a baja presión superficial (<1 mN/m) característicos de una mesofase de tipo Hexática I²¹, la cual se pierde por encima de 5 mN/m. Comparativamente, se puede observar que las monocapas **4A (E)** (Figura 4.4B) y **4A (Z)** (Figura 4.4C) están compuestas de fases altamente reflectantes y micro-heterogéneas, que se asemejan a una fase condensada.

²¹ D.Rogez, L. G. Benguigui, P. Martinoty, 'Behavior of the Layer Compression Elastic Modulus Near, Above, and Below a Smectic C-Hexatic I Critical Point in Binary Mixtures' (2005) 16 *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* 193..

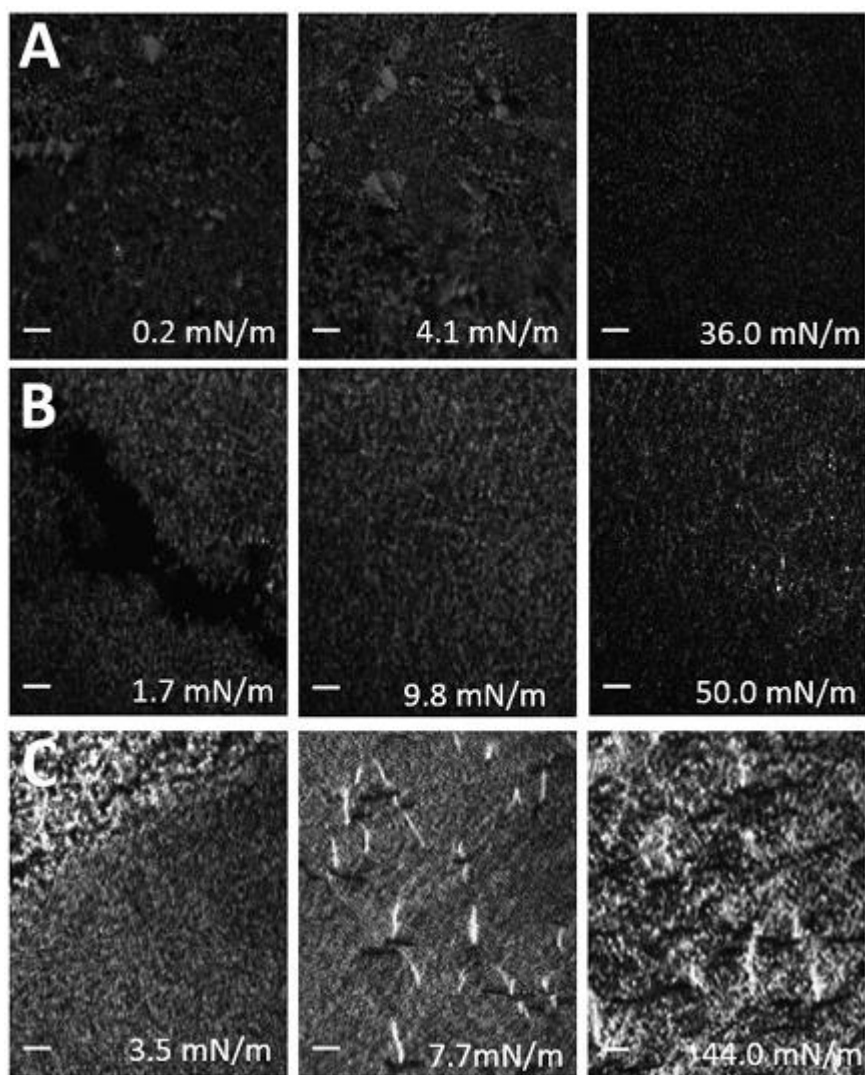


Figura 4.4 Microfotografías BAM a 13 °C de (A) **3A (E)**, (B) **4A (E)**, y (C) **4A (Z)**. Las presiones superficiales están indicadas en cada foto (representativa de dos experimentos independientes). La escala de las barras corresponde a 20 μm .

Pedrosa y colaboradores²¹ describieron el mismo comportamiento para un derivado carboxílico de azobenceno, atribuyéndole estas características a la tendencia de las colas hidrofóbicas de formar en la interfase aire/agua, agregados tipo H (conocidos como “cara a cara”). En particular, **4A (E)** muestra debajo de 3 mN/m la formación de islas de fase expandida, las cuales al ser expuestas a un incremento adicional de la presión superficial, forman una mesofase sólida uniforme, similar a la observada para **3A (E)** (comparar las Figuras 4.4A y B cerca de la presión de colapso). Estas mesofases organizadas fueron capaces de formar agregados supramoleculares de tamaño mesoscópico, presentando una alineación molecular regular con alta birrefringencia, por lo cual, sus agregados pudieron ser detectados directamente usando microscopía de luz polarizada. Es conocido que los isómeros *E* de los derivados azobencenos

tienen una alta tendencia a formar agregados tipo H, tanto en estructuras cristalinas en solución, como en las monocapas, como se ha demostrado utilizando otras técnicas experimentales.^{20, 21, 22, 23, 24}

Resultó interesante el análisis de los experimentos de BAM de **4A (Z)** (Figura 4.4C), al observarse figuras con forma de gusano a medida que la presión superficial se incrementaba. Estas formas pudieron visualizarse como calles brillantes en posición vertical, tornándose oscuras en posición horizontal, como consecuencia de su interacción diferencial con la luz polarizada, por lo cual es posible predecir que sería la misma estructura, observada en diferentes planos de polarización. En general, las fases de monocapas constituidas por moléculas inclinadas, a menudo muestran un orden de largo alcance en la orientación de la inclinación, dando lugar a una anisotropía óptica en el plano. La reflectividad de alto brillo observada por BAM tras la compresión podría ser el resultado de la prominente geometría inclinada de **4A (Z)** que se mantiene cerca del colapso (Figura 4.5).

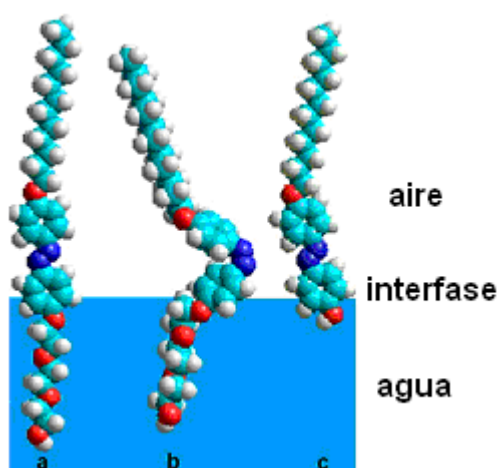


Figura 4.5 Modelos moleculares propuestos para la disposición de **4A (E)** (a); **4A (Z)** (b); y **3A (E)** (c) en la interfase aire/agua cerca de la presión de colapso. Referencias atómicas: rojo (oxígeno), celeste (carbono), azul (nitrógeno), blanco (hidrógeno).

²² G. Xu, K. Okuyama, M. Shimomura, 'Crystal Structures of H-Aggregate of Azobenzene-Containing Amphiphiles, $C_6AzoC8N^+Br^-$ and $C_8AzoC10N^+Br^-$ ' (1992) 213 *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A* 105.

²³ T.Kawai, J. Umemura, T. Takenaka, 'UV Absorption Spectra of Azobenzene-Containing Long-Chain Fatty Acids and their Barium Salts in Spread Monolayers and Langmuir-Blodgett Films' (1989) 5 *Langmuir* 1378.

²⁴ J. Maack, R. C. Ahuja, H. Tachibana, 'Resonant and Nonresonant Investigations of Amphiphilic Azobenzene Derivatives in Solution and in Monolayers at the Air/Water Interface' (1995) 99 *J. Phys. Chem.* 9210.

Las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8 muestran las secuencias completas del set de microfotografías obtenidos a las diferentes presiones superficiales crecientes para **3A (E)**, **4A (E)** y **4A (Z)**, respectivamente.

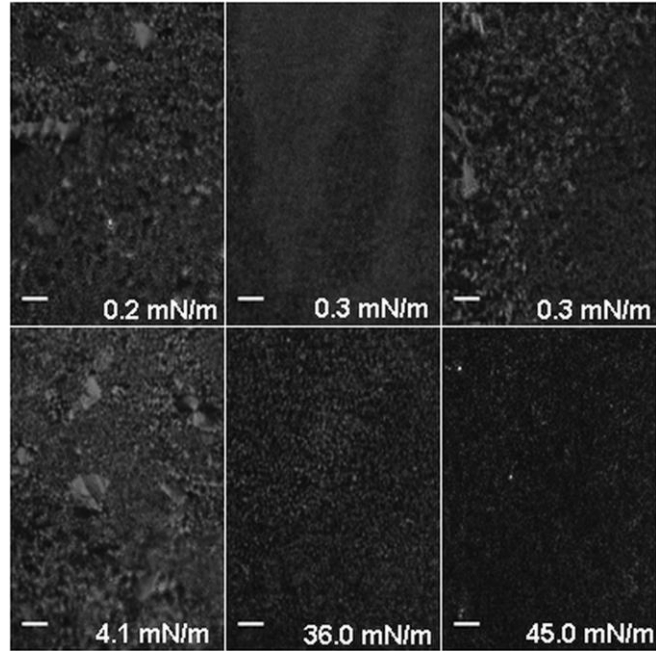


Figura 4.6 Secuencia completa de microfotografías BAM de **3A (E)** a 13 °C. Las presiones superficiales están indicadas en cada foto (representativa de dos experimentos independientes). La escala de las barras corresponde a 20 μm.

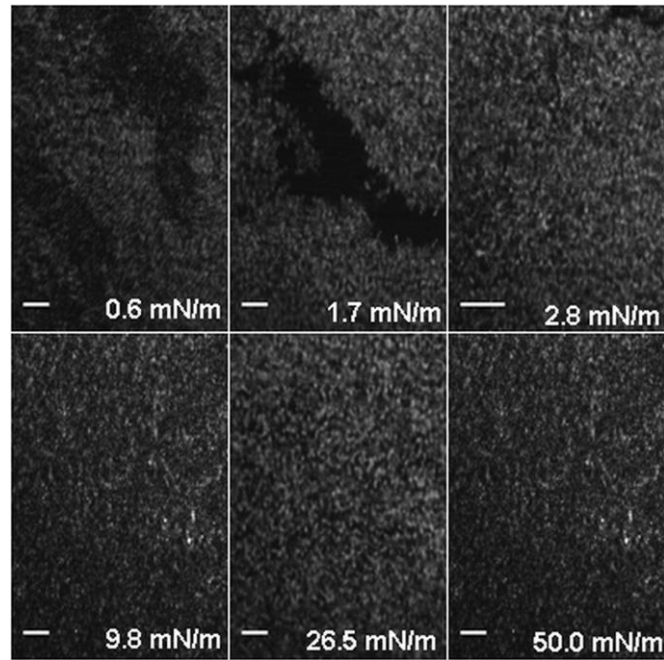


Figura 4.7 Secuencia completa de microfotografías BAM de **4A (E)** a 13 °C. Las presiones superficiales están indicadas en cada foto (representativa de dos experimentos independientes). La escala de las barras corresponde a 20 μm .

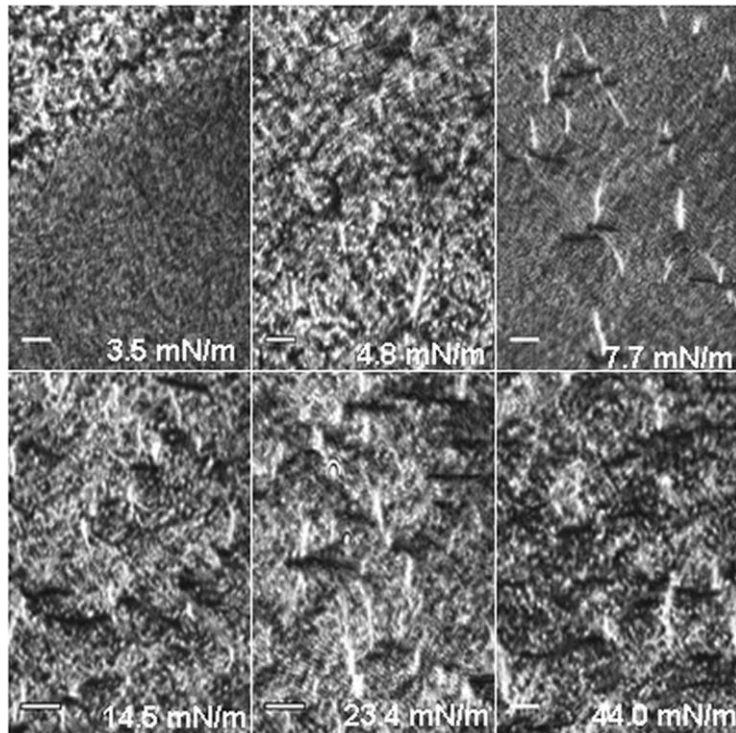


Figura 4.8 Secuencia completa de microfotografías BAM de **4A (Z)** a 13 °C. Las presiones superficiales están indicadas en cada foto (representativa de dos experimentos independientes). La escala de las barras corresponde a 20 μm .

4.4. Fotoisomerización de 4A en la interfase aire/líquido

En primer lugar, las monocapas de **4A (E)** se mantuvieron a una presión superficial de 2 mN/m y 10 mN/m en experimentos independientes y, a continuación, ambos sistemas se dejaron equilibrar durante varios minutos. Luego, las monocapas fueron iluminadas con luz UV durante 40 minutos. Cuando se detuvo la irradiación de luz UV, ambos sistemas se mantuvieron en la oscuridad. Se detectó una disminución en el MMA de 8 ± 1 y 6 ± 1 , respectivamente (Figura 4.9). El comportamiento observado ha sido previamente informado para otros azobencenos.^{17, 18} Se ha explicado considerando que en general las moléculas de los isómeros *E* de los azobencenos poseen un momento dipolar cero mientras que las de los isómeros *Z* muestran un aumento de alrededor de 4 Debye, en muchos casos.²³ Por lo tanto, el aumento del momento dipolar neto molecular en la configuración *Z*, incrementaría su solubilidad en la subfase (medio acuoso), y la pérdida de moléculas de **4A (Z)** estaría reflejada en una reducción del área de la monocapa. A pesar que no pudimos cuantificar el porcentaje de fotoisomerización, estos resultados demuestran que las monocapas de **4A (E)** pueden ser perturbadas por exposición a la luz UV.

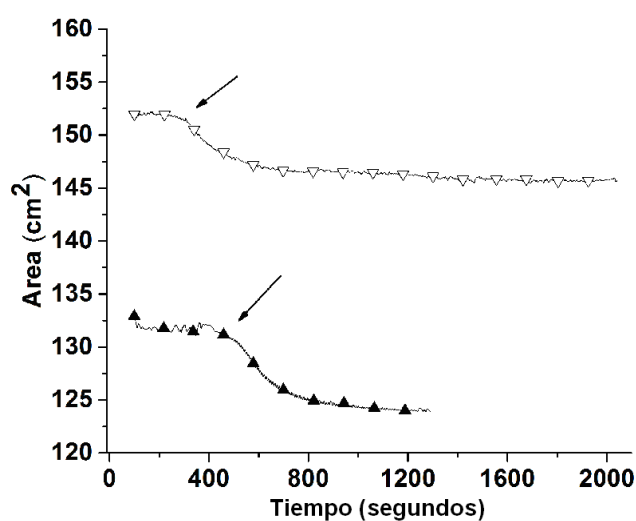


Figura 4.9 Fotomodulación de las monocapas de **4A (E)** mantenidas a 2mN (∇) y 10 mN/m (▲). La figura muestra curvas representativas de las áreas iniciales de las monocapas registradas a presiones superficiales constantes (2 y 10 mN/m, respectivamente) antes y después de la irradiación con luz UV. Las flechas indican el comienzo de la irradiación con luz UV.

4.5 Comportamiento interfacial de 4A integrado a una biomembrana modelo

El lípido comercial Lipoid s75™ fue elegido para ser utilizado como un biomimético de membrana. Lipoid s75™ está compuesto por un 9.8% de fosfatidiletanolamina y un 2.1% de lisofosfatidilcolina; además también forman parte de su composición los siguientes ácidos grasos: palmítico (17%–20%), esteárico (2%–5%), oleico (8%–12%), linoleico (58%–65%) y

linolénico (4%–6%).²⁵ Debido a su complejidad estructural, es considerado un modelo adecuado de membrana biológica.²⁶ Se evaluó **4A** integrado en Lipoid s75™, inicialmente con el objetivo de estimar la capacidad del anfifilo de mezclarse con una biomembrana modelo; para posteriormente analizar la utilidad de **4A** como sonda en membranas reales.

4.5.1 *Monocapas de Langmuir de la mezcla entre 4A y un biomimético de membrana*

Lipoid s75™ fue dispuesto en la interfase aire/agua, en estado puro y en mezclas separadas con **4A (E)** y **4A (Z)** (20mol%). En todos los casos, las isothermas de compresión mostraron una pendiente suave de acuerdo a un comportamiento líquido expandido (LE) a presiones superficiales bajas (véase el inserto de la Figura 4.10). El comienzo de una transición LE-LC se observa sólo para la mezcla con **4A (Z)** a 12 mN/m, aproximadamente. El valor del módulo de compresibilidad para **Lipoid s75™** puro fue menor (~ 45 mN/m) que los valores de máxima presión alcanzados por las monocapas formadas por las mezclas de **Lipoid s75™/4A (E)** y **Lipoid s75™/4A (Z)**, que fueron similares (~ 70 mN/m) (Figura 4.10). Este aumento denotaría que **4A** confirió a la membrana un carácter más condensado, lo cual era esperable considerando la rigidez molecular del azoanfifilo y su carácter de tipo sólido en la interfase cuando se lo estudió en forma pura. Curiosamente, por debajo de la concentración utilizada de **4A** (20% en moles), el lípido no mostró una variación significativa del comportamiento interfacial. Teniendo en cuenta la complejidad del sistema, decidimos evaluar adicionalmente **Lipoid s75™/4A** en solución a fin de detectar otros cambios en la membrana de **Lipoid s75™**, promovidos por la presencia de **4A**.

²⁵ M. Gibis, N. Rahn, J. Weiss, 'Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed' (2013) 5 *Extract. Pharmaceuticals* 421.

²⁶ T. Delmas, A. C. Couffin, P. A. Bayle, F. de Crecy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette, I. Texier, 'Preparation and Characterization of Highly Stable Lipid Nanoparticles with Amorphous Core of Tuneable Viscosity' (2011) 360 *J. Colloid Interface Sci.* 471.

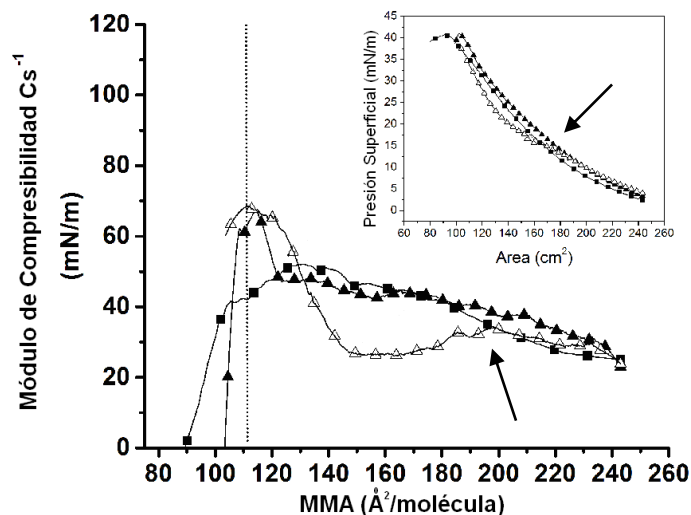


Figura 4.10 Módulo de compresibilidad de una monocapa representativa compuesta por **Lipoid s75/4A (E)** (80:20 mol %) (\blacktriangle), **Lipoid s75/4A (Z)** (80:20 mol %) (\blacktriangle), y **Lipoid s75 puro** (\blacksquare), en función del empaquetamiento molecular en la superficie. El inserto muestra las isoterms de compresión utilizadas para calcular el módulo de compresibilidad. Las flechas indican el comienzo de la fase más condensada. Las curvas mostradas fueron elegidas de un set de duplicados que difieren en menos de $2 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

4.5.2 Fotoisomerización de membranas vesiculares mixtas

Con el objeto de estudiar la capacidad de **4A** de perturbar una membrana modelo a través de la fotoisomerización, fueron obtenidas membranas vesiculares de **Lipoid s75TM** solo y en presencia de **4A (E)**, por el método de evaporación - hidratación.²⁷ Luego de la iluminación con luz UV de la mezcla **Lipoid s75TM/4A (E)** en agua, se observó un cambio de color de amarillo a anaranjado en la dispersión (similar al cambio de color detectado tras la iluminación UV de **4A (E)** puro en cloroformo). La fotoisomerización de **Lipoid s75TM/4A** procedió de manera similar a la ocurrida para **4A** puro en cloroformo (comparar Figura 3.2C, de la sección 3.5.1, con Figura 4.11A). La posición del máximo de absorción de la transición π - π^* de **4A (E)** centrada en 358 nm, es característica del monómero (E), mostrando que el azoanfífilo está bien mezclado entre los lípidos, inhibiendo la formación de agregados H en la biomembrana y permitiendo una fotoisomerización completa.^{3, 6b} Después de la iluminación UV, el máximo de absorción correspondiente a la transición π - π^* se desplazó a 323 nm, y la banda de la transición n - π^* a 450 nm correspondiente al isómero (Z) aumentó su intensidad. En este caso fue posible estimar un equilibrio fotoestacionario significativamente alto Z:E (10:90), en comparación con resultados previamente documentados, como por ejemplo, el sistema estudiado por Moss y Jiang,

²⁷ A. Jesorka y O. Orwar, 'Liposomes: technologies and analytical applications' (2008) *1 Annual review of analytical chemistry* 801.

conformado por un lípido iónico azobenceno de una única cadena de pseudo-glicerilo, integrado en una membrana vesicular de fosfolípidos (35:65 en el equilibrio fotoestacionario).²⁸

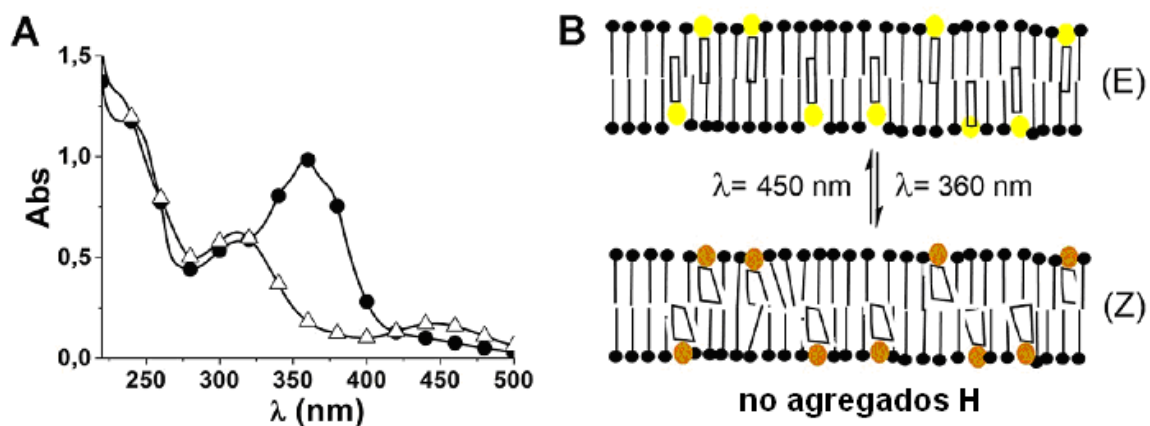


Figura 4.11 A) Espectro de Absorción UV-Vis de **4A** antes (●) y después (Δ) de la irradiación con luz UV en la membrana vesicular. **B)** Representación esquemática de **4A (E)** en amarillo y **4A (Z)** en anaranjado integrados en la biomembrana modelo.

4.5.3 Cambios físicos de la membrana biomimética promovidos por 4A

Las dispersiones vesiculares multilamelares²⁹ descritas anteriormente se observaron en un microscopio óptico de luz polarizada, bajo polarizadores cruzados. Debido a la complejidad de los sistemas, todos los experimentos de POM se realizaron a 25 °C, temperatura a la cual las fases lamelares de PC son favorecidas.^{30, 31} En efecto, durante la dispersión de Lipoid s75™ puro en agua se observó la formación de figuras de mielina liotrópicas, que son microestructuras tubulares multilamelares³² (Figura 4.12A). Por otro lado, las mezclas de **Lipoid s75™/4A (E)** y **Lipoid s75™/4A (Z)** mostraron dos patrones liotrópicos diferentes pero muy complejos, que se asemejan a las mesofases de tipo laminar. Es importante destacar que la presencia de ambas isoformas de **4A** en la mezcla inhibió la formación de las figuras de mielina³³ (Figura 4.12B y C). A este respecto hipotetizamos que la incorporación de **4A** a la estructura del Lipoid s75™ rompería

²⁸ R. A. Moss, W. Jiang, 'Cis/Trans Isomerization in Azobenzene Chain Liposomes' (1995) 11 *Langmuir* 4217.

²⁹ La fase lamelar se refiere generalmente al empaquetamiento de moléculas anfifílicas, de cabeza polar y cola hidrocarbonada larga apolar, en un entorno polar. Se presenta como láminas de bicapas separadas entre sí por el solvente polar.

³⁰ V. Luzzati, T. Gulik-Krzywicki, A. Tardieu, 'Polymorphism of Lecithins' (1968) 218 *Nature* 1031.

³¹ A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, 'Structure and Polymorphism of the Hydrocarbon Chains of Lipids: A Study of Lecithin-Water Phases' (1973) 75 *J. Mol. Biol.* 711.

³² I. Sakurai, Y. Kawamura, 'Growth Mechanism of Myelin Figures of Phosphatidylcholine' (1984) 777 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 347.

³³ K. Peddireddy, P. Kumar, S. Thutupalli, S. Herminghaus, C. Bahr, 'Myelin Structures Formed by Thermotropic Smectic Liquid Crystals' (2013) 29 *Langmuir* 15682.

la estructura de mielina tubular propia del lípido, originando la formación de pequeñas láminas plegadas llamadas lamelas, que en algunos casos se repliegan sobre sí mismas, tomando una disposición circular que recibe el nombre de esferulita^{34,35} (Figura 4.13).

³⁴ P. Simard, D. Hoarub, M. N. Khalida, E. Rouxa, J. C. Leroux, 'Preparation and in Vivo Evaluation of PEGylated Spherulite Formulations' (2005) 1715 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 37.

³⁵ G. Lugito, E. M. Woo, 'Lamellar Assembly Corresponding to Transitions of Positively to Negatively Birefringent Spherulites in Poly(ethylene Adipate) with Phenoxy' (2013) 291 *Colloid Polym. Sci.* 817.

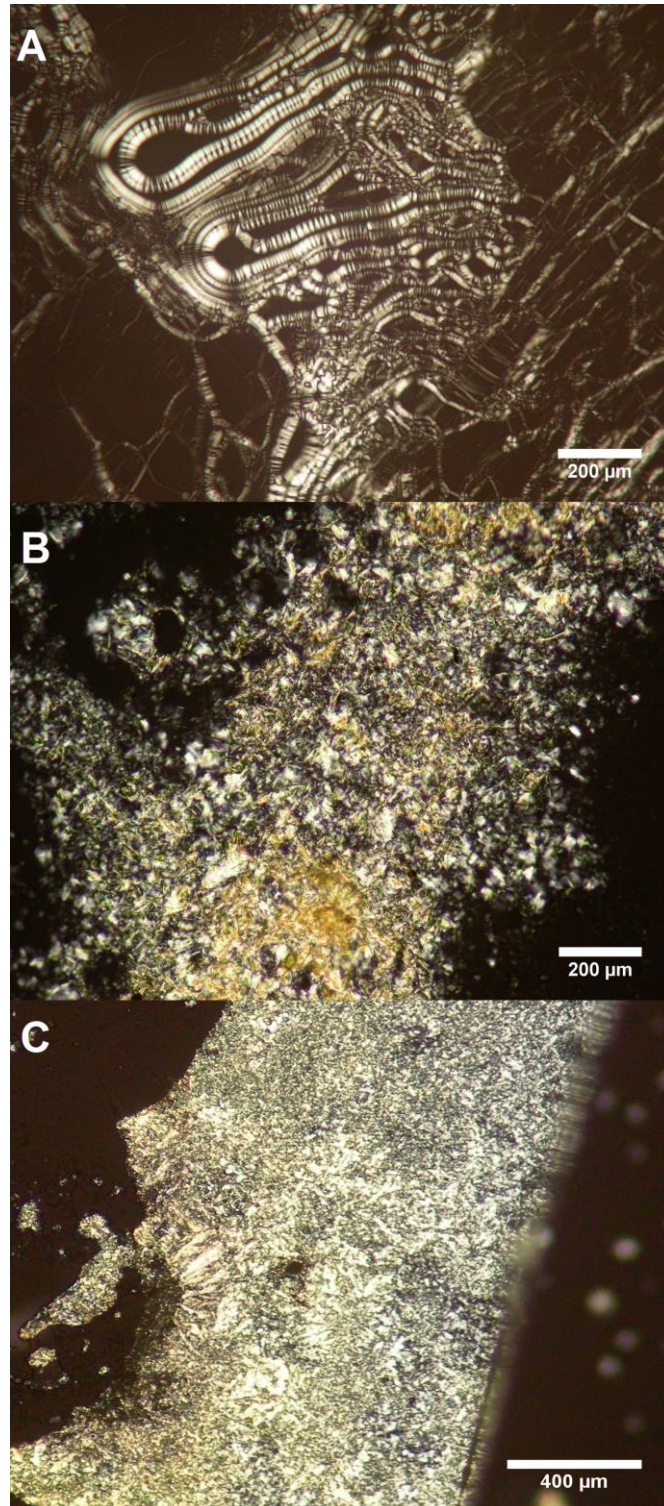


Figura 4.12 Micrografías POM (polarizadores cruzados) de una dispersión de la membrana vesicular a 25°C de A) Lipoid s75™ puro, B) mezcla de Lipoid s75™/4A (E) (80:20 mol%), C) mezcla de Lipoid s75™/4A (Z) (80:20 mol%). Todas las dispersiones fueron realizadas a una concentración de 2.8 mg/ mL.

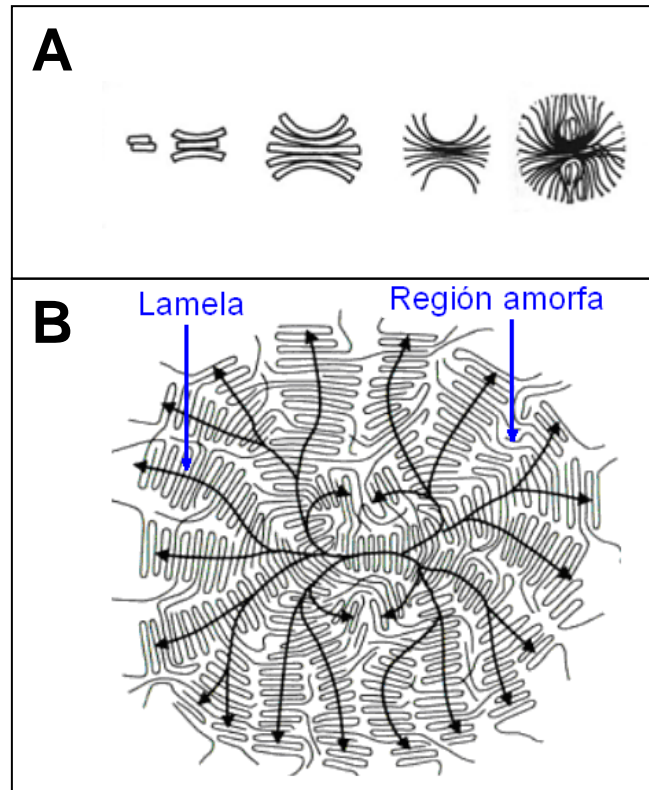


Figura 4.13 Esquema modelo de una esferulita. A) Etapas de formación que permiten apreciar el plegamiento de las lamelas. B) Esferulita madura mostrando la disposición de las lamelas entre las regiones amorfas. Las flechas negras indican la dirección de la alineación molecular.³⁶

Los experimentos de DSC realizados a las membranas vesiculares multilamelares puras de Lipoid s75™, mostraron una temperatura de transición no cooperativa (T_m) de ~ 58 °C (Figura 4.14B), que en presencia de 20% en moles de **4A (E)**, se incrementó a 100 °C (Figura 4.14C), evidenciando que **4A (E)** transfiere su rigidez estructural al sistema lipídico. Después de la iluminación con luz UV, el valor de T_m fue desplazado a ~ 80 °C (Figura 4.14D), concluyendo que la disminución de la temperatura de transición térmica que induce **4A (Z)** se debería a la geometría curvada del isómero Z. Probablemente, ambos isómeros **4A (E)** y **4A (Z)** se insertan con su cabeza hidroxilica longitudinal cerca de la cabeza lipídica polar y parcialmente inmovilizan aquellas regiones de las cadenas hidrocarbonadas más próximas a los grupos polares de las cabezas, efecto similar al estimado en la interacción del colesterol con los lípidos. Asimismo, los picos anchos obtenidos por DSC no permiten un cálculo preciso de los parámetros termodinámicos, sin embargo, evidencian que la transición es no cooperativa, lo que es

³⁶ Materialschemist - Own work (transfer my upload from en.wiki), CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=16445820>

esperable para sistemas complejos, como el Lipoid s75TM.³⁷ Sumado a ello, recientemente se describió que en las fases de gel inclinadas (tilted), tienden a formarse espontáneamente figuras complejas, incluso en membranas que contienen sólo un componente lipídico singular, dando lugar a transiciones no cooperativas durante ese proceso.³⁸

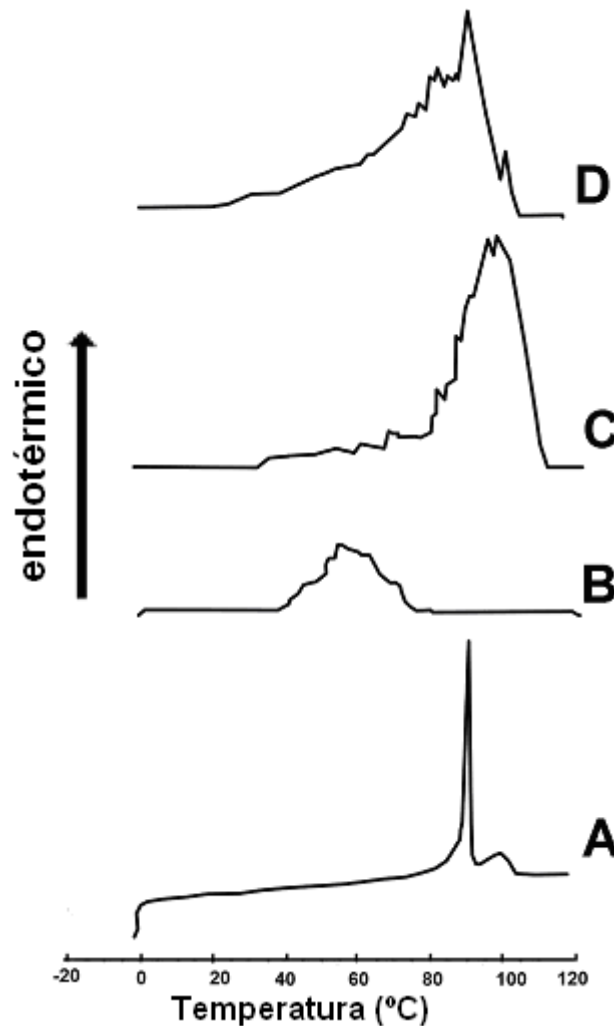


Figura 4.14 Termogramas de DSC. Desde abajo hacia arriba: (A) **4A** sólido*; (B) dispersión multilamelar vesicular de **Lipoid s75**; (C) dispersión tipo laminar de la mezcla **Lipoid s75/4A (E)** (80:20 mol %); (D) dispersión tipo laminar de la mezcla **Lipoid s75/4A (Z)** (80:20 mol %). Todas las dispersiones fueron realizadas a una concentración de 2.8 mg/mL. * Transiciones de mesofases: Cr-SmC a 91.67 °C ($\Delta H = 88.10 \text{ J g}^{-1}$); SmA-SmC-I a 107.28 °C ($\Delta H = 33.77 \text{ J g}^{-1}$). El comportamiento termotrópico de 4A puro se describió en la sección 3.6.2.

³⁷ R. Mc. Elhaney, 'The Use of Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis in Studies of Model and Biological Membranes' (1982) 30 *Chem. Phys. Lipids* 229.

³⁸ L. S. Hirst, A. Ossowski, M. Fraser, J. Geng, J. V. Selinger, R. L. B. Morphology Transition in Lipid Vesicles due to in Plane Order and Topological Defects (2013) 110 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 3242.

4.5.4 *Penetración en una membrana modelo: monocapas de Gibbs*

El paso final hacia el análisis del potencial uso de **4A** como molécula apta para el fotocontrol de forma remota en membranas reales, es el estudio de la capacidad de penetrar una monocapa altamente compacta. Con este fin, se obtuvieron monocapas de Gibbs de **4A (E)** y **4A (Z)** en una superficie libre para evaluar el aumento de la presión superficial tras inyectar por debajo de la subfase el correspondiente isómero.¹³ Las presiones alcanzadas fueron ~ 25 mN/m para **4A (E)** y 20 mN/m para **4A (Z)**, a una concentración de 3,20 μ M y 6,39 μ M, respectivamente (Figura 4.15A). Asimismo, al analizar el comportamiento de penetración de **4A (E)** y **4A (Z)** en una monocapa preformada de Lipoid s75TM, se observó que ambos isómeros fueron capaces de penetrar en la monocapa lipídica a todas las presiones superficiales iniciales testeadas (Figura 4.15B). Los valores reportados son para monocapas separadas, de diferentes presiones superficiales iniciales, obtenidos tras la adición de **4A (E)** y **4A (Z)**, respectivamente. Marsh ha demostrado que la mejor correspondencia entre las propiedades de las bicapas lipídicas sintéticas puras y las de las membranas biológicas, debido a la gran diversidad de estas últimas, se obtiene cuando se trabaja con monocapas a una presión superficial de 30-35 mN/m.³⁹ Más recientemente, se demostró la equivalencia entre bicapas y monocapas de lípidos puros mediante microscopía de fluorescencia por excitación de multifotón.⁴⁰ Los autores informaron que la equivalencia monocapa-bicapa es factible cuando la presión lateral de la monocapa es de 26-28 mN/m y de 28-31 mN/m para DOPC y DPPC, respectivamente. Nuestros experimentos mostraron que **4A (E)** penetra en la monocapa lipídica hasta una presión máxima extrapolada de ~ 37 mN/m, mientras que **4A (Z)** alcanza el valor máximo de corte a ~ 43 mN/m. Los valores máximos extrapolados obtenidos están en el rango de otras moléculas con capacidad de penetración, como la δ -lisina (33 mN/m) y la melitina (43 mN/m), ambos valores observados en su interacción con una biomembrana lipídica reconstituida de eritrocitos de oveja.⁴¹

³⁹ D. Marsh, 'Lateral Pressure in Membranes' (1996) 1286 *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* 183.

⁴⁰ J. Brewer, J. B. De la Serna, K. Wagner, L. A. Bagatolli, 'Multiphoton Excitation Fluorescence Microscopy in Planar Membrane Systems' (2010) 1798 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1301.

⁴¹ M. Bhakoo, T. H. Birkbeck, J. H. Freer, 'Interaction of Staphylococcus Aureus Delta.-Lysin with Phospholipid Monolayers' (1982) 21 *Biochemistry* 6879.

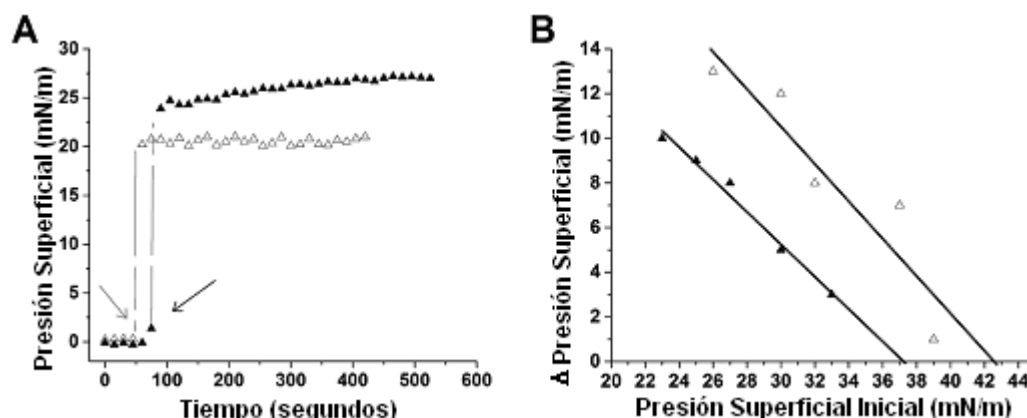


Figura 4.15 (A) Monocapas de Gibbs de **4A (E)** (\blacktriangle) y **4A (Z)** (\triangle) formadas por adsorción a una subfase descubierta de aire / solución salina. Las curvas son representativas de tres experimentos desarrollados en series independientes. Las flechas indican el tiempo de inyección en la subfase de **4A (E)** (negro) y **4A (Z)** (gris), respectivamente. (B) Valores de corte extrapolados de curvas de penetración de **4A (E)** (\blacktriangle) y **4A (Z)** (\triangle) en monocapas de Lipoid s75 a diferentes presiones superficiales iniciales (mN/m). Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes. La concentración de la subfase final fue de $3.20 \mu\text{M}$ para **4A (E)** y $6.39 \mu\text{M}$ para **4A (Z)**.

Se ha informado previamente que la capacidad de penetración de los anfifilos depende del tamaño del agregado.^{42, 43} Nuestros resultados sugieren que las moléculas de **4A (Z)** forman agregados más pequeños que los del **4A (E)** a las concentraciones evaluadas y, por lo tanto, el equilibrio superficie-subfase es mejor. Estos resultados, sumados a los altos valores de corte obtenidos en las monocapas de Gibbs, muestran que **4A** se comporta como un potencial agente penetrador de membranas preformadas, siendo promisoria su utilización en una membrana celular.

4.6 Conclusión

En conclusión, se proporcionó evidencia experimental de que **4A** es una molécula capaz de ser controlada ópticamente en la interfase aire/líquido, en forma pura y en mezclas con Lipoid s75TM (Figura 4.16). La organización supramolecular del anfifilo **4A** puro en la interfaz aire/líquido es compleja, y será estudiado más profundamente a través de experimentos de formación de películas de Langmuir-Blodgett. Pudimos determinar que **4A** se integra

⁴² M. Mottola, N. Wilke, L. Benedini, R. G. Oliveira, M. L. Fanani, 'Ascorbyl Palmitate Interaction with Phospholipid Monolayers:

Electrostatic and Rheological Preponderancy' (2013) 1828 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2496.

⁴³ L. Benedini, M. L. Fanani, B. Maggio, N. Wilke, P. Messina, S. Palma, P. Schulz, 'Surface Phase Behavior and Domain Topography of Ascorbyl Palmitate Monolayers' (2011) 27 *Langmuir* 10914.

4A (E) y **(Z)** fueron capaces de penetrar en una biomembrana altamente empaquetada, mostrando su potencial como sondas externas en sistemas reales. Estos resultados son promisorios para la potencial utilización de **4A** en el fotocontrol de la translocación de otras moléculas a través de membranas lipídicas.⁴⁴

⁴⁴ S. C. Sebai, D. Milioni, A. Walrant, I. D. Alves, S. Sagan, C. Huin, L. Auvray, D. Massotte, S. Cribier, C. Tribet, 'Photocontrol of the Translocation of Molecules, Peptides, and Quantum Dots through Cell and Lipid Membranes Doped with Azobenzene Copolymers' (2012) 51 *Angew. Chem., Int. Ed.* 2132.

Capítulo V

Síntesis de Nanoazovesículas funcionales de 4A

5.1 Planteamiento y Diseño

Las técnicas de autoensamblado dirigido han surgido como una estrategia poderosa para obtener sistemas funcionales, controlados por las condiciones del proceso de síntesis.¹ En general, una de las técnicas más sencilla para obtener estos sistemas o materiales avanzados es la técnica de Autoensamblado Controlado por Evaporación (EISA).² Originalmente, esta técnica consiste en la evaporación controlada del disolvente bajo rotación a vacío, permitiendo la concentración del anfifilo y la formación de una fina mesoestructura organizada en una película orgánica homogénea. Una vez que la película delgada se hidrata a la temperatura de transición del anfifilo, puede producirse la formación de nanoestructuras en el agua. Mediante esta metodología, se construyen sistemas vesiculares tales como liposomas y niosomas.³ Sin embargo, al momento de obtener vesículas que respondan a la luz como estímulo, del tipo fotoliposomas, se ha empleado una combinación de lípidos y derivados de azobenceno.⁴ Si, bien en literatura hay ejemplos de micelas fotomodulables basados en dendrones con grupos azobencenos⁵ y de vesículas fotomodulables basados en azobencenos con una cola polar de 4 átomos de carbono⁶, ambos sistemas se construyen a partir de la autoorganización espontánea de estos anfifilos en agua, normalmente a concentraciones muy bajas, limitando así su utilización en sistemas reales. El principal problema se debe a la baja CAC de estos sistemas, por ser de naturaleza hidrofóbica. Después de una extensa búsqueda bibliográfica, no hemos

¹ a) J. L. Jimenez Blanco, at.at., 'Trehalose-based Janus cyclooligosaccharides: the "Click" synthesis and DNA-directed assembly into pH-sensitive transfectious nanoparticles' (2016) 52 *Chem. Comm.* 10117. b) A. Nikoubashman, V. E. Lee, C. Sosa, R. K. Prud'homme, R. D. Priestley y A. Z. Panagiotopoulos, 'Directed Assembly of Soft Colloids through Rapid Solvent Exchange' (2016) 10 *ACS Nano* 1425. c) M. D. Kim, S. A. Dergunov, E. Pinkhassik, 'Directed Assembly of Vesicle-Templated Polymer Nanocapsules under Near-Physiological Conditions' (2015) 31 *Langmuir* 2561.

² a) C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger y H. Fan 'Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy' (1999) 11 *Adv. Mater. C.* 579. (b) D. Grosso, F. Cagnol, G. J. de A. A. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois y C. Sanchez, 'Fundamentals of mesostructuring through evaporation-induced self-assembly' (2004) 14 *Adv. Funct. Mater.* 309; (c) W. Han y Z. Lin, 'Learning from "Coffee Rings": Ordered Structures Enabled by Controlled Evaporative Self-Assembly' (2012) 51 *Angew. Chem. Int.*, 1534.

³ a) F. M. Menger y K. Gabrielson, 'Cytomimetic organic chemistry: early developments' (1995) 34 *Angew. Chem. Int. Ed.* 2091. b) P. Walde, H. Umakoshi, P. Stano y F. Mavelli, 'Emergent properties arising from the assembly of amphiphiles. Artificial vesicle membranes as reaction promoters and regulators' (2014) 50 *Chem. Commun.* 10177. c) S. Gupta, R. Tyagi, V. Parmar, S. Sharma y R. Haag, 'Polyether based amphiphiles for delivery of active components' (2012) 53 *Polymer* 3053. d) E. Soussan, S. Cassel, M. Blanzat y I. Rico-Lattes, 'Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers' (2009) 48 *Angew. Chem. Int. Ed.* 274.

⁴ Z.-K. Cui, T. Phoeung, P.-A. Rousseau, G. Rydzek, Q. Zhang, C. G. Bazuin y M. Lafleur, 'Nonphospholipid Fluid Liposomes with Switchable Photocontrolled Release' (2014) 30 *Langmuir* 10818.

⁵ Haag et.al. 'Photoresponsive amphiphiles based on azobenzene-dendritic glycerol conjugates show switchable transport behavior' (2011) 47 *Chem. Comm.* 6584.

⁶ T. Shang, K. A. Smith, T. A. Hatton, 'Self-Assembly of a Nonionic Photoresponsive Surfactant Under Varying Irradiation Conditions: A Small-Angle Neutron Scattering and Cryo-TEM Study' (2006) 22 *Langmuir* 1436.

encontrado un reporte de **autoensamblaje dirigido** de derivados de azobenceno pequeños puros en agua, ni de otros sistemas π .

En los capítulos anteriores, hemos demostrado que el compuesto **4A** eficientemente fotomodula la compresibilidad, la transición térmica y la morfología de una membrana modelo como el Lipoid s75™. Asimismo, esta molécula tiene una serie de propiedades estructurales y físicas que lo hacen ideal para utilizarlo como molécula funcional por si misma (Figura 5.1) y obtener por primera vez *vesículas no-iónicas de azocompuestos funcionales o azoniosomas puros*.

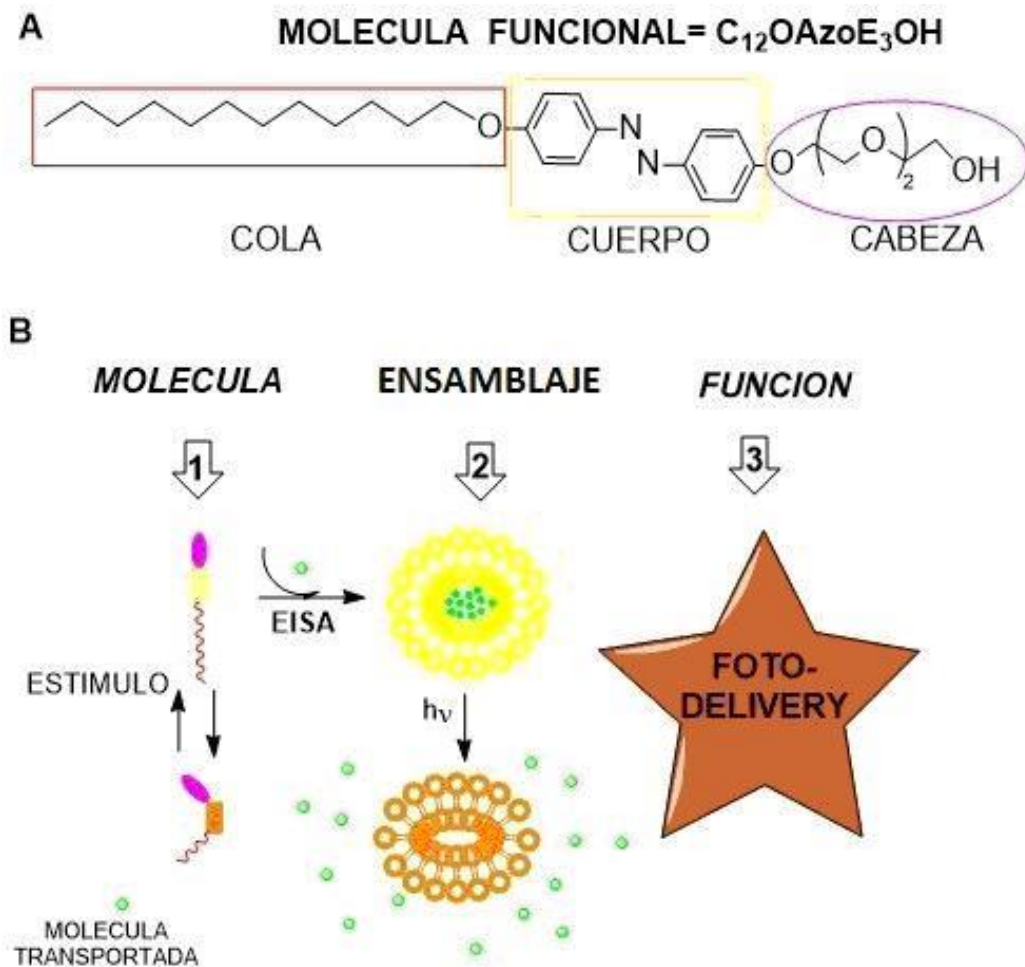


Figura 5.1 A) Azobenceno no iónico fotosensible empleado en este estudio como molécula funcional. **B)** Ilustración de las vesículas fotomodulables hipotéticamente obtenidas por ensamblaje dirigido de una molécula funcional.

En primer lugar, la longitud de la cabeza es apropiada ya que aumentaría el número mínimo de agregación, para el cual la formación de vesículas estaría geoméricamente permitida.⁷ Segundo, la cola hidrofóbica de 12 carbonos favorecería la formación de la bicapa.⁷ Tercero, hemos demostrado que **4A** forma una mesofase Esméctica C, la cual fue confirmada recientemente por RDX.⁸ Finalmente, en la interface, hemos demostrado (sección 4.2.1) que el módulo de compresibilidad de **4A** puro, es decir la elasticidad de flexión (bending elasticity), disminuye desde 100 mN/m en la conformación (E) hasta circa 60 mN/m luego de la transformación E-Z promovida por la luz. En otras palabras, el cambio efectivo en el área de sección de **4A** debido a la fotoisomerización, conlleva a un cambio substancial de las propiedades interfaciales y probablemente este cambio ocurra también en la solución en el estado agregado.⁷

Por estas características, hipotetizamos que la dirección del autoensamblado de **4A** utilizando EISA nos permitiría obtener azovesículas puras en agua. Si este compuesto fuera capaz de formar una mesofase liotrópica lamelar en un solvente orgánico, como cloroformo⁹, y luego de la evaporación a temperatura ambiente, fuese posible transferir estas laminas al medio acuoso, debido a la curvatura y al efecto hidrofóbico, podrían formarse vesículas de **4A** en agua, de manera similar a lo que ocurre con los lípidos en el caso de la síntesis de liposomas.

5.2. Comportamiento liótrópico: breve introducción y descripción del Método de Penetración de Lawrence

Muchos compuestos anfífilicos, presentan comportamiento LC no solo por efecto de la temperatura sino también en presencia de diferentes solventes. A este comportamiento dual se lo define como anfitrópico. Teniendo en cuenta la naturaleza anfífilica del compuesto **4A**, es posible que presente además de sus características de LC termotrópico (Sección 3.6.2), un comportamiento LC en presencia de solvente, es decir, que sea también un LC liotrópico.

En general, aquellos compuestos que al dispersarse en un solvente presentan características intermedias entre su estado sólido cristalino y su estado líquido desordenado son considerados LC liotrópicos. En un cierto rango de temperatura o a una temperatura fija, este tipo de cristales

⁷ a) J. Israelachvili, J. Mitchell y B. Ninham, 'Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles' (1977) 470 *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 185. b) T. Kunitake y T. Y. Okahata, (1977) 99 *J. Am. Chem. Soc.* 3860.

⁸ X. Tan, R. Zhang, C. Guo, X. Cheng, H. Gao, F. Liu, J. R. Bruckner, F. Giesselmann, M. Prehm and C. Tschierske, 'Amphotropic azobenzene derivatives with oligooxyethylene and glycerol based polar groups' (2015) 3 *J. Mater. Chem. C* 11202.

⁹ M. Lee y Y-S Yoo, 'Supramolecular organization of block oligomers based on rod-shaped mesogen into liquid crystalline assembly' (2002) 12 *J. Mater. Chem.* 2161.

líquidos se forman por efecto del solvente en un determinado intervalo de concentración.¹⁰ Así, normalmente el diagrama de fases de un compuesto que presenta el comportamiento de cristal líquido liotrópico varía principalmente en función de su concentración en un determinado disolvente.

Para analizar las diferentes transiciones de fase de un sistema liotrópico¹¹ de manera simple, rápida y utilizando pequeñas cantidades de material, se utiliza el método de penetración de Lawrence,^{12, 13} que permite detectar varias fases en un único experimento. Este método consiste en la determinación de las fases presentes en sistemas formados por la dispersión de un anfifilo en un solvente particular a una temperatura establecida en un porta y cubre y utilizando un microscopio de luz polarizada. El ensayo se realiza siguiendo los siguientes pasos (Figura 5.2):

1-Colocar el anfifilo entre un porta y un cubre objeto.

2-En el caso de que el anfifilo sea sólido, fundirlo y dejarlo enfriar de manera de homogeneizar la muestra y obtener bordes nítidos.

3-Agregar una gota de solvente en el borde del cubre objeto, de manera de lograr que se ponga en contacto con la muestra por capilaridad. El solvente entra y difunde lentamente produciendo un gradiente de concentración creciente del surfactante hacia el centro de la muestra que permite observar todas las transiciones de fases posibles para ese surfactante a la temperatura de trabajo.

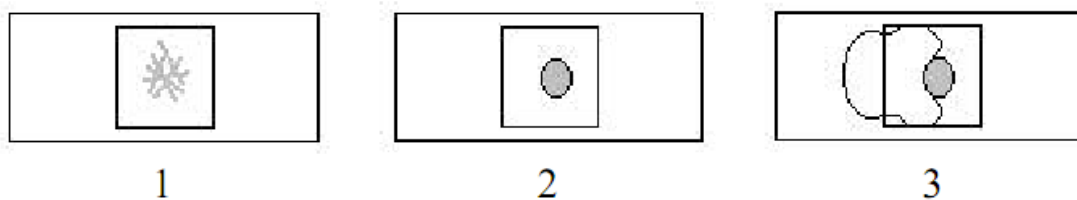


Figura 5.2 Pasos para la preparación de la muestra. Método de penetración de Lawrence.

¹⁰ G. Burducea, 'Lyotropic liquid crystals I. Specific structures' (2004) 56(1) *Romanian Reports in Physics* 66.

¹¹ G. Ungar, X. Zeng, 'Frank-Kasper, quasicrystalline and related phases in liquid crystals' (2005) 1, *Soft Matter* 95.

¹² a) F. Rosevear, 'Liquid crystals: The mesomorphic phases of surfactant compositions.' (1968) 19 *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 581. b) E. S. Blackmore y G. J. T. Tiddy, 'Phase behaviour and lyotropic liquid crystals in cationic surfactant-water systems' (1988) 84 *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1115.

¹³G.Persson, 'Amphiphilic Molecules in Aqueous Solution. Effects of some Different Counterions. The Monoolein/Octylglucoside/Water System. Doctoral Thesis.' (2003) *Umeå University and Mid Sweden University, Sweden*, 15.

Las mesofases se manifiestan como una serie de anillos que exhiben texturas características al ser observadas por POM, que se pueden usar para su identificación.^{14, 15} Las mesofases anisótropas son rápidamente identificadas por sus texturas típicas, mientras que las fases isotrópicas son más difíciles de identificar. La ventaja de esta técnica es la poca cantidad de muestra que emplea y la rapidez con que se puede predecir un diagrama de fase temperatura vs composición. La desventaja es que desconocemos la concentración exacta a la que se forma la mesofase.

Lawrence define también la temperatura de penetración, T_{pen} , como la mínima temperatura para la formación de una mesofase particular.¹⁶ Si bien los sistemas estudiados por esta técnica han sido mayormente de carácter iónico¹⁷, fueron reportadas algunas caracterizaciones ópticas de sistemas polifásicos de surfactantes no iónicos.^{18,19, 20, 21}

5.2.1 Caracterización del comportamiento liotrópico y observación morfológica de 4A

Se llevó a cabo el método de penetración de Lawrence para el anfifilo **4A** utilizando como disolvente cloroformo, a una temperatura de 25°C. En la Figura 5.3 se observa la micrografía obtenida por POM de la difusión del solvente por la derecha de la muestra. Se evidenció un comportamiento polimórfico para **4A** en las condiciones del ensayo, observándose secuencialmente de derecha a izquierda: fase hexagonal inversa, fase cúbica, y fase laminar tipo pre-esméctica.²²

¹⁴ F.B. Rosevear, 'The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents' (1954) 31 *J. Am. Oil Chem. Soc.* 628.

¹⁵ K. Rendall, G.J.T. Tiddy, M.A. Trevethan, 'Optical microscopy and nuclear magnetic resonance studies of mesophases formed at compositions between hexagonal and lamellar phases in sodium n-alkanoate + water mixtures and related surfactant systems' (1983) 79 *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 637.

¹⁶ Lawrence, A.S.c, *en Liquid Crystals*, Brown G.H., ed. Gordon & Breach, London, vol. 1 p.1 (1969).

¹⁷ a) KM McGrath, CJ Drummond, 'Polymerisation of liquid crystalline phases in binary surfactant/water systems' (1996) 274(4) *Colloid Polym Sci* 316. b) K.C. Gouden, P. Ganguli, G.J.T. Tiddy, 'Lyotropic mesophase structure in the system 2-ethylhexyloxy propionate-water' (1992) 96 *J. Phys. Chem.* 4627. c) N.H. Hartstone, A. Stuart, *Crystals and the polarizing Microscope*, Arnold, London (1970). d) S. Fuller, J. Hopwood, A. Rahman, N. Shinde, G.J.T Tiddy, G.S. Attard, O. Howell, S. Sproston, (1992) 12(3) *Liquid Cryst.* 521. e) A.Faure, J. Lovera, P. Grégoire, C. Chachaty, (1985) 82(7/8) *J. Phys. Chem.* 779. f) H.D. Dörfler, M. Knape, (1993) 30(3) *Tenside Surf. Det.* 196.

¹⁸ K.S. Narayan, N. Shinde, G.J.T. Tiddy, 'Studies on sodium ricinoleate. 2. Lyotropic liquid crystals in the sodium ricinoleate/water system' (1992) 96 *J. Phys. Chem.* 5165.

¹⁹ N. Pietschman, A. Lunow, G. Brezesinski, C. Tschierske, F. Kuschel, H. Zschke, 'The first liquid crystalline diol compound which exhibits nematic, smecticA+, and smecticC+ mesophases in the presence of water' (1991) 269 *Colloid Polym. Sci.* 636.

²⁰ F. M. Menger, N. Bakchander, E. Van de Linden, (1991) 113 *J. Am. Chem. Soc.* 1519.

²¹ Gray, P.A. Winsor, *Liquid Crystals and Plastic Crystals*, Eds. Horwood, Chichester (1975).

²² H. Butt y M. Kappl, *Surface and Interfacial Forces*, Wiley-VCH, pag 293 (2010).

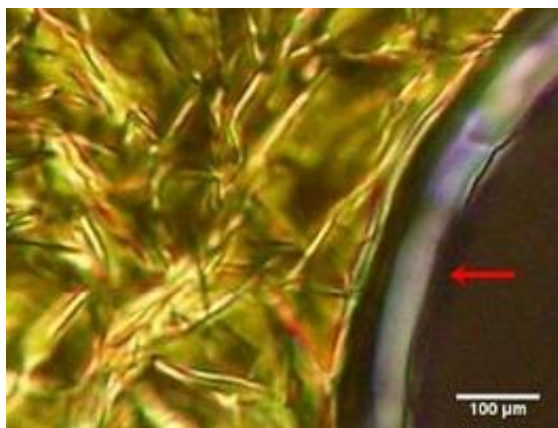


Figura 5.3 Obtención de muestra multifásica laminar de **4A** por el test de penetración de Lawrence (POM). El cloroformo difunde de derecha a izquierda.

Considerando que es un método cualitativo, se llevó a cabo una técnica complementaria para confirmar la presencia de la mesofase lamelar liotrópica a alta concentración. Esta técnica consiste en la formación de un film por evaporación a temperatura ambiente. Se colocó una alícuota de una solución de **4A** en cloroformo (19 mM) sobre vidrio no tratado y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente bajo campana. Se confirmó la formación de la misma fase lamelar anteriormente formada a través de POM.

5.3. Determinación de la Concentración de Agregación Crítica (CAC)

Como la mayoría de los anfífilos aromáticos no iónicos, **4A** presentó extremadamente baja solubilidad en agua a temperatura ambiente. Se decidió determinar la CAC, definida como la concentración por encima de la cual las moléculas se organizan en agregados supramoleculares. Para ello se determinó inicialmente la temperatura de Krafft, conocida como la temperatura límite a partir de la cual puede ocurrir el fenómeno de agregación. Se utilizó DLS a temperatura variable, y espectroscopía UV-Vis para ambas determinaciones (Figura 5.4). La temperatura de Krafft obtenida fue 70°C y la $CAC_{70^{\circ}C}$ determinada fue 0,35 μM.

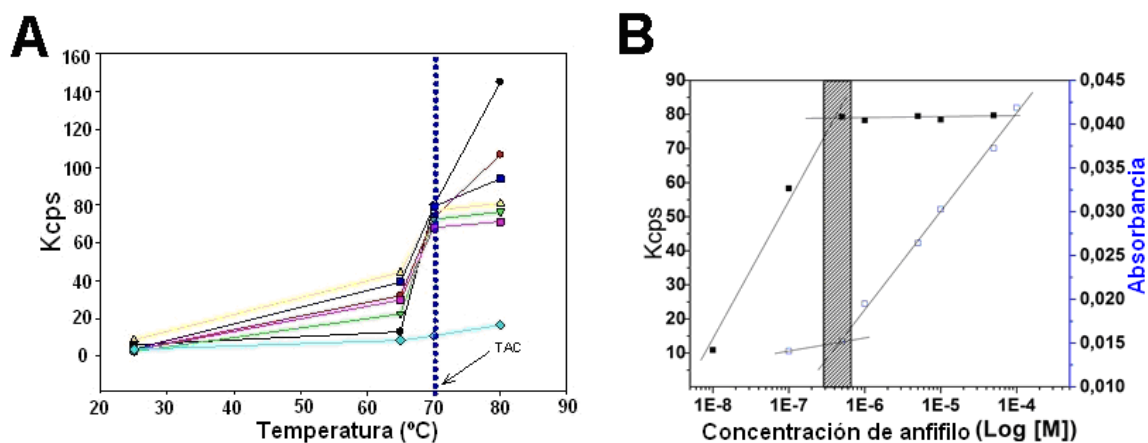
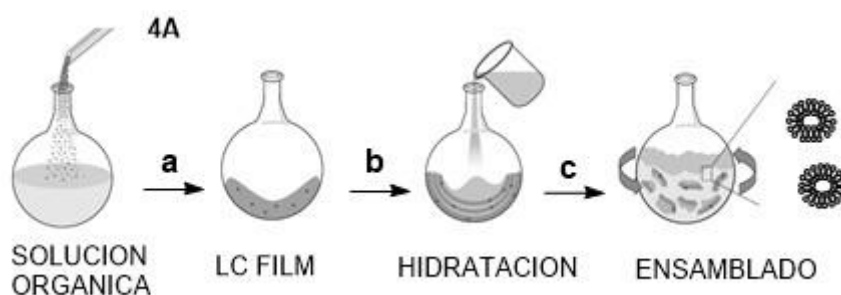


Figura 5.4. (A) Punto de Krafft calculado por DLS. Kilo cuentas por segundo (Kcps) como promedio de la tasa de cuentas (intensidad de dispersión media) en función de la temperatura. (B) CAC obtenida a partir de la correlación de las técnicas DLS y Uv-Vis. La barra gris indica la región de la concentración de agregación crítica.

5.4 Síntesis de agregados por la técnica EISA

El hecho que **4A** forme mesofase lamelar luego de evaporar el cloroformo, junto a su escasa solubilidad en agua a temperatura ambiente, convierten a este compuesto en una excelente molécula para formar vesículas puras utilizando EISA, metodología convencional para la formación de liposomas con lípidos naturales. Así, se promovería la organización molecular de **4A** partir de la obtención de un film delgado (Esquema 5.1) a temperatura ambiente.



Esquema 5.1 Protocolo esquemático de EISA: a) eliminación del solvente vía rotavapor para formar una película de cristal líquido homogéneo, b) hidratación bajo calefacción (70°C) a la temperatura de Krafft, c) agitación y subsecuente envejecimiento por 2 días a 4°C.

Mediante esta metodología, a medida que el líquido fluye fuera de la línea de contacto posibilita la deposición uniforme del soluto sobre el fondo redondo de vidrio. La película del anfifilo se seca completamente para eliminar el disolvente orgánico residual colocando el balón en una bomba de vacío durante la noche. Las etapas siguientes fueron: hidratación a la temperatura de Krafft determinada para **4A** (70 °C), seguida de vigorosa agitación. De esta

manera, las láminas de anfifilo hidratadas se separan de la superficie del balón durante la agitación y se cierran sobre si mismas para evitar la interacción del agua con el grupo central azobenceno y la cola hidrocarbonada, formando grandes vesículas multilaminares (MLV).²³ La estructura de las MLV, análoga a la de una cebolla, presenta múltiples bicapas concéntricas separadas entre sí por una capa de agua (Figura 5.5). El espacio entre las capas está determinado por la composición, con capas de polihidratación que están más juntas que las capas que se separan en base a la repulsión electrostática.²⁴

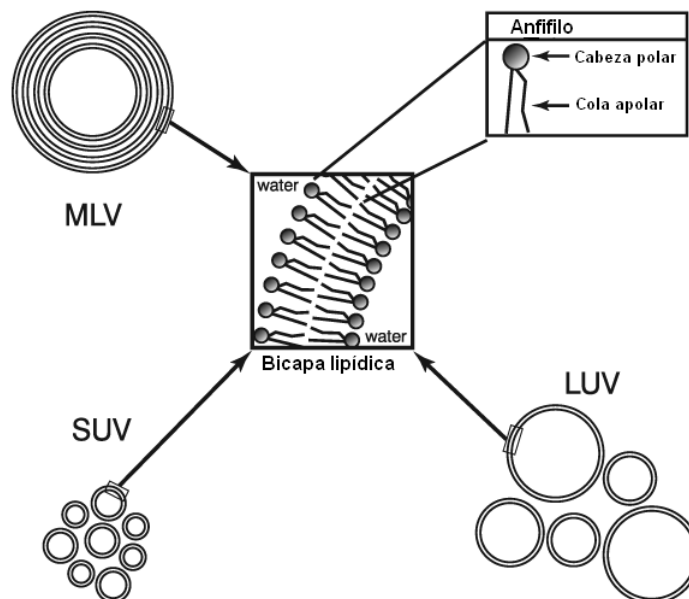


Figura 5.5 Representación esquemática de los diferentes tamaños vesiculares. MLV: 100-5000nm; LUV: 60-500nm; SUV: menor a 60 nm.

En literatura hemos encontrado que es posible producir una suspensión estable de vesículas unilaminares gigantes (GUV) a partir de las MLV obtenidas por incubación/añejamiento durante dos días a 4 °C,²⁵ por lo que llevamos a cabo este protocolo y observamos la presencia de pequeñas nubes densas de vesículas detectadas a simple vista. La reducción del tamaño es posible utilizando sonicación o energía mecánica (extrusión). En este caso utilizamos sonicación para obtener una suspensión de vesículas que caracterizamos por DLS y técnicas microscópicas (mirar secciones 5.5.2 y 5.6.2) de tamaños entre 60 a 200 nm. La dispersión de color amarillo pálido del anfifilo **4A** puro fue estable en el tiempo. Se intentó usar extrusión, sin éxito, ya que

²³ Jr. Frank Szoka y Demetrios Papahadjopoulos, 'Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)', (1980) 9 *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 467.

²⁴ D. D. Lasic 'Liposomes in Gene Delivery', *CRC Press LLC*, (1997).

²⁵ D. Needham, T.J. McIntosh y E. Evans. 'Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers.' (1988) 27 *Biochemistry* 4668.

se generaban vesículas más grandes. No podemos explicar este comportamiento por el momento.

5.5 Caracterización morfológica de los agregados

5.5.1 Caracterización de las vesículas gigantes de 4A

Las MLV obtenidas inicialmente por EISA fueron centrifugadas, el precipitado se colocó entre porta y cubre objetos de vidrio y se observó por POM. La birrefringencia característica de las fases laminares se detectó por microscopía óptica. La fase laminar se observó entre polaroides cruzados en el microscopio óptico con los polarizadores orientados en la direcciones x e y, respectivamente. Pudo visualizarse la mesofase lamelar altamente birrefringente y estructuras globulares multilaminares hacia los bordes, las cuales se notan isotrópicas debido a que se ubican perpendicularmente al eje óptico (Figuras 5.6B).

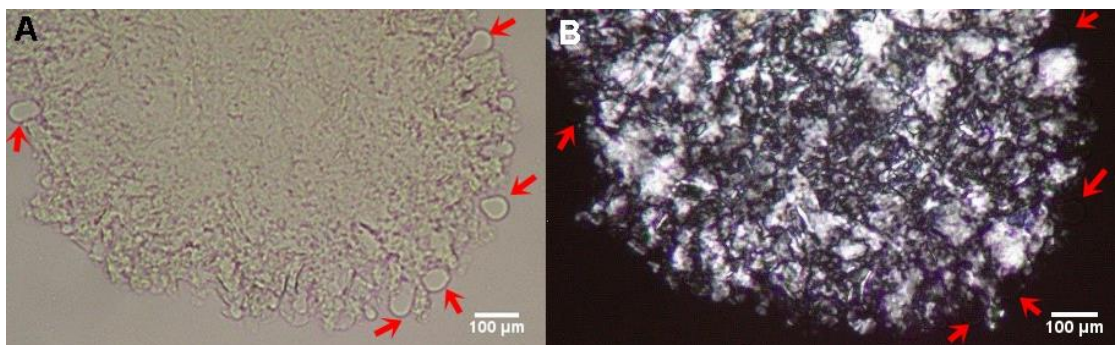


Figura 5.6 Dispersión en agua de agregados vesiculares de **4A (E)** a 25°C, 0.5 mM aproximadamente; A) Microfotografía óptica. B) Microfotografía óptica entre polarizadores cruzados. En ambas, las flechas indican las vesículas multilaminares.

Las vesículas gigantes también fueron analizadas por SEM y DLS, evidenciándose tamaños entre 1 y 10 μm de diámetro. También se pudo observar el interior vacío (Figura 5.7A) confirmando que son vesículas y no nanopartículas con lo que hipotetizamos que podrían servir como transportadores de moléculas hidrofílicas en su interior.

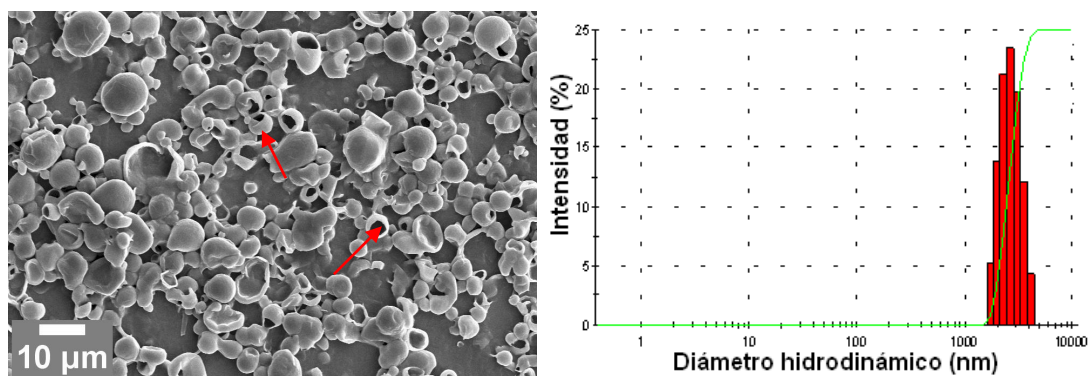


Figura 5.7 A) Microfotografía SEM de vesículas gigantes de **4A** obtenidas por EISA. Las flechas indican el interior vacío de las vesículas. B) DLS de dispersión de vesículas gigantes.

5.5.2 Síntesis y Caracterización de las nanoazovesículas de 4A

Las vesículas gigantes se sonicaron, obteniendo nanovesículas detectadas por TEM. El diámetro promedio de las vesículas fue de $73,3 \pm 0,1$ nm (calculado con desviación standard), observándose una polidispersión de 0,13% (Figura 5.8). Las imágenes fueron adquiridas utilizando acetato de uranilo como sonda para la tinción negativa, sin embargo se obtuvo un mejor contraste de la muestra al llevar a cabo la sonicación junto al colorante de tinción, previo a su fijación por secado. En este experimento, la muestra se sonicó en presencia de 2% de acetato de uranilo (volumen 1: 1) y luego se trató convencionalmente. Este protocolo se empleó para detectar la estructura externa de las vesículas (Figura 5.9).^{7b}

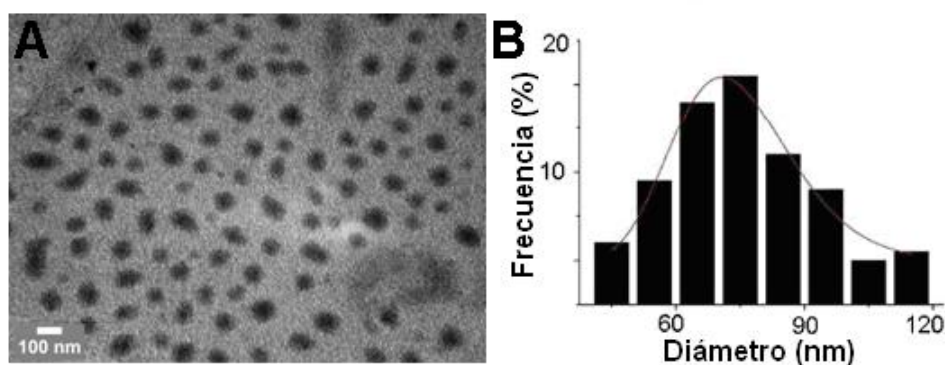


Figura 5.8 A) Microfotografía TEM de nanovesículas de **4A** obtenidas luego de la sonicación de las vesículas gigantes inicialmente sintetizadas. B) Distribución del diámetro de las partículas observado en la imagen A.

Se observó un contraste obvio entre la periferia y el centro en la esfera, característica de las imágenes de proyección de esferas huecas o vesículas (Figura 5.9).

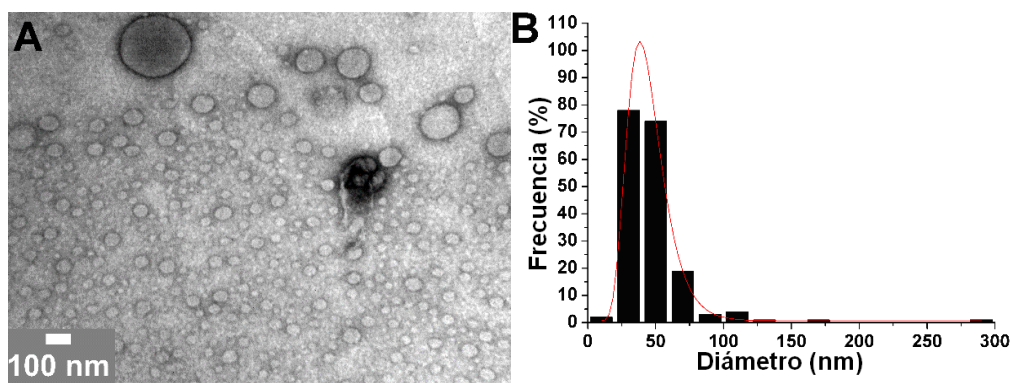


Figura 5.9 Dispersión en agua de vesículas obtenidas por sonicación de **4A (E)** a 25°C, 0.5 mM aproximadamente A) Microfotografía TEM; B) Distribución del diámetro de las partículas observado en la imagen A. El diámetro promedio de las vesículas fue de 42, 56 ± 0,16 nm (calculado con desviación standard), observándose una polidispersión de 0,37%.

5.6 Evaluación de la fotoisomerización de las nanozovesículas de 4A

5.6.1 Evaluación por Espectroscopia de Absorción UV/Vis

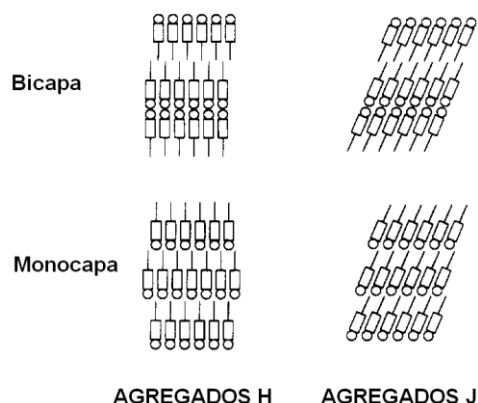
Para el caso particular de los sistemas basados en azobencenos, es posible, estudiar el comportamiento de los agregados formados en agua por análisis del cambio espectral en la absorción UV-visible causada por la interacción mutua de los cromóforos azobenceno de distintas moléculas.²⁶ De acuerdo con el modelo excitón, el cambio espectral puede ser asociado con cuatro diferentes tipos de agregados. Estos son de tipo monomérico, observados en las micelas y en soluciones molecularmente dispersas; de tipo dimérico en el llamado estado cristal-líquido; y los denominados *H*- y *J*-agregados en la fase cristalina.²⁷ El agregado *H* presenta una orientación mutuamente paralela de los cromóforos, cada uno casi perpendicular al plano de la capa (Esquema 5.2). El agregado tipo *J* esta asociado con una orientación altamente inclinada de los cromóforos. En general, los azobencenos son propensos a formar agregados de tipo *J* y de tipo *H*, que poseen espectros característicos de UV-Vis.²⁸ Por esta razón la capacidad de

²⁶ M. Sato, D. Y. Sasaki, M. Isayama, T. Kunitake, 'Interfacial and Bulk Structures of Homologous Series of Azobenzene Amphiphiles Studied by Scanning Tunneling Microscopy and X-ray Diffraction', (1992) *Langmuir* 1893 y citas allí referenciadas.

²⁷ a) M. Kasha, H. R. Rawls, El-Bayoumi Ashraf, 'The exciton model in molecular spectroscopy' (1965) 11 *M. Pure Appl. Chem.* 371. b) V. Czikkely, H. D. Fosterling, H. Kuhn, 'Extended dipole model for aggregates of dye molecules' (1970) 6, *Chem. Phys. Lett.* 11.

²⁸ (a) X. Song, J. Perlstein y D. Whitten, 'Supramolecular Aggregates of Azobenzene Phospholipids and Related Compounds in Bilayer Assemblies and Other Microheterogeneous Media: Structure, Properties, and Photoreactivity' (1997) 119 *J Am. Chem. Soc.* 9144. (b) J. Kuiper y J. Engberts, 'H-aggregation of azobenzene-substituted amphiphiles in vesicular membranes' (2004) 20, *Langmuir* 1152. (c) R. A. Moss y W. Jiang, 'Cis/Trans Isomerization in Azobenzene-Chain Liposomes' (1995) 11 *Langmuir* 4217. (d) J. Kuiper, M. Stuart y J. Engberts, 'Photochemically induced disturbance of the alkyl chain packing in vesicular membranes' (2008) 24 *Langmuir* 426.

fotoconversión de los azobencenos en el estado agregado en agua no resulta trivial, y es difícil de predecir.



Esquema 5.2 Ilustración esquemática de la bicapa y monocapa en los agregados de tipo H y de tipo J. El círculo, la caja y la línea, representan la cabeza polar, el segmento rígido (azobenceno) y la cola hidrofóbica respectivamente.

La organización molecular del grupo azobenceno en los agregados vesiculares obtenidos por sonicación (diámetro promedio $73,37 \pm 0,13$ nm) a los que nos referiremos como *nanoazovesículas*, y la eficacia de su fotoisomerización en agua fue evaluada por espectroscopía UV/Vis. Se observaron las dos bandas correspondientes a la transición $\pi-\pi^*$ de **4A (E)**, una a 260 nm, y la segunda a 311 nm (Figura 5.10). En cloroformo, la segunda banda había sido observada a 358 nm. (Figura 3.2C) El desplazamiento de la banda de 358 nm a 311 nm, hacia la zona del azul del espectro de absorción, es indicativo de una fuerte interacción de los cromóforos y es característico de los agregados tipo *H* presentes en bicapas y micelas cilíndricas.²⁸ Las micelas esféricas no son capaces de formar agregados tipo *H* porque el empaquetamiento es demasiado lábil y los cromóforos no pueden adoptar la configuración requerida en la micela. Esto apoya la formación de nanoazovesículas (*E*) y se correlaciona con la morfología observada por TEM. Después de la irradiación con luz UV por 140 minutos, se produce un desplazamiento hipocrómico de las bandas mencionadas, evidenciando que luego de la fotoisomerización los cromóforos todavía se mantienen como agregados tipo *H*, el estado fotoestacionario (PSS) fue *E:Z* (46:54). Por simplicidad haremos referencia a este estado como nanoazovesículas (*Z*).

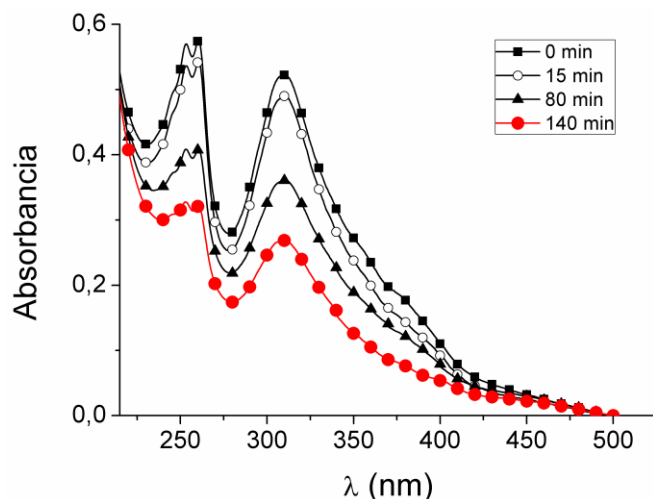


Figura 5.10 Espectro UV-Vis del experimento de irradiación con luz UV de 4A en agua a distintos tiempos de irradiación (0,5 mM, 150 watts).

Las nuevas **nanoazovesículas (Z)** presentaron menor rigidez que las correspondiente (**E**). Las imágenes de TEM de las nanoazovesículas (**Z**) no proporcionaron información sobre el tamaño de las nuevas vesículas, debido a su coalescencia en el grid de microscopía, como puede observarse en la Figura 5.11. Este resultado era esperable si consideramos que en la interfase ambos isómeros *E* y *Z* poseen una diferencia sustancial en la elasticidad de flexión (100 mN/m para 4A (*E*) y 60 mN/m para 4A (*Z*), sección 4.2).

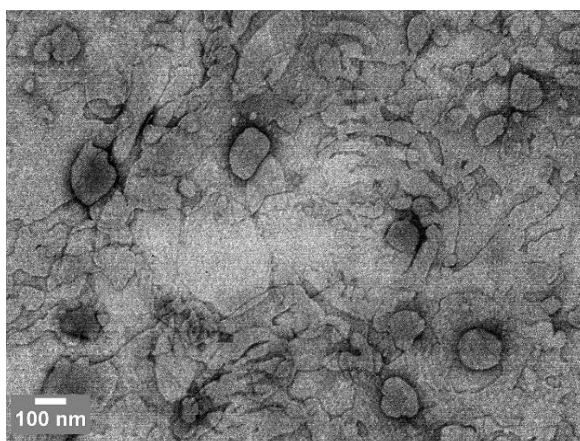


Figura 5.11 Microfotografía TEM de dispersión en agua de agregados vesiculares de 4A (**Z**) a 25°C, 0.5 mM aproximadamente.

El sistema en la configuración **Z** también mostro un comportamiento liquido cristalino, diferente al observado para la configuración **E**, al observarlo por POM y también se vieron las multicapas vesiculares desaparecer en la microscopia con polaroides cruzados como se observa en la Figura 5.12B.

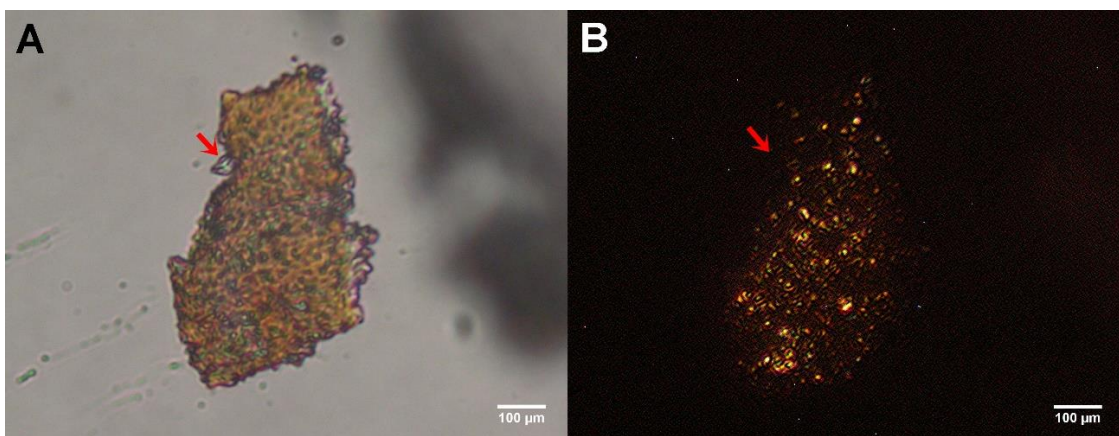


Figura 5.12 Dispersión en agua de agregados vesiculares de 4A (Z) a 25°C, 0.5 mM aproximadamente; **(A)** Microfotografía óptica **(B)** Microfotografía óptica entre polarizadores cruzados. En ambas, las flechas indican las vesículas multilaminares.

La fotoreversión se logró con buenos rendimientos y sin descomposición tras la irradiación con luz blanca por 140 min utilizando un foco convencional (60 watts) (Figura 5.13).

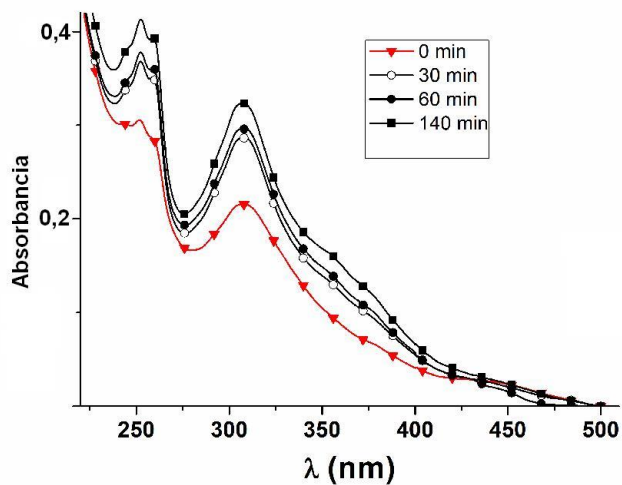


Figura 5.13 Espectro UV-Vis de la fotoreversión de las vesículas (Z) a las vesículas (E) de 4A en agua promovida por luz blanca (60 watts) a distintos tiempos de irradiación.

5.6.2 Evaluación por Dispersión de Luz Dinámica

La fotomodulación de las **nanoazovesículas (E)** fue adicionalmente corroborada mediante mediciones de tamaño de partícula a partir de dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 5.14). Inicialmente, el diámetro hidrodinámico de las nanoazovesículas (E) fue de 166 ± 79 nm y después de la irradiación con luz UV se produjo una contracción del sistema con un diámetro final de 136 ± 41 nm. Esto podría explicarse hipotetizando que el cambio del área efectiva de la

sección transversal de **4A** causado por la fotoisomerización *E-Z*, promovió un cambio en el tamaño y/o forma de las azovesículas.^{6, 7, 29}

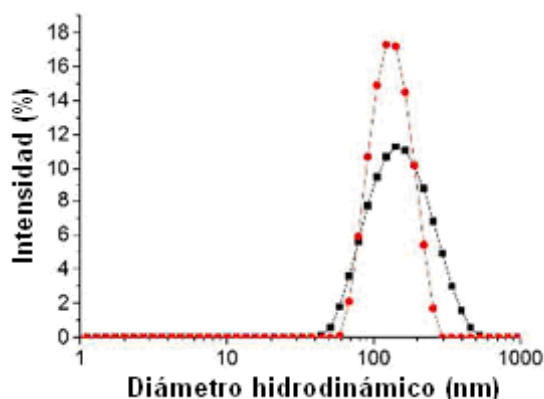


Figura 5.14 Medida de DLS del diámetro hidrodinámico de **4A** antes (●) y después (●) de la irradiación UV en agua (140 min, 150 watts).

5.7 Evaluación de la estabilidad térmica de las nanoazovesículas de 4A

La estabilidad de las nanoazovesículas (*E*) se evaluó a través del análisis de rampas de temperatura ascendentes y descendentes, realizadas por espectroscopía UV-Vis, por monitoreo de tres bandas de absorción seleccionadas. Las bandas λ 305 nm y λ 341 nm, que corresponden a los agregados de tipo *H* de los grupos azobencenos, y la banda a 360 nm correspondiente al azobenceno de tipo "libre" (Figura 5.15). Pudo observarse que luego de calentar las dispersiones acuosas por encima de la temperatura de Krafft y posteriormente enfriarlas a temperatura ambiente, las estructuras se volvieron a formar.

²⁹ (a) Y. Orihara, A. Matsumura, Y. Saito, N. Ogawa, T. Saji, A. Yamaguchi, H. Sakai y M. Abe, ' Reversible release control of an oily substance using photoresponsive micelles' (2001) 17 *Langmuir* 6072, (b) A. Pulido-Companys, R. Albalat, J. Garcia-Amoros, D. Velasco, J. Ignes-Mullol, 'Supramolecular Chiral Azobenzene Surfactants' (2013) 29 *Langmuir* 9635.

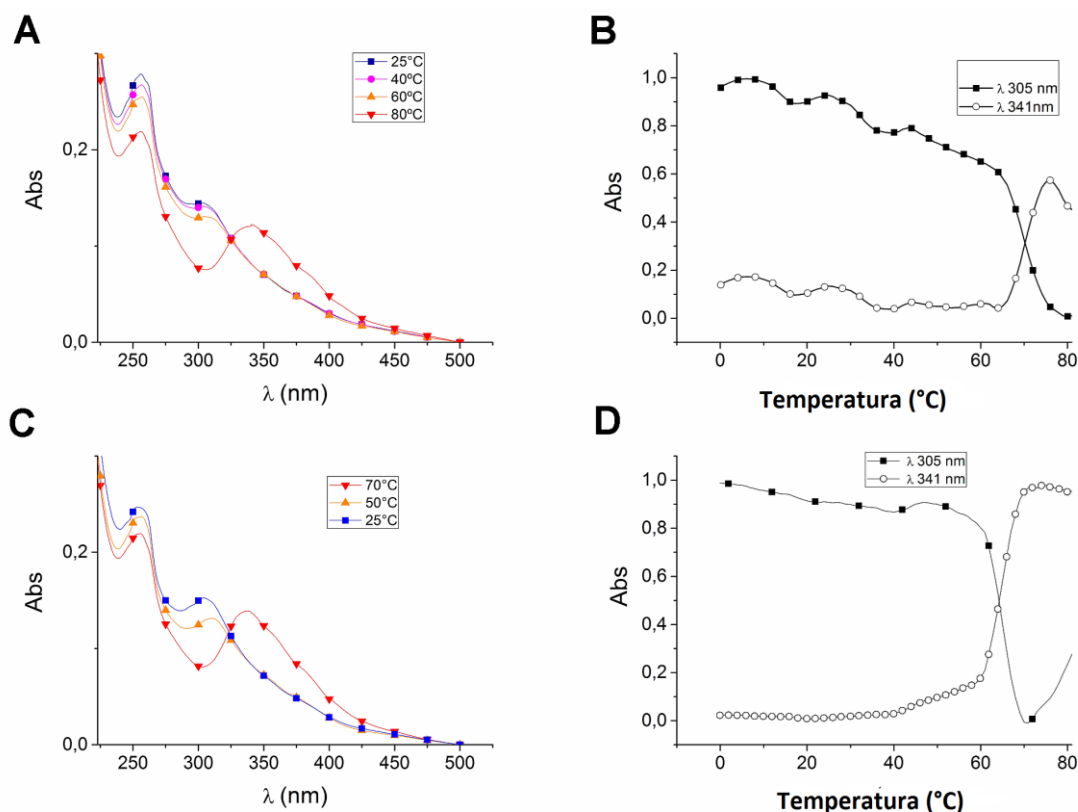


Figura 5.15 A) Espectro UV-Vis de **azovesículas (E) de 4A** durante la calefacción; B) Experimento de dependencia de la temperatura, monitoreo de la muestra durante el calentamiento a λ 305 nm y λ 341 nm, respectivamente; C) Espectro UV-Vis de **azovesículas (E) de 4A** durante el enfriamiento; D) Experimento de dependencia de la temperatura, monitoreo de la muestra durante el enfriamiento a λ 305 nm y λ 341 nm, respectivamente.

En el caso de las **nanoazovesículas (Z) de 4A** (Figura 5.16), el análisis del comportamiento térmico resultó bastante complejo. Esto se debe a que la isomerización térmica *Z-E* es acelerada al calentar la muestra, por lo que el equilibrio térmico inicial *E: Z* sufre modificaciones a lo largo de la evaluación térmica. Adicionalmente, se produce el desagregado o desarmado de las nanoazovesículas (*Z*) de partida, efecto evidenciado por un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de absorción hacia una longitud de onda máxima de 360 nm, mostrando que la isoforma (*Z*) en general está más "libre" en agua tras la desorganización que la (*E*), cuyo λ máximo se observa a 341 nm. Este comportamiento es consistente con el aumento del momento dipolar y el aumento de la solubilidad del isómero *Z*, ya informados previamente en la sección 4.2., donde se evaluó la solubilidad en la subfase para las películas formadas por ambos isómeros. Al enfriarse, se produce la autoorganización del sistema en donde el isómero *E* es el mayoritario, que se refleja en la banda de absorción a 25°C centrada en 311 nm (comparar la Figura 5.16 C y A).

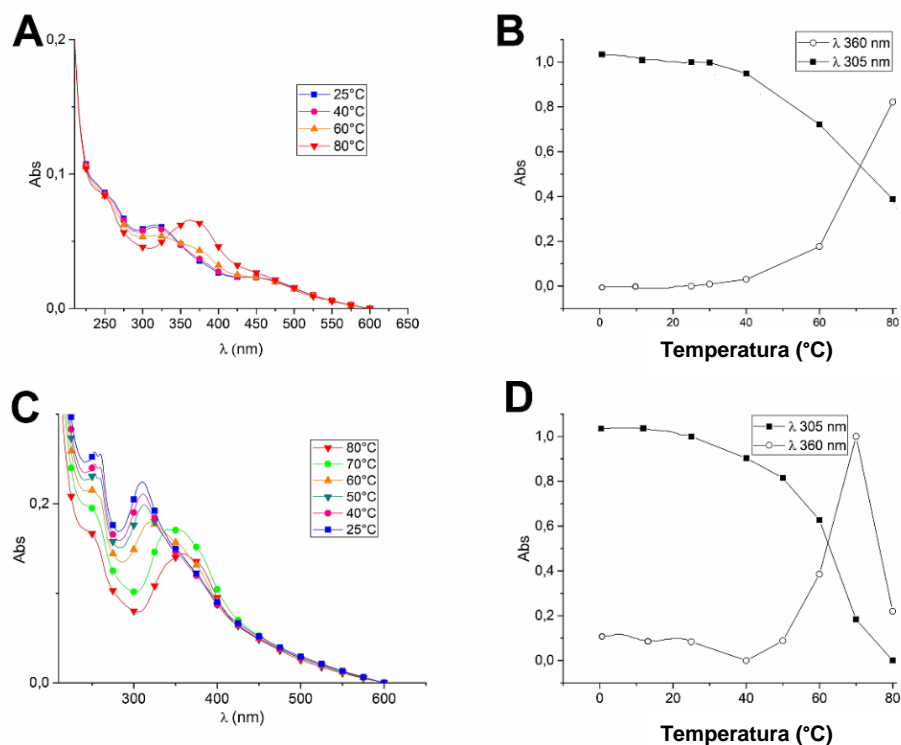


Figura 5.16 A) Espectro UV-Vis de azovesículas (Z) de 4A durante la calefacción; B) Experimento de dependencia de la temperatura, monitoreo de la muestra durante el calentamiento a λ 305 nm y λ 360 nm, respectivamente; C) Espectro UV-Vis de azovesículas (E) de 4A durante el enfriamiento; D) Experimento de dependencia de la temperatura, monitoreo de la muestra durante el enfriamiento a λ 305 nm y λ 360 nm, respectivamente.

5.8 Evaluación de la funcionalidad de las nanoazovesículas de 4A

5.8.1 Estudio de liberación fotocontrolada: encapsulamiento y liberación de la sonda calceína.³⁰

Con el objeto de evaluar la capacidad de 4A de generar vesículas fotomodulables, se llevaron a cabo experimentos de encapsulamiento utilizando calceína como sonda hidrofílica fluorescente. La sonda calceína es utilizada comúnmente en el estudio de permeabilidad de vesículas, ya que existe un apagado o “quenching” de la fluorescencia de la calceína cuando se encuentra en concentraciones mayores de 70 mM, es decir concentrada en el interior de las vesículas. De esta manera, la permeabilización de la membrana es monitorizada a través de un

³⁰ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3ra ed. Springer US (2006).

aumento de la fluorescencia de esta sonda se libera (diluye) libre en el medio acuoso al romperse/ aumentar la fluidez de la vesícula.³¹

Para ello, se realizó el protocolo EISA ya mencionado, modificando la fase acuosa empleada durante la etapa de hidratación, con la finalidad de incorporar la sonda. Se trabajó con una solución de 100 mM de calceína equilibrada en buffer HEPES 5 mM, 50 mM NaCl, pH 7.³² El procedimiento para lograr separar la calceína libre, de las azovesículas (*E*) conteniendo calceína en su interior, implicó realizar cromatografía de exclusión por tamaño. Los experimentos de fotoisomerización se llevaron a cabo usando el espectrofluorímetro, las muestras fueron irradiadas a 310 nm, realizando 6 ciclos de 3 minutos de irradiación cada uno, manteniendo la temperatura a 25°C. A cada tiempo se detectó la liberación de calceína por su emisión de fluorescencia típica a 515 nm, siendo la longitud de onda de excitación de 495 nm. En la Figura 5.17 se observa el aumento de fluorescencia de calceína a 515 nm dependiendo del tiempo de irradiación.

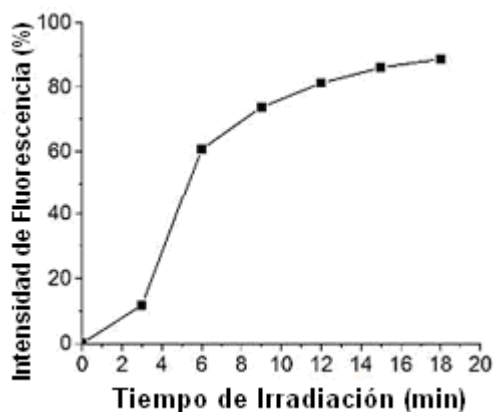


Figura 5.17 Liberación de calceína durante la isomerización *E-Z* a 310 nm de las **nanovesículas de 4A** (415 nm y 515 nm son las longitudes de onda de excitación y de emisión, respectivamente, potencia 150 watts). La liberación pasiva fue inferior al 10% después de dos días.

³¹ T.M. Allen, L.G. Cleland, 'Serum-induced leakage of liposome contents' (1980) 597 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes* 418.

³² a) C. L. Avila et.al. 'Structural characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protofibrils preventing α -synuclein oligomeric species toxicity' (2014) 289 *J. Biol. Chem.* 13838 (b) S. L. Huang y R. C. MacDonald, 'Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release' (2004) 134 *Biochim. Biophys* 1665.

5.8.2 Liberación total de la sonda calceína utilizando Tritón X-100

Inicialmente se evaluó el desensamblado de los azoniosomas por el agregado de Tritón X-100, detergente comúnmente utilizado en experimentos de ruptura de vesículas,³³ a través de espectroscopía Uv-Vis (Figura 5.18). El experimento se llevó a cabo haciendo las mediciones de la adición de concentraciones crecientes de Tritón X-100 a los azoniosomas puros preparados en HEPES 5 mM, 150 mM NaCl, detectándose simultáneamente la disminución de la banda a 311 nm caracterizada para el estado agregado (azoniosomas), y la formación de la banda a 358 nm característica de la transición π - π^* del azoanfífilo libre.

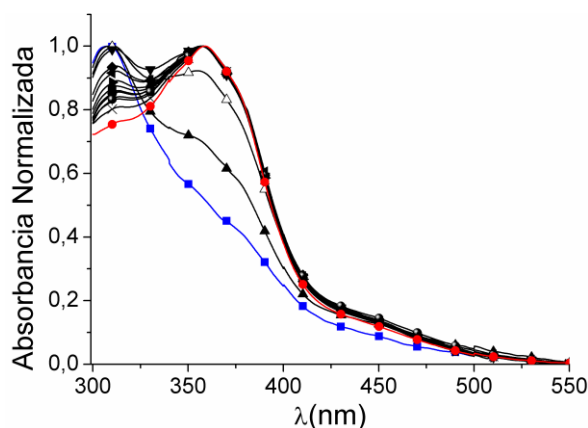


Figura 5.18 Espectro Uv-Vis de azoniosomas en HEPES 5 mM, 150 mM NaCl, a pH 7.0, antes (■) y después (●) del agregado de Tritón X-100 (concentración final 0,1 % m/v).

Posteriormente, para evaluar la liberación total de calceína, fue añadido Tritón X-100 (0,1% m/v) a una dispersión de **azovesículas (E)** previamente cargadas con calceína y a través de un espectrofluorímetro se midió la fluorescencia de la sonda hidrofílica. La intensidad de fluorescencia de calceína obtenida después del tratamiento con Triton X-100 se usó para calcular la liberación de calceína después de cada ciclo de irradiación mediante la ecuación 5.1:

$$\frac{(I_0 - I_i)}{(I_0 - I_t)} \times 100 = \text{Porcentaje de liberación de calceína}$$

(Ecuación 5.1)

donde I_0 es la fluorescencia inicial antes de la irradiación de la muestra, I_i es la emisión de intensidad después de la irradiación a cada tiempo analizado, y I_t es la fluorescencia total

³³ T. Tamba, T. Tanaka, T. Yahagi, Y. Yamashita, M. Yamazaki 'Stability of giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membranes in the presence of Triton X-100.' (2004) 1 *Biochim Biophys* 1667.

obtenida después de tratar la muestra con Tritón X-100.^{32a} Pudimos observar que la liberación máxima fue 97%, después de 4 ciclos de irradiación (Figura 5.19).

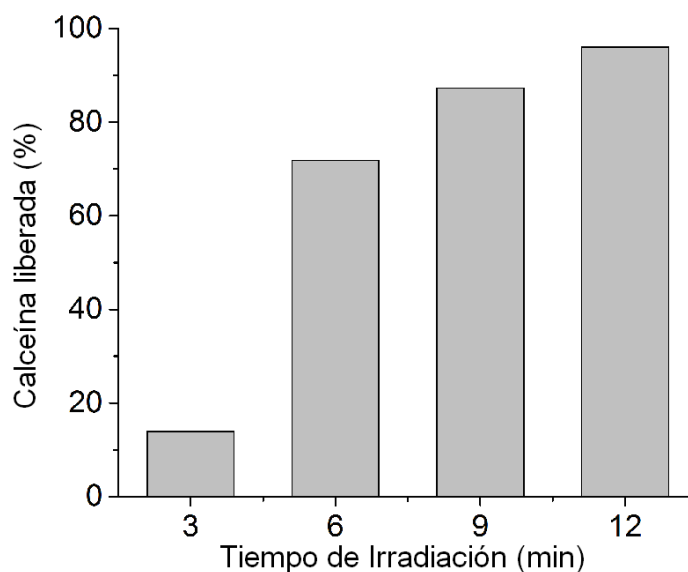


Figura 5.19 Porcentajes acumulativos de liberación de calceína a 0, 3, 6, 9 y 12 minutos de irradiación a 310 nm. La fluorescencia de calceína para cada tiempo de irradiación se detectó por excitación a 495 nm y la emisión se registró a 515 nm. Gráfico obtenido a partir de la ecuación 5.1.

5.8.3 Evaluación de la interacción con el colorante Rojo Nilo

El Rojo Nilo (RN) es una sonda muy utilizada en la tinción de lípidos neutros en las células. La utilidad de esta sonda en la dilucidación estructural del microentorno de las azovesículas reside en que no solo su intensidad de fluorescencia disminuye en medios polares y/o en presencia de un medio ambiente hidrofílico sino también y lo que es más importante en el caso de dispersiones hay un desplazamiento significativo de la longitud de onda máxima de emisión en la zona azul del espectro de absorción, dependiendo del microambiente de la sonda (el cambio es significativo de 108 nm de agua a hexano).³⁴

Para profundizar la investigación de la naturaleza de las nanoazovesículas, se añadió a una dispersión de azovesículas (*E*) preformadas, el colorante hidrofóbico RN que fue capaz de unirse a las nanoazovesículas (*E*). La interacción se evidenció por un desplazamiento de la emisión de RN hacia el azul, desde un λ_{\max} de 658 nm a 643 nm (Figura 5.20). Después de la

³⁴ (a) P. Greenspan, E.P. Mayer y S.D. Fowler, ' Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets' (1985) 100 *J Cell Biol* 965. (b) F. Deye, T.A. Berger y A.G. Anderson, (1990) 62, *Anal. Chem.* 615; (c) M. G. Herrera, T. V. Veuthey y V. I. Doderó, ' Self-organization of gliadin in aqueous media under physiological digestive pHs' (2016) 141 B *Colloids Surf* 565.

fotoisomerización *E-Z*, la emisión de RN se desplazó nuevamente hacia una menor longitud de onda, a un $\lambda_{\text{máx.}}$ 615 nm, indicando que la sonda se movilizó en un entorno aún más hidrofóbico y más fluido ya que la sonda fue capaz de penetrar más en la superestructura en lugar de ser expulsada al medio acuoso, lo que se hubiera detectado por un corrimiento del máximo de fluorescencia hacia el rojo.

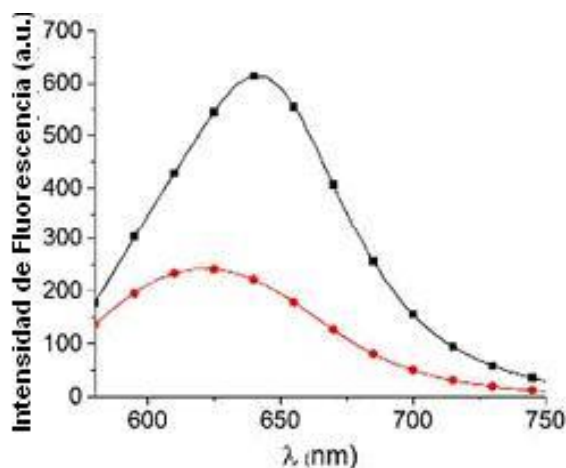


Figura 5.20 Espectro de fluorescencia de Rojo Nilo del sistema vesicular antes (■) y después (●) de la irradiación con luz UV (12 min., 150 watts). Se sustrajo la contribución de Rojo Nilo en las mismas condiciones experimentales.

La disminución de la intensidad de fluorescencia luego de la fotoisomerización *E-Z* ha sido previamente explicada considerando el aumento del momento dipolar del isómero *Z*.³⁵

Se muestran los espectros de fluorescencia normalizados y el cálculo de la segunda derivada de cada espectro para facilitar la visualización de los cambios de posición de las longitudes de onda máximas mencionadas. Asimismo, en el espectro de la derivada segunda se observa un ensanchamiento de la banda de emisión después de la isomerización *E-Z*, que indicaría que hay diferentes modos de unión de la sonda luego de la fotoisomerización (Figura 5.21).

Estos resultados se correlacionan adecuadamente el aumento de fluidez del sistema observado en la interfase y justifican la liberación de calceína tras la iluminación con luz UV.

³⁵ (a) M. Kumari, M. Billamboz, E. Leonard, C. Len, C. Böttcher, A. K. Prasad, R. Haag y S. K. Sharma, ' Self-assembly, photoresponsive behavior and transport potential of azobenzene grafted dendronized polymeric amphiphiles' (2015) 5 *RSC Adv.*, 48301; (b) T. Yuan, J. Dong, G. Hana y G. Wang, 'Polymer nanoparticles self-assembled from photo-, pH- and thermo-responsive azobenzene-functionalized PDMAEMA' (2016) 6 *RSC Adv.* 10904.

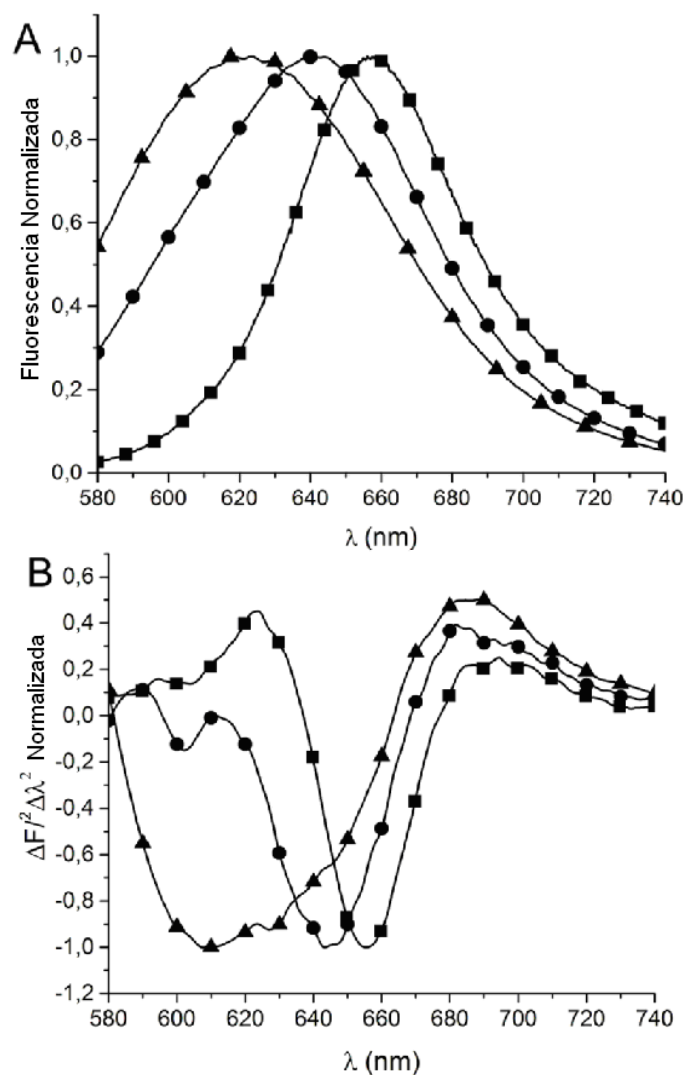


Figura 5.21 A) Espectros de Emisión de Fluorescencia normalizados del sistema azovesículas-RN en buffer Hepes 5 mM, 150 mM NaCl, a pH 7.0 antes (●) y después (▲) de 12 minutos de irradiación a 310 nm. Como control, se preparó una solución con la misma concentración de Rojo Nilo en Hepes 5 mM, 150 mM NaCl, a pH 7.0 (■). La intensidad de fluorescencia fue adquirida por excitación de las muestras a 552 nm. B) Derivada segunda del espectro A presentando las regiones entre 590 y 740 nm (zona de emisión de la calceína) con sus respectivas referencias.

5.9 Conclusión

En general el autoensamblaje dirigido de anfifilos conteniendo cromóforos π en agua requiere el uso de co-solventes, co-solutos o sales. Nuestro trabajo destaca el empleo de un rotavapor para dirigir fácilmente el autoensamblado de **4A** en **azovesículas (E) fotomodulables**. A través de una estrategia simple y versátil pusimos en práctica una técnica de evaporación de disolvente empleada en la obtención de liposomas a partir de lípidos, para inducir el agregado molecular del anfifilo en su fase de líquido cristalina laminar, seguido del autoensamblaje

inducido por agua. En su conjunto, los experimentos empleados de espectroscopia UV-Vis, dispersión dinámica de la luz y experimentos de unión al Rojo Nilo, confirmaron la existencia de dos tipos de azovesículas dependiendo de las condiciones de luz. Pudimos comprobar que, a pesar de que la fotoconversión *E-Z* del grupo azobenceno en las vesículas procedió sólo con un PSS *E: Z* (36:54), el cambio en la sección transversal molecular fue suficiente para lograr satisfactoriamente la liberación del colorante hidrófilo calceína, previamente introducida en el interior de las azovesículas, observando hasta un 97% de liberación. El presente trabajo constituye el primer resultado de obtención de un azoniosoma funcional.

Teniendo en cuenta la simplicidad de los protocolos empleados, esta estrategia podría abrir nuevas oportunidades para construir materiales avanzados a partir de pequeñas moléculas anfifílicas π -conjugadas puras.

Capítulo VI

*Ensamblado dirigido de
Ac-FFC-NH₂ (Péptido A)*

6.1 Breve Introducción

El autoensamblaje proteico, ubicuo en los sistemas naturales, es originado por una variedad de interacciones no covalentes. No sólo desempeña un papel vital en las funciones fisiológicas, sino que además proporciona una excelente fuente de inspiración para el diseño de estructuras arquitectónicas y funcionales, dinámicas y reversibles en distintas escalas de magnitud.^{1, 2} Recientemente diferentes motivos peptídicos, como bloques de construcción de inspiración biológica, han despertado un interés creciente con respecto a la creación de materiales avanzados debido a que presentan muchas ventajas atractivas como la capacidad de programación estructural, una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, y funciones versátiles, así como fácil disponibilidad y bajo costo.^{3, 4, 5} El autoensamblaje peptídico, puede ser utilizado como una estrategia de fabricación para la creación de varias arquitecturas desde nanotubos en la nano-escala hasta haces de fibras en la macro-escala, con diferentes conformaciones, tales como lámina beta y alfa hélice. Asimismo, ofrece excelentes aplicaciones potenciales en áreas tales como: energía, biomedicina, y nanotecnología.^{6, 7, 8} Por ejemplo, los materiales basados en péptidos han sido utilizados en la construcción de complejos sistemas funcionales y dispositivos con mayores oportunidades para acercarse a los biosistemas.^{9, 10, 11} Aunque existen numerosos estudios sobre las aplicaciones de la autoorganización dirigida de péptidos, las propiedades termodinámicas y cinéticas de dicho proceso están aún lejos de conocerse en su totalidad. En este sentido, el estudio de estructuras simples como dipéptidos de fenilalanina, ha resultado de interés por contener toda la

¹ K.Tao, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, 'Fmoc-Modified Amino Acids And Short Peptides: Simple Bio-Inspired Building Blocks For The Fabrication Of Functional Materials', (2016) 45 *Chem. Soc. Rev.* 3935.

² Ian W. Hamley, 'Peptide Nanotubes', (2014) 53 *Angew. Chem. Int. Ed.* 6866.

³ C. Chen, K. Liu, J. Li y X. Yan, 'Functional architectures based on self-assembly of bio-inspired dipeptides: Structure modulation and its photoelectronic applications' (2015) 225 *Adv. Colloid Interface Sci.* 177.

⁴ N. C. Burgess, T. H. Sharp, F. Thomas, C. W. Wood, A. R Thomson, N. R. Zaccai, R. L. Brady, L. C. Serpell and D. N. Woolfson, 'Modular Design of SelfAssembling Peptide-Based Nanotubes', (2015) 137 *J. Am. Chem. Soc.* 10554.

⁵ S.Fleming y R.V.Ulijn, 'Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles', (2014) 43 *Chem.Soc.Rev.* 8150.

⁶ E. De Santis y M. G. Ryadnov, 'Peptide self-assembly for nanomaterials: the old new kid on the block'. (2015) 44 *Chem. Soc. Rev* 8288.

⁷ C. A. Hauser and S. Zhang, 'Nanotechnology: Peptides as biological semiconductors', (2010) 468 *Nature* 516.

⁸ A.Kholkin, N. Amdursky, I.Bdikin, E.Gazitand y G. Rosenman, 'Strong piezoelectricity in bioinspired peptide nanotubes', (2010) 4 *ACS Nano* 610.

⁹ M. Aono and K. Ariga, 'The Way to Nanoarchitectonics and the Way of Nanoarchitectonics' (2016) 28 *Adv. Mater.* 989.

¹⁰ K. Ariga, K. Minami, M. Ebara y J. Nakanishi, 'What are the emerging concepts and challenges in NANO? Nanoarchitectonics, hand-operating nanotechnology and mechanobiology', (2016) 48 *Polym. J* 371.

¹¹ W. Nakanishi, K. Minami, L. K. Shrestha, Q. Ji, J. P. Hill and K. Ariga, 'Bioactive nanocarbon assemblies: Nanoarchitectonics and applications', (2014) 9 *Nano Today* 378.

información molecular necesaria para formar arquitecturas nanoscópicas con singularidades bien definidas tanto en su forma, como en su función obteniendo sistemas peptídicos de dimensiones importantes a un costo sintético menor.^{12, 13}

6.1.1 Difenilalaninas como motivo estructural sencillo para la formación de nanoestructuras

El dipéptido difenilalanina (FF) es un fragmento del polipéptido beta-amiloide, involucrado en la formación de las placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer. Resulta interesante de investigar porque constituye un candidato adecuado como modelo en los procesos de formación y regulación de la autoorganización, debido a su estructura molecular simple y a la variedad de sus interacciones intermoleculares.¹⁴ Por otra parte, ha sido comprobado que FF es capaz de autoensamblarse en una variedad de arquitecturas complejas,¹⁵ tales como nanotubos hexagonales (NTs),¹⁶ nano-cables (NWs),¹⁷ y fibras.¹⁸

Reches y Gazit fueron los primeros en reportar que el péptido FF puede autoensamblarse en estructuras altamente ordenadas de NTs huecos.¹⁴ A pesar de las potenciales aplicaciones y de los numerosos estudios sobre materiales basados en FF, se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en su autoorganización. Rechés y Gazit resaltaron el papel fundamental de las interacciones π - π entre los anillos aromáticos (π - π stacking) y encontraron que la interacción entre pares iónicos no es relevante como fuerza impulsora de la formación de los NTs.¹⁹

Un estudio sistemático reciente de dinámica molecular, realizado por Shell y colaboradores, ha contribuido a descifrar sobre el balance que existe entre las interacciones puente hidrógeno y las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de las cadenas laterales, en las primeras etapas del ensamblado de FF. Los resultados revelaron que una fracción cristalina de NTs se estabilizaría

¹² M. Rechés, E. Gazit, 'Formation of Closed-Cage Nanostructures by Self-Assembly of Aromatic Dipeptides', (2004) 4 *Nano Lett.* 581.

¹³ M. Rechés, E. Gazit, 'Amyloidogenic hexapeptide fragment of medin: homology to functional islet amyloid polypeptide fragments', (2004), 11 *Amyloid* 81.

¹⁴ M. Rechés y E. Gazit, 'Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes', (2003) 300 *Science* 625.

¹⁵ X. Yan, P. Zhu y J. Li, 'Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures', (2010) 39 *Chem. Soc. Rev.* 1877.

¹⁶ Y. Wang, R. Huang, W. Qi, Y. Xie, M. Wang, R. Su y Z. He, 'Capillary Force-Driven, Hierarchical Co-Assembly of Dandelion-Like Peptide Microstructures', (2015) 11 *Small* 2893.

¹⁷ J. Kim, T.H. Han, Y.-I. Kim, J.S. Park, J. Choi, D.C. Churchill, S. O. Kim and H. Ihee, (2010) 22 *Adv. Mater.* 583.

¹⁸ Q. Zou, L. Zhang, X. Yan, A. Wang, G. Ma, J. Li, H. Mohwald y S. Mann, 'Multifunctional porous microspheres based on peptide-porphyrin hierarchical co-assembly' (2014) 53 *Angew. Chem. Int. Ed.* 2366.

¹⁹ M. Rechés y E. Gazit, 'Self-assembly of peptide nanotubes and amyloid-like structures by charged-termini-capped diphenylalanine peptide analogues', (2005) 45 *Isr. J. Chem.* 363.

por interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales, pero que las interacciones electrostáticas entre los grupos terminales que forman puentes salinos, serían las que conducen la disposición espacial de los esqueletos carbonados a un estado más ordenado.²⁰ Por su parte, Bowers y colaboradores informaron que las moléculas de agua desempeñan un papel clave en la estabilidad de los oligómeros de FF.²¹ Recientemente, Levin y Mason investigaron la cinética de formación de NTs basados en Boc-FF, y los resultados revelaron que, antes de la formación de los NT, los monómeros Boc-FF coalescen en nanoesferas a través de un proceso que sigue la regla de pasos de Ostwald.²² Esta regla considera que la cristalización a partir de una solución se produce en etapas, de manera tal que, a menudo, las fases termodinámicamente inestables ocurren en primer lugar, seguidas por la etapa termodinámicamente estable. La regla de Ostwald puede estar relacionada con la termodinámica irreversible. Según la regla de Ostwald el sistema evoluciona hacia la minimización de la producción de entropía²³ (la variación de energía libre de Gibbs para un proceso a temperatura y presión constantes está dada por: $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$). Mediante este fenómeno, las nanoesferas formadas experimentan maduración y finalmente se convierten en NTs (Figura 6.1a). Experimentos de DSC indican que la estabilidad termodinámica de la fase tubular es mayor que la de la fase esférica (Figura 6.1b).

²⁰ J. Jeon, C. E. Mills and M. S. Shell, 'Molecular insights into diphenylalanine nanotube assembly: all-atom simulations of oligomerization', (2013) 117 *J. Phys. Chem. B* 3935.

²¹ T. D. Do and M. T. Bowers, 'Diphenylalanine self assembly: novel ion mobility methods showing the essential role of water', (2015) 87 *Anal. Chem.* 4245.

²² A. Levin, T. O. Mason, L. Adler-Abramovich, A. K. Buell, G. Meisl, C. Galvagnion, Y. Bram, S. A. Stratford, C. M. Dobson, T. P. J. Knowles y E. Gazit, 'Ostwald's rule of stages governs structural transitions and morphology of dipeptide supramolecular polymers', (2014) 5 *Nat. Commun.* 5219.

²³ R. A. van Santen, 'The Ostwald Step Rule' (1984) 88 *J. Phys. Chem.* 5768.

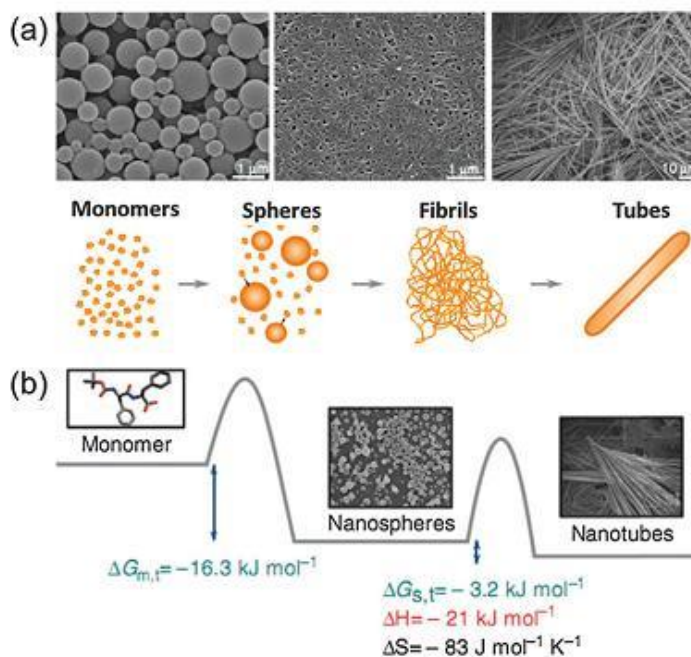


Figura 6.1 (a) Microfotografías de SEM y representación esquemática de las transiciones estructurales y (b) cambios de energía libre durante las transiciones de fase observadas en el sistema Boc-FF. Extraído de Levin y colaboradores.²²

En comparación con otras estructuras, tales como nanocables y nanovesículas, los nanotubos basados en FF podrían constituir la estructura termodinámicamente más estable en agua, es decir, la formación de nano-vesículas tienen lugar bajo control cinético, mientras que los NTs siguen las leyes del control termodinámico.^{17, 22} Esta morfología de las nanoestructuras FF puede ser racionalmente diseñada, controlada e interconvertida incorporando variables diversas para cambiar los parámetros cinéticos.^{17, 24, 25, 26, 27, 28, 29} Por ejemplo, Yan, Li y colaboradores informaron que un dipéptido FF catiónico dio lugar a una transformación

²⁴ K. Liu, R. R. Xing, Q. L. Zou, G. H. Ma, H. Mo "hwald y X. H. Yan, 'Simple Peptide-Tuned Self-Assembly of Photosensitizers towards Anticancer Photodynamic Therapy', (2016) 55 *Angew. Chem. Int. Ed.* 3036.

²⁵ P. Kumaraswamy, R. Lakshmanan, S. Sethuraman and U. M. Krishnan, 'Self-assembly of peptides: influence of substrate, pH and medium on the formation of supramolecular assemblies', (2011) 7 *Soft Matter* 2744.

²⁶ X. Yan, Y. Cui, Q. He, K. Wang, J. Li, W. Mu, B. Wang and Z. C. Ou-yang, 'Reversible Transitions between Peptide Nanotubes and Vesicle-Like Structures Including Theoretical Modeling Studies', (2008) 14 *Chem. – Eur. J.* 5974.

²⁷ S. Semin, A. van Etteger, L. Cattaneo, N. Amdursky, L. Kulyuk, S. Lavrov, A. Sigov, E. Mishina, G. Rosenman and T. Rasing, 'Strong Thermo-Induced Single And Two-Photon Green Luminescence In Self-Organized Peptide Microtubes' (2015) 11 *Small* 1156.

²⁸ N. Amdursky, P. Beker, I. Koren, B. Bank-Srouer, E. Mishina, S. Semin, T. Rasing, Y. Rosenberg, Z. Barkay and E. Gazit, 'Structural transition in peptide nanotubes' (2011) 12 *Biomacromolecules* 1349.

²⁹ Y. X. Li, L. Y. Yan, K. Liu, J. Wang, A. H. Wang, S. Bai y X. H. Yan, 'Solvothermally Mediated Self-Assembly of Ultralong Peptide Nanobelts Capable of Optical Waveguiding', (2016) 19 *Small* 2575.

espontánea muy interesante de NTs en estructuras esféricas de tipo vesículas durante un proceso de dilución en solución. Los mecanismos de la transición fueron descritos por el modelo de Delaunay.²⁶

Kim, Ihee y colaboradores, pudieron obtener de forma sencilla ambas morfologías de NW y NT solo alterando las concentraciones de FF, y el análisis de Difracción de Rayos X reveló que el enlace de hidrógeno entre el agua y las moléculas de FF desempeñaría un papel importante en la transición estructural.¹⁷ Un estudio de Dinámica Molecular reveló también que las vías de ensamblaje de FF son dependientes de la concentración y la formación de diferentes nanoestructuras resulta del equilibrio entre las interacciones péptido-péptido y péptido-puente hidrógeno del agua.³⁰ Las propiedades de los solventes, tales como la polaridad y la capacidad de formar puente hidrógeno, influirían directamente en las interacciones locales del autoensamblado del péptido a nivel molecular.³¹ La transición estructural dependiente de disolvente en los bloques de construcción basados en péptidos ha sido ampliamente confirmada.

22, 31, 32, 33, 34, 35, 36

Otro ejemplo es el estudio realizado previamente por Yan, Li y colaboradores, en el cual puede observarse que FF experimenta autoensamblaje, formando microcristales en forma de flor en un solvente polar como el etanol, y en cambio nanofibrillas largas en tolueno, solvente apolar. Se cree que la formación de nanofibrillas es debido a que la presencia de tolueno rompe el equilibrio hidrófobo/hidrófilo (entre las interacciones hidrófobas y las puente hidrógeno), y el π - π stacking se hace preponderante durante el proceso de ensamblaje.³²

Las nanofibras o nanocintas con estructuras de tipo lámina β son otro tipo de morfología importante presente en los péptidos. Escuder y Miravet obtuvieron información sobre la termodinámica y la cinética de la fibrilación de tetrapéptidos basados en FF. Encontraron que la formación de dímeros es el cuello de botella cinético y el paso determinante de la velocidad del

³⁰ C. Guo, Y. Luo, R. Zhou and G. Wei, 'Probing the self-assembly mechanism of diphenylalanine-based peptide nanovesicles and nanotubes' (2012) 6 *ACS Nano* 3907.

³¹ T. O.Mason, D. Y. Chirgadze, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, T. P. J. Knowles y A. K. Buell, 'Expanding the solvent chemical space for self-assembly of dipeptide nanostructures', (2014) 8 *ACS Nano* 1243.

³² P. Zhu, X. Yan, Y. Su, Y. Yang y J. Li, 'Solvent-Induced Structural Transition of Self-Assembled Dipeptide: From Organogels to Microcrystals', (2010) 16 *Chem. – Eur. J* 3176.

³³ R. Huang, W. Qi, R. Su, J. Zhao and Z. He, 'Solvent and surface controlled self-assembly of diphenylalanine peptide: from microtubes to nanofibers' (2011) 7 *Soft Matter* 6418.

³⁴ A. N. Rissanou, E. Georgilis, E. Kasotakis, A. Mitraki y V. Harmandaris, 'Effect of solvent on the self-assembly of dialanine and diphenylalanine peptides', (2013) 117 *J. Phys. Chem. B*. 3962.

³⁵ Q. Li, Y. Jia, L. R. Dai, Y. Yang and J. B. Li, 'Controlled rod nanostructured assembly of diphenylalanine and their optical waveguide properties' (2015) 9 *ACS Nano* 2689.

³⁶ Q. Li, H. Ma, A. Wang, Y. Jia, L. Dai y J. Li, 'Self-Assembly of Cationic Dipeptides Forming Rectangular Microtubes and Microrods with Optical Waveguiding Properties' (2015) 3 *Adv. Opt. Mater.* 194.

proceso de fibrilación.³⁷ Por lo tanto las fibras como nanoestructuras pueden ser racionalmente diseñadas alterando algunos parámetros cinéticos, por ejemplo, ha sido observado que NTs de FF han experimentado una transición a estructuras fibrosas tras el calentamiento.³⁸

6.2 Hipótesis y Diseño

El uso de interacciones no-covalentes podría limitar el uso de los productos de autoensamblado en situaciones reales donde las condiciones del entorno pueden variar. La estabilización del autoensamblado utilizando enlaces covalentes podría llevar a sistemas supramoleculares más robustos, sin embargo esto limitaría la capacidad de modulación de estos sistemas.

Una aproximación interesante es utilizar enlaces disulfuros, ya que son enlaces covalentes estables que se forman fácilmente bajo condiciones oxidantes a partir de los tioles libres y son estables en un rango variado de pH. Además el enlace S-S es bastante más largo que una unión C-C, haciendo que el ángulo diedro C-S-S-C se restrinja a valores cercanos a 90° con una barrera de interconversión de aproximadamente 40 KJ mol⁻¹, similar al enlace amida. Finalmente el coste entrópico de la inmovilización del enlace S-S ha sido estimado en alrededor de 3, 5 J mol⁻¹ K⁻¹ en CH₃-S-S-CH₃ convirtiéndolo en el más bajo de la serie CH₃-X-Y-CH₃ con X, Y= C, Si, S, O, N, P.³⁹

En 2004, Gazit y colaboradores reportaron que CFF tripéptido formaba nanoesferas estables en lugar de nanotubos.¹² Ellos demostraron que el grupo cisteína, era el responsable de la formación inesperada de nanoesferas estables, las estructuras observadas fueron obtenidas luego de 5 horas de incubación. (Figura 6.2)

³⁷ M. Tena-Solsona, B. Escuder y J. F. Miravet, 'Thermodynamic and Kinetic Study of the Fibrillation of a Family of Tetrapeptides and Its Application to Self-Sorting. What Takes So Long?' (2015) 27 *Chem. Mater.* 3358.

³⁸ A. Handelman, A. Natan and G. Rosenman, 'Structural and optical properties of short peptides: nanotubes-to-nanofibers phase transformation' (2014) 20 *J. Pept. Sci.* 487.

³⁹ G. Whitesides, 'Using a convenient, quantitative model for torsional entropy to establish qualitative trends for molecular processes that restrict conformational freedom' (1998) 63 *J. Org. Chem.* 3168.

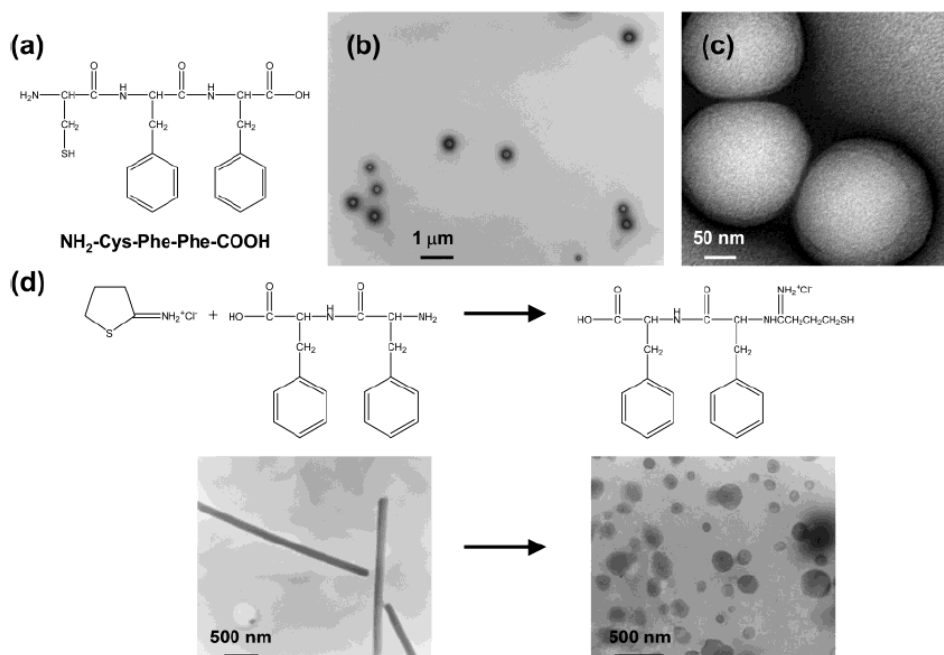


Figura 6.2. Estructuras nanoesféricas similares formadas en presencia de un grupo tiol. (a) Presentación esquemática del tripéptido Cys-Phe-Phe (CFF). (b) Microfotografía TEM de baja definición de las nanoesferas formadas por el péptido CFF. (c) Microfotografía HR - TEM de alta definición de las nanoesferas formadas por el péptido CFF. (d) Presentación esquemática de la reacción química que modifica un grupo amina en un grupo tiol en la estructura química del péptido difenilalanina. A la izquierda, microfotografía TEM de baja definición de los nanotubos formados por el péptido FF. A la derecha, ídem de las nanoesferas formadas por péptido FF que se autoensamblan en presencia de 2-iminotiolano.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la disponibilidad de reactivos, nos propusimos para este trabajo sintetizar un tripéptido reverso al reportado por Gazit y colaboradores, de estructura Ac-Phe-Phe-Cys-NH₂ (Péptido A), el cual ha sido transformado en fase sólida a modo de tener los extremos C y N terminal no cargados y así minimizar los posibles efectos de la carga en los extremos del péptido. Este péptido sería capaz de dimerizar en agua formando enlaces covalentes a pH mayor a 8 donde la formación del enlace disulfuro esta favorecido, debido a la ionización del tiol del grupo cisteína. Sería posible reducir el enlace disulfuro utilizando un agente reductor para este tipo de enlaces, que sea efectivo y soluble en agua. Con este fin

utilizamos Tris (B-Cloroetil) Fosfato, abreviado comúnmente como TCEP, utilizado con frecuencia en bioquímica y biología molecular.⁴⁰ (Figura 6.3)

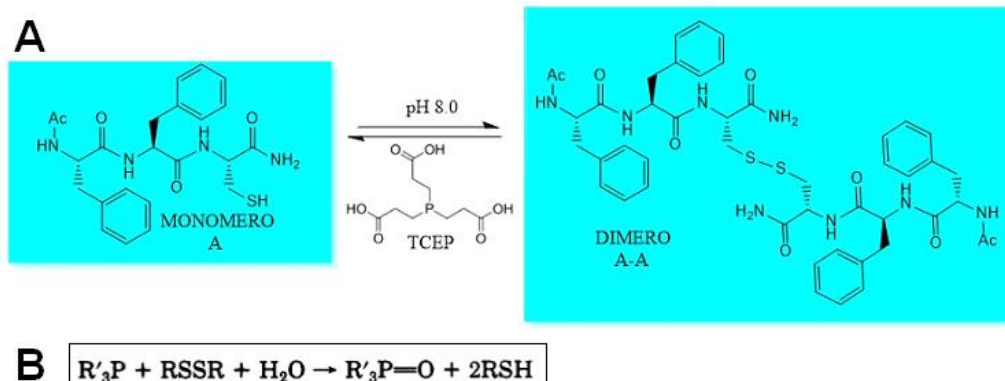


Figura 6.3 A) Reacción de óxido - reducción del péptido A. **B)** Mecanismo de reducción mediado por TCEP.

Esta capacidad de óxido-reducción mediada por el entorno, resulta sumamente interesante si consideramos que en el interior celular de todo organismo vivo se mantiene un entorno reductor y que el desbalance del equilibrio oxidativo - reductor, llamado stress oxidativo, conlleva al envejecimiento celular y a condiciones patológicas en humanos, entre ellas Alzheimer.⁴¹ El grupo de Gazit debido a su diseño experimental no contempló esta posibilidad de modulación del proceso de autoensamblado.

Para comprender mejor el proceso de autoensamblado, es que nos planteamos estudiar el proceso a pH 3.0 y pH 8.0 en presencia y ausencia del agente reductor. Así a pH 3.0 estaría favorecida la autoorganización del monómero solo, mientras que la formación del enlace S-S podría estar favorecida una vez que la autoorganización sea establecida en ausencia de TCEP. Por otro lado a pH 8.0 se favorecería la formación de dímeros S-S tanto en condiciones iniciales como al final del proceso de autoorganización, únicamente cuando la reacción se llevara a cabo en ausencia del agente reductor.

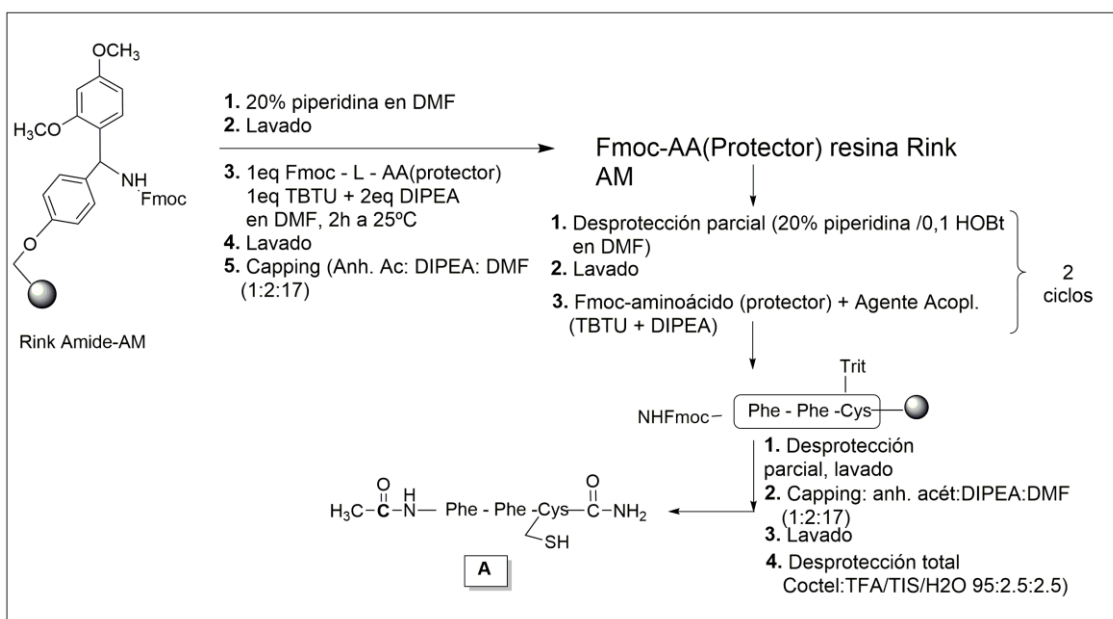
6.3. Síntesis del Péptido A

Para la síntesis del tripéptido **A** se utilizó la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida, empleando la metodología Fmoc/^tButilo (Esquema 6.1, ver detalles en sección 7.4.2 en el

⁴⁰ John A. Burns, James C. Butler, John Moran y George M. Whitesides, 'Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine'. (1991) 56 *J. Org. Chem.* 2648.

⁴¹ a) F. Schafer, G. Buettner, 'Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple'. 2001 30 *Free Radic Biol Med.* 1191. b) K. Kontush, S. Schekatolina, 'Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease' 2004 1031 *Ann N Y Acad Sci* 249.

capítulo 7). Se empleó esta técnica, debido principalmente a que el péptido libre resulta insoluble en los solventes utilizados normalmente en síntesis en solución, como son diclorometano (CH_2Cl_2) o dimetilformamida (DMF).



Esquema 6.1 Metodología sintética del péptido A en fase sólida.

Además, a través de esta metodología en fase sólida, la síntesis ha sido muy exitosa ya que después del corte final de la resina y su precipitación en éter etílico, la pureza del péptido fue del 98% determinada por espectrometría de masas de baja y alta resolución (ver sección 7.4.3 en el capítulo 7), por lo que el péptido **A** fue utilizado en los experimentos de agregación sin mayor purificación.

El péptido **A** posee el extremo N-terminal acetilado y el extremo C-terminal amidado por lo que es neutro a $\text{pH} \leq 8$. Los resultados de predicción de la solubilidad siguiendo el programa Peptide Property Calculator, mostraron un punto isoeléctrico de 6.98 y un porcentaje de carácter hidrofóbico del 66% debido a los dos grupos fenilalanina.⁴² El mismo programa brinda información de posibles solventes para solubilizar al péptido sintetizado: acetonitrilo, metanol o isopropanol.

Teniendo en cuenta los datos de solubilidad aportados por el programa, inicialmente se realizó Cromatografía de Placa Fina (TLC) resuspendiendo el péptido liofilizado en una batería de solventes orgánicos y mezclas de los mismos con agua, probando diferentes relaciones de solventes de elución y con distintos agentes reveladores. Se obtuvo como resultado una

⁴² https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi.

solubilización total en hexafluoroisopropanol (HFIP); una solubilización parcial en MeOH; MeOH/H₂O (1:1); MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) e insolubilidad en H₂O; AcOEt; hexano; ACN; CH₂Cl₂; CHCl₃; ACN/ H₂O; isopropanol.

6.4. Estudio de la agregación mediada por cambio en las condiciones del medio acuoso.

Consideraciones Generales

Se determinó la capacidad de formar agregados en agua a pH 3 y 8 del péptido **A** disuelto inicialmente en HFIP. El HFIP es un compuesto orgánico cuya fórmula es (CF₃)₂CHOH. Es un alcohol fluorado con carácter ácido (pK_a= 9) y es empleado como disolvente, cosolvente, aditivo de catálisis homogéneas y como intermediario sintético. Su uso más común es en la disolución de péptidos tales como el péptido β-amiloide para su estudio y análisis; y los derivados de FF.⁴³

Su capacidad de disolver péptidos insolubles se debe a que es un solvente aceptor de electrones. En este punto, es necesario explicar la clasificación de números de Gutman, para clasificar a un solvente. Así, se define un número aceptor de electrones, (AN) y un número donador de electrones (DN) para cada solvente.⁴⁴ El término (AN + DN) de polaridad es una combinación de dos conceptos fisicoquímicos opuestos y se designa como constante de anfotericidad, es adimensional y en el rango de valores es 0 a 130.⁴⁵ En la siguiente Tabla 6.1 se muestran los números AN y DN de varios solventes en relación a la capacidad de solubilización de péptidos insolubles.⁴⁶ Como vemos, para el caso del HFIP, no solamente un elevado valor como aceptor de electrones (AN=88), sino también su capacidad de interacción hidrofóbica con el péptido, la cual es favorecida por los dos grupos CF₃ de su estructura,⁴⁷ hacen de este compuesto un excelente solvente para solubilizar efectivamente al péptido **A** sintetizado.

⁴³ J.W. Kelly y Jr. P.T. Lansbury, 'A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and protein amyloid fibril formation' (1994) 1 *Amyloid* 186.

⁴⁴ a) V. Gutmann, 'Empirical parameters for donor and acceptor properties of solvents', 1976 *Acta 21 Electrochim.* 661.
b) V. Gutmann, *The donor-acceptor approach to molecular interactions*, Plenum, New York, (1978).

⁴⁵ L. Malavolta, E. Oliveira, E.M. Cilli y C.R. Nakaie, 'Solvation of polymers as model for solvent effect investigation: Proposition of a novel polarity scale', (2002) 58 *Tetrahedron* 4383.

⁴⁶ L. Malavolta, M. Pinto, J. Cuvero, C. Nakaie ' Interpretation of the dissolution of insoluble peptide sequences based on the acid-base properties of the solvent', (2006) 15 *Protein Science* 1476.

⁴⁷ E.P. Vieira, H. Hermel y H. Mohwald, 'Change and stabilization of the amyloid-b (1-40) secondary structure by fluorocompounds' (2003) 1645 *Biochim. Biophys.* 6.

	Solvente	AN	DN	(AN + DN)	(AN – DN)	Solubilidad del péptido (%)			
						A ^a	B ^b	C ^c	D ^d
1	H ₂ O pH 7.4	54.8	18.0	72.8	36.8	6	11	11	0
2	MeCN	18.9	14.1	33.0	4.8	0	0	0	0
3	50% MeCN/H ₂ O	36.9	16.1	53.0	20.8	29	25	16	0
4	Acetone	12.5	17.0	29.5	-4.5	0	0	11	0
5	iPrOH	33.5	36.0	69.5	-2.5	11	0	5	10
6	TFE	53.0	0.0	53.5	53.5	20	44	95	20
7	25% TFE/H ₂ O	54.4	13.5	67.9	40.9	39	53	33	18
8	50% TFE/H ₂ O	54.2	9.0	63.2	45.2	35	42	73	33
9	75% TFE/H ₂ O	53.7	4.5	58.2	49.2	10	43	67	33
10	HFIP	88.0	0.0	88.0	88.0	95	86	100	85
11	25% HFIP/H ₂ O	63.1	13.5	76.6	49.6	50	53	33	8
12	50% HFIP/H ₂ O	71.4	9.0	80.4	62.4	88	70	87	61
13	75% HFIP/H ₂ O	79.4	4.5	84.2	75.2	90	81	91	89
14	DMSO	19.3	29.8	49.1	-10.5	83	95	100	84
15	25% DMSO/H ₂ O	45.9	21.0	66.9	24.9	20	25	10	12
16	50% DMSO/H ₂ O	37.1	23.9	60.9	13.2	39	47	14	32
17	75% DMSO/H ₂ O	28.2	26.9	55.1	1.3	51	71	54	24

Tabla 6.1 Parámetros fisicoquímicos AN y DN de distintos solventes y porcentajes de solubilidad de péptidos insolubles. a) Péptido (1-42) AB amiloide; b) Péptido (1-21) AB amiloide; c) Péptido TM.32; d) Péptido VVLGAAIV.⁴⁶

Considerando lo expuesto, hipotetizamos que el cambio de la organización en función de la polaridad del sistema podría conducir a la formación de diferentes agregados del péptido propuesto en agua, desde altamente ordenados (nanotubos) como los reportados por Reches y Gazit¹², hasta agregados amorfos⁴⁸, o bien agregados insolubles.

El péptido **A** se solubilizó en hexafluoroisopropanol (HFIP) obteniendo una concentración de 2 mM. Diferentes alícuotas se agregan a soluciones acuosas de pH 3 y pH 8, obteniendo una concentración final de péptido 0,274 mM en cada una de ellas (Figura 6.4). Las alícuotas del sistema fueron tomadas a tiempo inicial (t_0), 30 min. (t_{30}) y luego de 24 hs (t_{24h}). Cada sistema fue monitoreado a través de espectroscopía UV-Vis, POM, TEM y SEM a los diferentes tiempos. De esta forma obtuvimos información molecular y morfológica tanto de los productos obtenidos inicialmente (en condiciones cinéticas), como de los obtenidos por la evolución o no hacia productos termodinámicamente más estables.

⁴⁸ Jacob. N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*, 3 era edición, Elsevier, (2011).

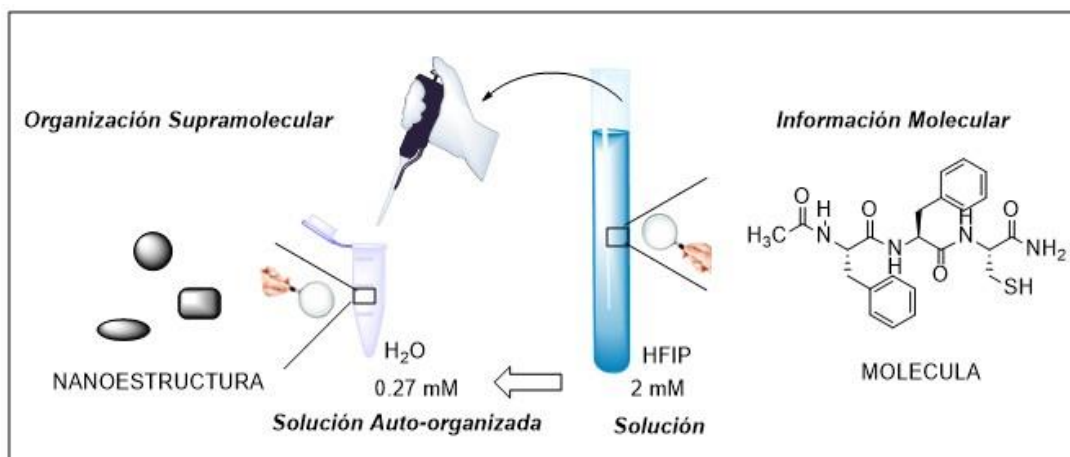


Figura 6.4 Representación esquemática del protocolo experimental empleado para la obtención de los sistemas auto-agregados del péptido A.

A continuación se presentan las metodologías empleadas y se muestran los resultados obtenidos para los diferentes pHs y diferentes tiempos.

Para obtener información de la evolución del sistema y del estado de agregación, se utilizó espectroscopia UV-Visible. A pesar que esta espectroscopia es una técnica de baja resolución, se ha utilizado como herramienta cualitativa porque provee información de cambios en el entorno del ambiente de los aminoácidos fenilalanina, pudiendo relacionar el proceso de formación de agregados y la influencia de los residuos de fenilalanina en un mismo ensayo fácil de realizar y de analizar.

El máximo de absorbancia del péptido A, correspondiente a la transición $n-\pi^*$ del enlace peptídico, se encuentra alrededor de 220 nm, región obviada en el rango de análisis debido a que también absorbe el HFIP.⁴⁹ La absorción en la región 250-260 nm es característica del anillo aromático de la fenilalanina (múltiples bandas complejas) y también del grupo de la cisteína (banda centrada en 250 nm, transición $n-\sigma^*$ muy débil).⁵⁰ A todos los pHs tanto a t_0 como a t_{24} , se observaron unas bandas en la región 280-300 nm, las cuales en ausencia de otros grupos aromáticos, podemos atribuir a la interacción de los grupos aromáticos en un entorno hidrófobo (π stacking); esto sumado a detectar "scatter" en la región del visible, nos lleva a

⁴⁹ M. F. Sonnenschein y C. M. Roland 'Absorption and fluorescence spectra of poly(ethylene terephthalate) dimers' (1990) 31 *Polymer* 2023.

⁵⁰ a) Goldfarb et al. 'The ultraviolet absorption spectra of proteins' (1951) 193 *Journal of Biological Chemistry* 397.; b) A. Aitken y M. P. Learmonth, Quantitation of tryptophan in proteins en *The protein protocols handbook*, Springer (2009); c) Fornander et al., 'UV Transition Moments of Tyrosine' (2014) 118 (31) *J. Phys. Chem. B* 9247.

hipotetizar la formación de agregados supramoleculares.⁵¹ Observaciones similares han sido previamente reportadas en proteínas multiméricas generadas por procesos de fibrilación, polimerización y gelación.^{52, 53, 54}

Teniendo en cuenta las características de los espectros UV-Visibles en la región 350-400 nm, se calculó el índice de agregación (I.A%) de cada sistema.^{51, 54} Este es calculado considerando la relación de absorbancias: A_{350}/A_{258} (ver Ecuación 7.3 en Capítulo 7, sección 7.4.4). Cuando no hay proteínas agregadas, este índice se encuentra entre 0-2; entre 2-5 indica que hay agregados en solución; y cuando es mayor a 5, se observa una agregación apreciable. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.2.

Condiciones del solvente	I.A. (%) Peptido A
pH3 t ₀	11,3
pH3 t ₂₄	26,8
pH8 t ₀	24,7
pH8 t ₃₀	29,0
pH8 t ₂₄	40,3
pH8 t ₀ +TCEP t ₀	14,8
pH8 t ₀ +TCEP t _{2h}	21,8
pH8 t ₀ +TCEP t _{24h}	23,8

Tabla 6.2 Índices de agregación calculados para el péptido A en las diferentes condiciones del solvente

Estos resultados muestran que en todas las condiciones el sistema está altamente agregado, mostrándose una progresión creciente en el índice de agregación a medida que el sistema evoluciona en el tiempo. Es importante destacar que no se observó formación visible de agregados y que la dispersión se mantuvo traslúcida.

Para estudiar cambios estructurales a partir de los espectros Uv-Vis, se realizó la derivada segunda de los espectros. Este método aumenta la sensibilidad a diferencias menos perceptibles entre los espectros, permitiendo resolver bandas de manera cualitativa y reduciendo el efecto producido por la dispersión de las partículas. En proteínas en general, cambios en el máximo de longitud de onda de 0.1 nm están correlacionados con cambios

⁵¹ R. Esfandiary y C. Russell Middaugh, '*Ultraviolet Absorption Spectroscopy*', *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*, John Wiley & Sons, Inc. 169 (2012)

⁵² P. D. Yurchenco et al, 'Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity' (1985) 260 *J Biol Chem* 7636.

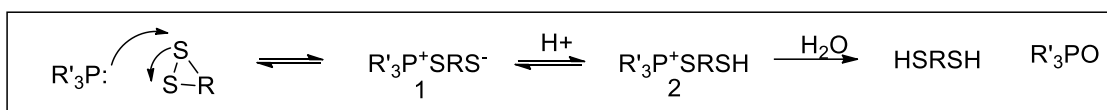
⁵³ G. Jiang et al, 'Anthrax vaccine powder formulations for nasal mucosal delivery' (2006) 95(1) *J Pharm Sci* 80.

⁵⁴ G. Herrera et al, 'Self-organization of gliadin in aqueous media under physiological digestive pHs' (2016) 141 *Biointerfaces B* 565.

estructurales.⁵¹ Es aceptado en sistemas modelos que el máximo de absorción de la fenilalanina es a 258.0 nm.⁵⁵

Para hacer más sencillo el análisis y la presentación de los resultados, se detallan las observaciones agrupadas por pHs, haciendo énfasis en las condiciones oxidantes o reductoras del medio acuoso.

El mecanismo de la reacción de reducción utilizando TCEP, sugiere una reacción de SN₂, cuya etapa limitante de la velocidad es el ataque nucleofílico del fósforo al enlace S-S. (Esquema 6.2)



Esquema 6.2 Mecanismo de reacción de reducción mediado por TCEP.

Inicialmente, realizamos TEM para saber si el TCEP es capaz de formar estructuras que puedan impedir la caracterización de los agregados formados por el péptido A. Se pudo detectar que el TCEP formaba agregados amorfos tipo esféricos (Figura 6.5), los cuales disminuyeron en cantidad luego del lavado del grid con agua y posterior escurrido. La muestra de TCEP de 24 hs, presento menor cantidad de agregados esféricos.

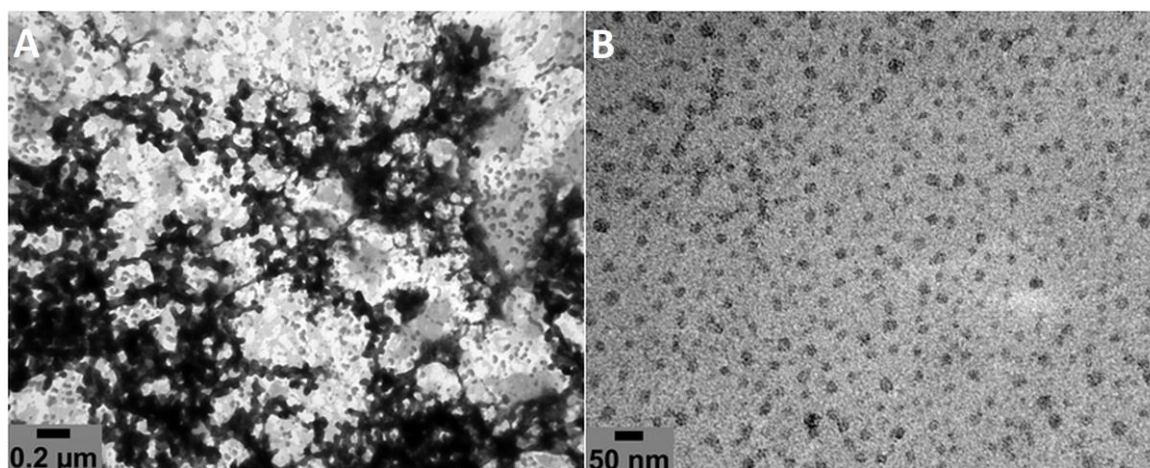


Figura 6.5 Microfotografías TEM de TCEP control a t₀ y t₂₄ hs.

⁵⁵ 'Examination of phenylalanine microenvironments in proteins by second-derivative absorption spectroscopy' (1991) 287 (1) *Arch Biochem Biophys.* 33.

6.4.1 Autoorganización a pH 3.0 en condiciones oxidantes

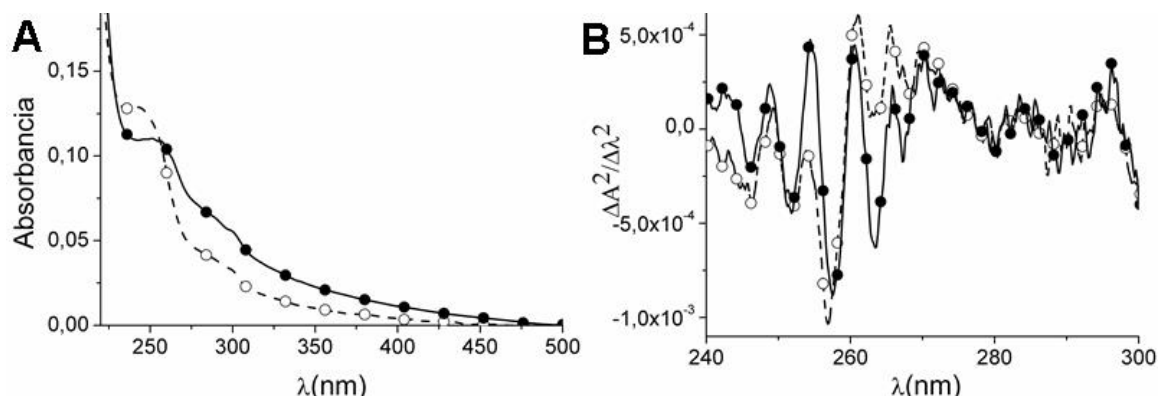


Figura 6.6 Espectros UV-Visible de la solución del péptido A en agua a pH 3.0 t_0 (---○---) y a pH 3.0 t_{24} (—●—). **A)** Espectro UV-Visible mostrando un barrido espectral entre 230-500 nm. **B)** Derivada Segunda correspondiente a (A) presentando la región entre 240-300 nm (zona de absorción del aminoácido fenilalanina: 258 nm).

Teniendo en cuenta que el grupo aromático fenilalanina en sistemas modelos absorbe a 258.0 nm en agua, se observa un desplazamiento inicial del máximo de absorbancia hacia 256.8 nm (Figura 6.6), indicando que inicialmente estos grupos se encontrarían en un medio polar (dispersos en agua) y luego debido a la evolución en el tiempo (y posiblemente a un cambio en la nanoestructura) las cadenas laterales estarían menos expuestas y su entorno sería menos polar.⁵⁶

A través de ME podemos evidenciar que hacia el inicio de la autoorganización del péptido A (t_0), la solución, a simple vista traslúcida, contiene nanoesferas tipo vesículas de tamaños de alrededor de 20-50 nm de diámetro y cintas interconectadas de aprox. 12,7 nm de diámetro promedio, observándose como ambos estadios coexisten (Figura 6.7). El sistema, en 24 horas evoluciona a una estructura con características ópticas de tipo gel (MO y POM) y que por EM se identificó como manojos de fibras elongadas, no se detectaron las esferas inicialmente presentes (Figura 6.8).

La transición observada ha sido previamente descrita considerando la ley de Ostwald. El proceso de autoensamblado mediado por solvente a pH 3.0 involucraría inicialmente la formación de esferas como autoagregados termodinámicamente inestables promovidos por interacciones de tipo hidrofóbicas que tendrían lugar al momento de introducir el péptido en el medio acuoso. Esto ocurre porque aumenta la entropía del sistema a causa de la pérdida de la

⁵⁶ F-X. Schmid, *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*, eLS, (2001).

organización de las moléculas de agua en los alrededores de los grupos apolares. Al sentir una mayor fuerza hidrofóbica debido a la interacción de los grupos apolares entre ellos, se hace menor el área de la superficie de contacto con el agua, disminuyendo la cantidad de agua organizada en el entorno del péptido. Esto conduce a un incremento entrópico, lo que contribuye a un aumento de la energía libre del sistema, cuyo comportamiento es exotérmico, determinando así una menor estabilidad de las esferas formadas en la etapa inicial del proceso de agregación y explican la formación inicial de esferas que luego evolucionan a fibras pasando a través de la estructura tipo cinta.⁵⁸

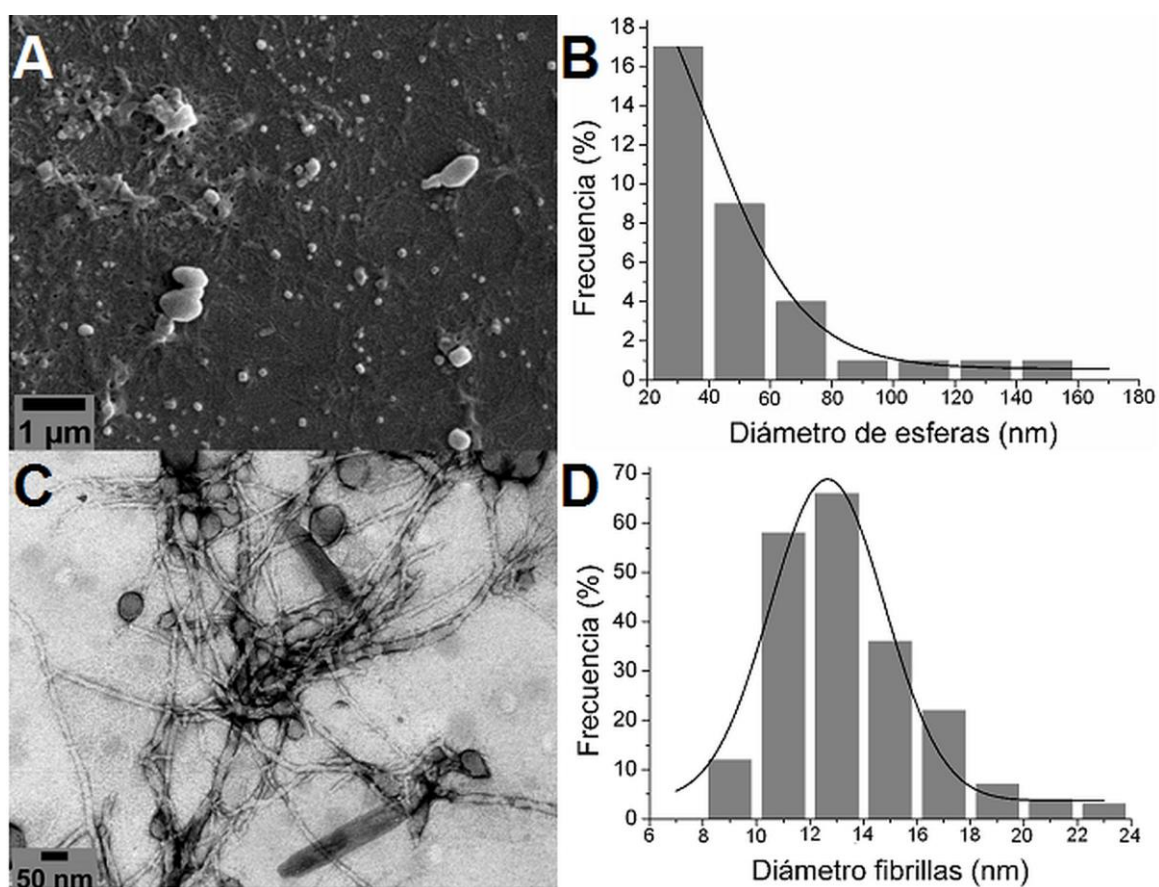


Figura 6.7 ME del péptido A en solución a pH 3 (t₀). A) SEM. B) Distribución de los diámetros de las nanoestructuras observadas en A. C) TEM. D) Distribución de los diámetros de las nanoestructuras determinadas en C.

⁵⁷ P. Y Bruice, *Organic Chemistry*, 4ta ed, Pearson Education, Inc (2004).

⁵⁸ G. Fichman, T. Guterman, J. Damron, L. Adler-Abramovich, J. Schmidt, E. Kesselman, L. J. Shimon, A. Ramamoorthy, Y. Talmon, E. Gazit, 'Spontaneous structural transition and crystal formation in minimal supramolecular polymer model' (2016), 2 *Sci. Adv.* (2), e1500827.

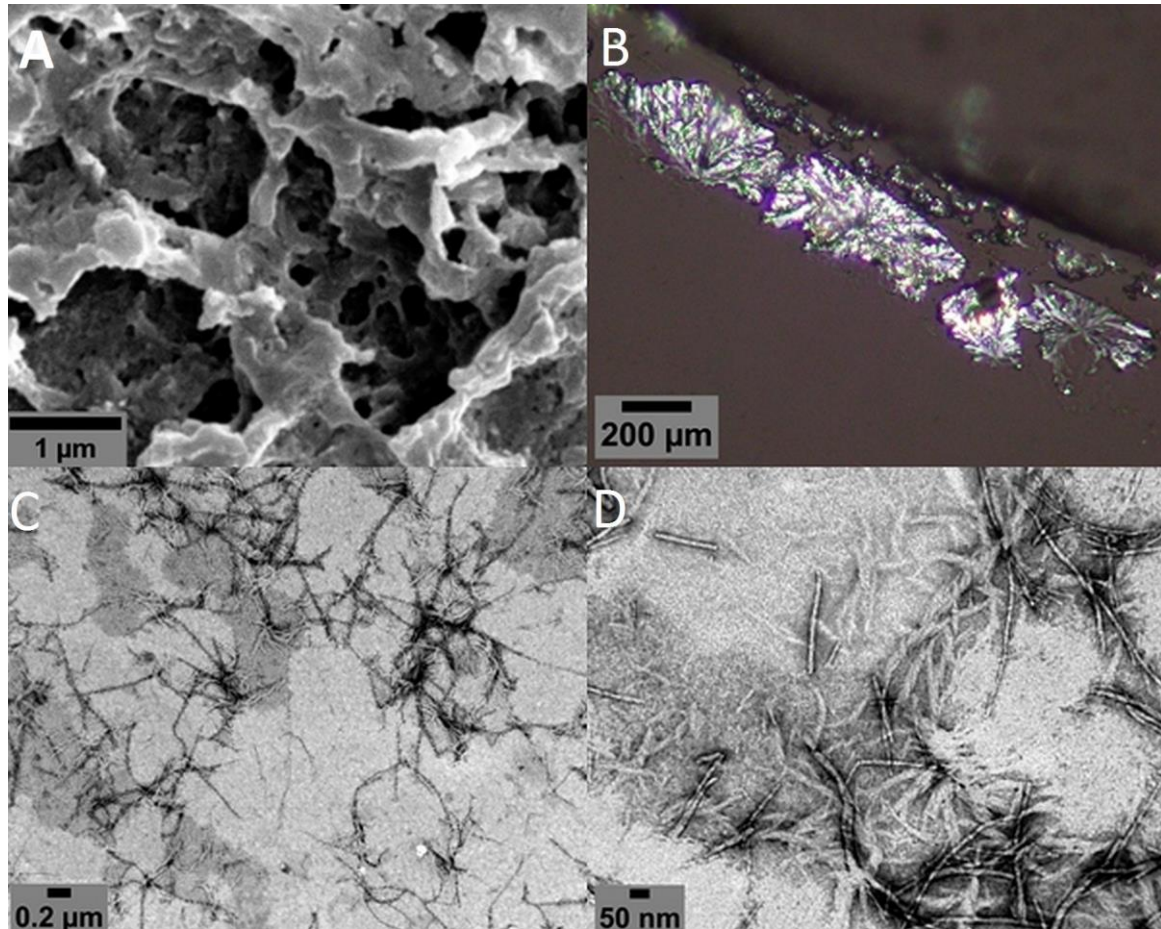


Figura 6.8 Distintas microscopías de la autoagregación del péptido A en solución a pH 3 (t_{24}) (24 horas). A) SEM. B) POM. C) TEM. D) Es un acercamiento de la imagen obtenida en C, se observa la ausencia de nanoesferas y la formación de entramados de fibras.

Teniendo en cuenta que la autoagregación del péptido A en solución a pH 3 luego de 24 horas se llevó a cabo en ausencia de scavengers de oxígeno, hipotetizamos que una vez que la agregación ha ocurrido la formación de enlaces disulfuro estaría favorecida por la cercanía de los grupos en el agregado, así esta reacción podría ocurrir al final del proceso de agregación estabilizando las estructuras finales.

6.4.2 Autoorganización a pH 3.0 en condiciones reductoras (TCEP)

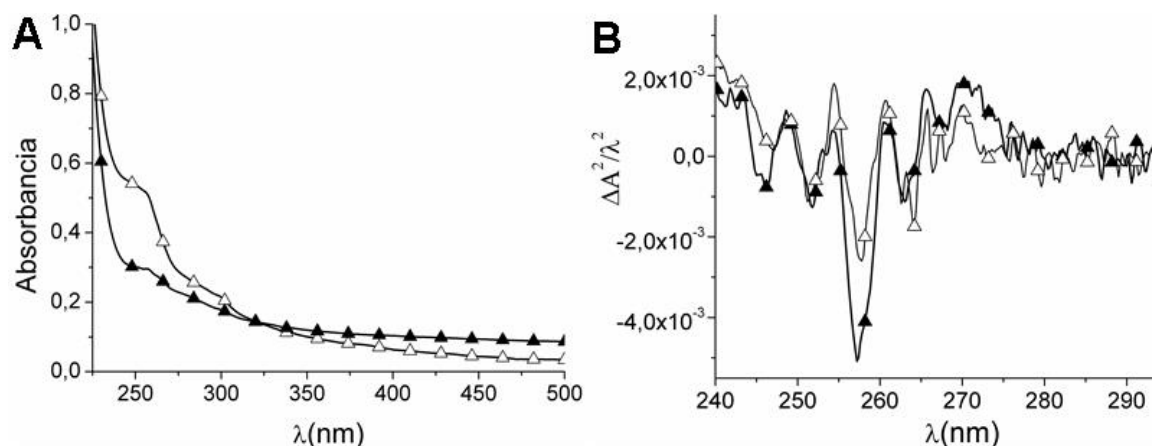


Figura 6.9 A) Espectros de UV-Vis de la solución del péptido A en agua a pH 3 t_{30} + TCEP t_{30} (Δ) y a pH 3 t_{24} +TCEP t_{24} (\blacktriangle). **B)** Derivada segunda correspondiente a (A).

En estas condiciones, se observó un desplazamiento hacia el azul del máximo de absorción desde 258.0 nm (para sistemas modelos) hacia 257.2 nm, sin observarse un cambio después de 24 hs. (Figura 6.9B) El valor encontrado es menor al observado en la condición sin el agregado de TCEP (257.6 nm), al final de la formación de los agregados fibrilares, por lo que los cromóforos están más expuestos al solvente en esta condición. El efecto hipocrómico del máximo, podría explicarse debido a la formación de agregados de mayor tamaño, que se correlaciona muy bien con el aumento de la absorbancia en la región mayor a 300 nm (Figura 6.9).

Por TEM, pudimos visualizar a ambos tiempos la formación de una estructura tipo gel, no muy definida (Figura 6.10), por lo que se podría hipotetizar que en estas condiciones reductoras, donde la formación del puentes disulfuros esta inhibida en todo el rango de tiempo de la reacción, las fibras finales no son tan robustas, como lo observado en la sección 6.4.1. No se observaron esferas ni cintas.

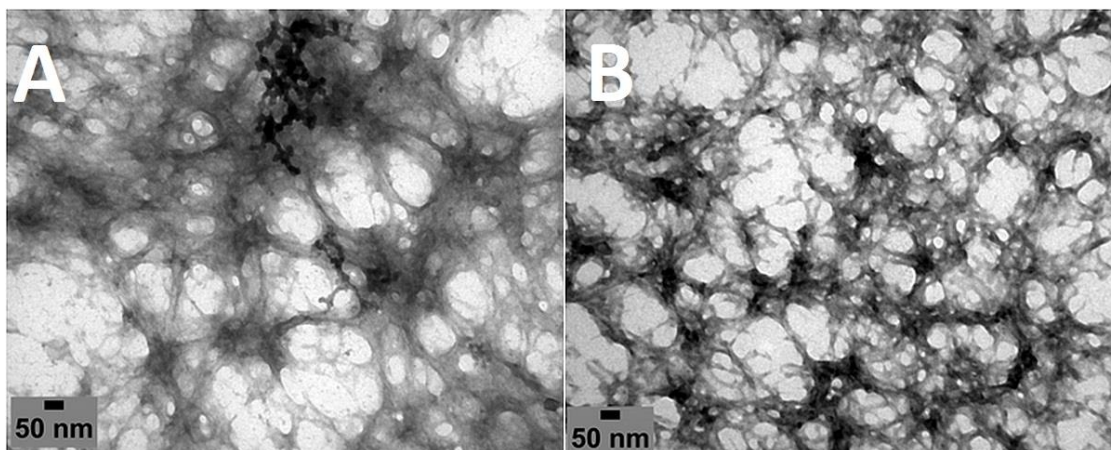


Figura 6.10 Imágenes TEM de la autoorganización del péptido A en solución a pH 3 en presencia de TCEP. **A)** Solución a pH 3 t_0 + TCEP t_0 . **B)** Solución a pH 3 t_{24} +TCEP t_{24} .

6.4.3 Autoorganización a pH 8.0 en condiciones oxidantes

A partir de espectroscopía UV-Vis evaluamos el proceso de oligomerización del péptido A en un medio oxidante al agregarlo a una solución acuosa a pH 8, expuesta al aire en el tiempo (Figura 6.11). Inicialmente se observó un desplazamiento atenuado hacia la zona del azul del espectro de absorción del $\lambda_{\text{máx}}$ del grupo Phe, de 257.8 nm (t_0) a 257.4 nm (t_{30}) (Figura 6.11B) indicando la exposición de los cromóforos al disolvente en los primeros 30 minutos de interacción. A partir de este aumento en la polaridad del microambiente del cromóforo hipotetizamos que el proceso de oligomerización inicial sería conducido por la oxidación de los grupos tiol de las cisteínas, dando lugar a la formación de enlaces disulfuro, que inducen la exposición de Phe al medio acuoso. Esto se debe a que en agua, la reclusión hacia el interior del enlace disulfuro está favorecido sobre las de dos cisteínas.⁵⁹ Tras 24 horas, el sistema evolucionó y se detectó un desplazamiento hacia el rojo de absorción, del $\lambda_{\text{máx}}$ desde 257.4 nm a 257.6 nm lo que significa que los grupos aromáticos estarían menos expuestos al solvente, este mismo valor se obtuvo para pH 3 $t_{24\text{hs}}$ en condiciones oxidantes. Es importante destacar que en esta condición se observó un ensanchamiento de la señal de absorbancia, lo que indica la presencia de diferentes microentornos. Posiblemente debido a la formación de agregados de monómeros, y también a la ionización del grupo cisteína, promovida a este pH, que catalizaría la formación de dímeros S-S cuando las moléculas están dispersadas y luego al final del proceso de agregación.

⁵⁹ A.J. Saunders, G.B. Young y G.J. 'Pielak, Polarity of disulfide bonds', (1993) 2 *Protein Sci.* 1183.

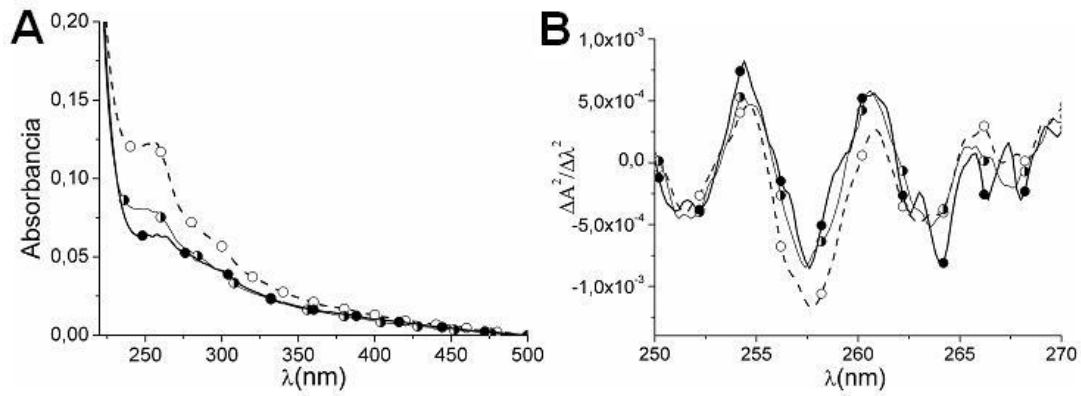


Figura 6.11: A) Espectro UV-Vis de la autoorganización del péptido A en solución a pH8 a t_0 (---○---) t_{30} (—○—) y t_{24hs} . (—●—) **B)** Derivada segunda.

Tras el inicio del ensamblaje (t_0), los experimentos de EM mostraron que la solución transparente contenía principalmente esferas de 34 nm de diámetro promedio (Figura 6.12 A y C). A continuación, simultáneamente con la aparición de agregados elongados similares a cintas (inicialmente 9,4 nm de diámetro promedio, Figura 6.12 B y D), se observó la extinción de las nanoesferas a los 30 minutos de incubación (diámetro promedio final de las cintas de 21 nm, Figura 6.13). Después de 24hs, estas cintas se organizarían en superestructuras de fibras empaquetadas en forma de manojos observadas por SEM y TEM (Figura 6.14).

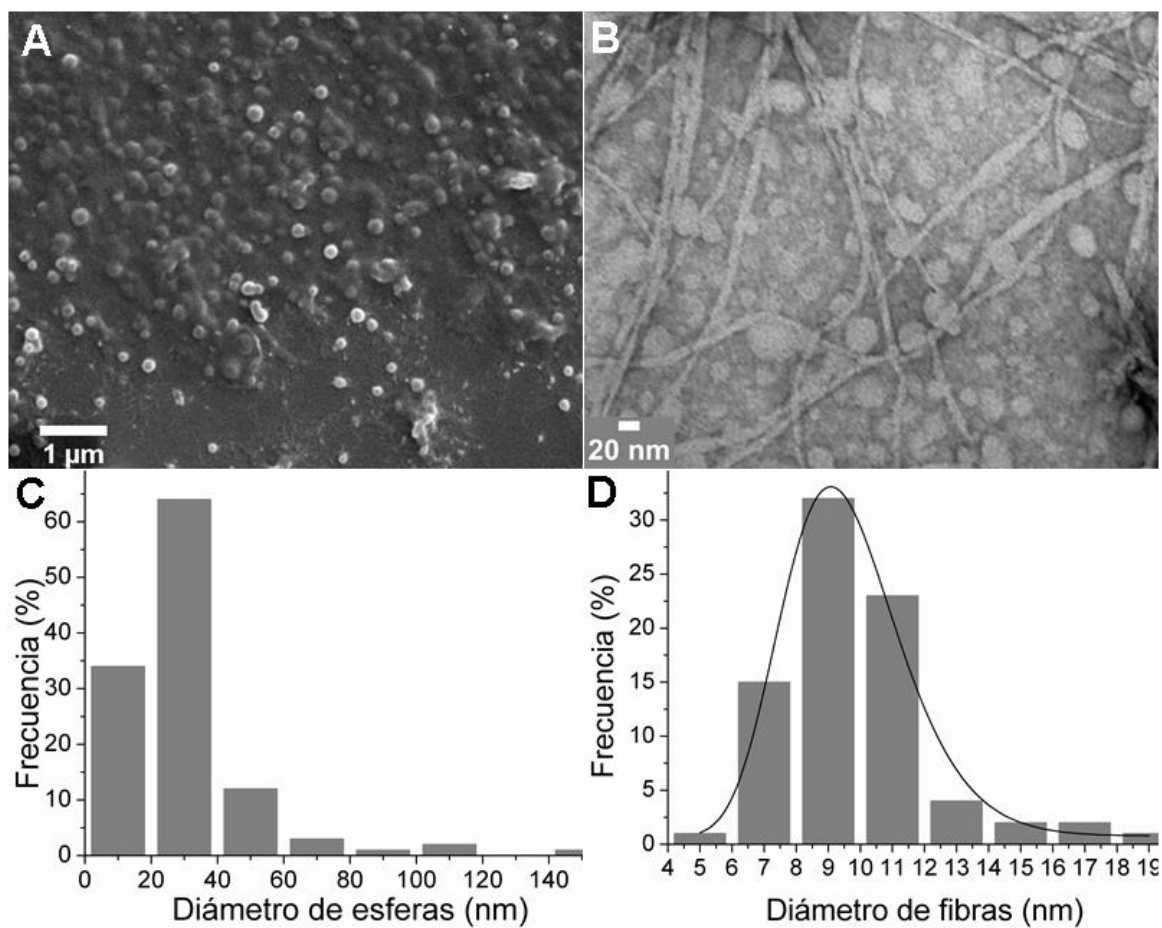


Figura 6.12 ME del péptido A en solución a pH 8 (t_0). A) SEM. B) TEM. C) Distribución de los diámetros de las nanoesferas observadas en (A). D) Distribución de los diámetros de las nanoestructuras determinadas en (B).

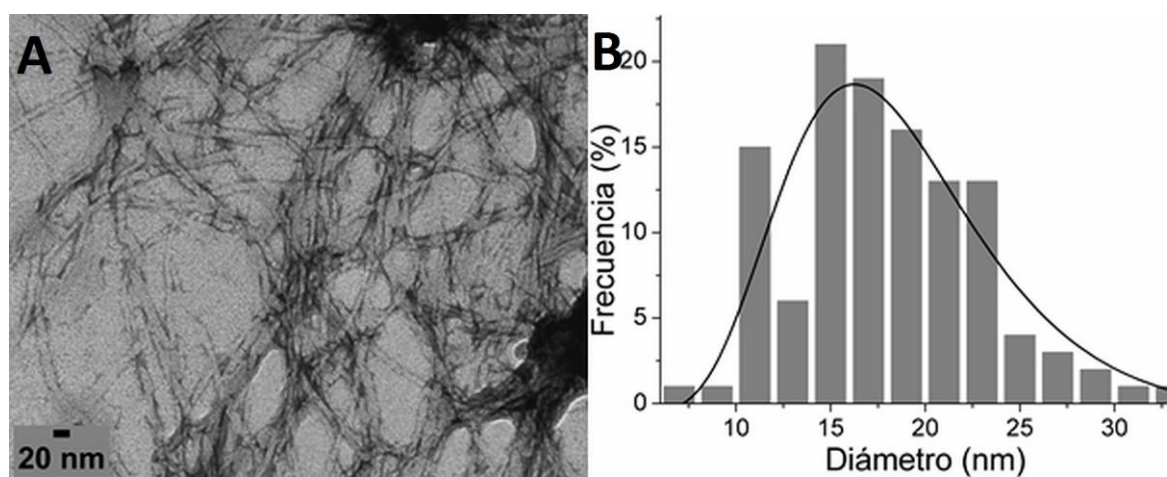


Figure 6.13 A) Microscopía TEM de la reacción del autoagregado del péptido A en solución a pH 8 ($t_{30\text{min}}$) B) Distribución de los diámetros de las nanoestructuras en forma de cintas determinadas en (A).

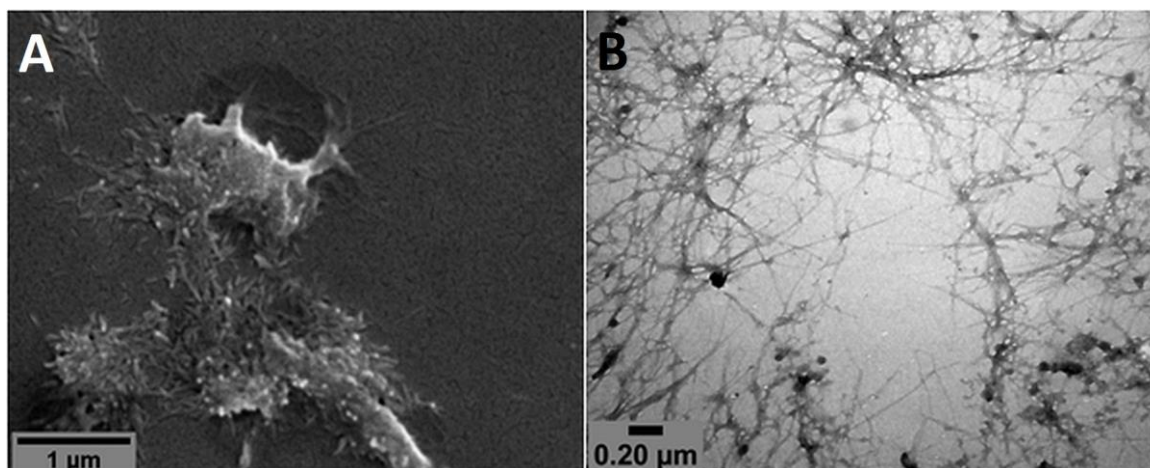


Figure 6.14 ME de la reacción del autoagregado del péptido A en solución a pH 8 ($t_{24\text{hs}}$) **A)** SEM **B)** TEM.

6.4.4 Autoorganización a pH 8.0 en condiciones reductoras (agregado de TCEP)

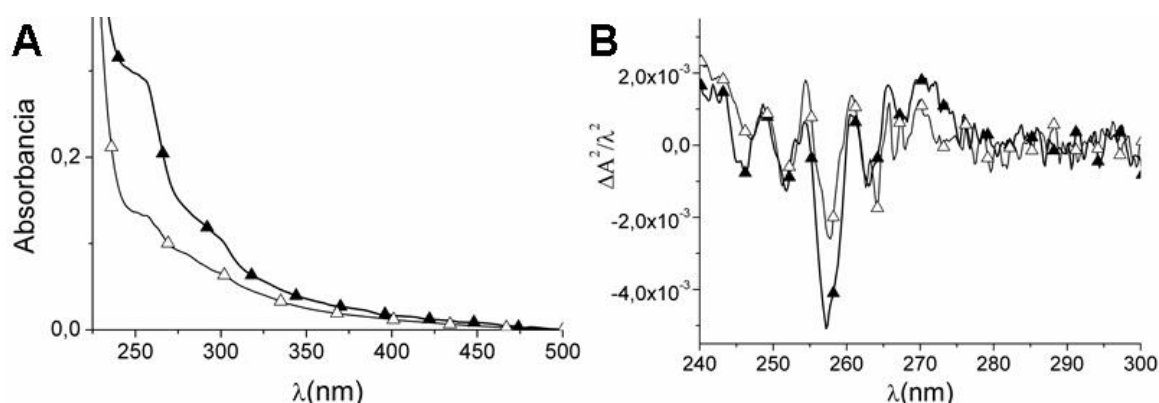


Figura 6.15 A) Espectro UV-Vis de la solución del péptido A en agua a pH 8.0 t_0 + TCEP t_0 (▲) y pH 8.0 t_{24} + TCEP t_{24} (Δ). **B)** Derivada segunda de los espectros obtenidos en A.

En esta condición, se inhibe la formación del enlace disulfuro, la banda correspondiente a la fenilalanina es menos ancha que en el experimento donde la dimerización era posible. (Figura 6.15) Además, se observa un desplazamiento inicial desde 258.0 nm (teórico) hacia 257.2 nm a t_0 , debido a que las fenilalaninas están más expuestas al medio polar, que luego a medida que el tiempo evoluciona se centra a 257.8 nm, mostrando que en el tiempo las fenilalaninas están menos expuestas al solvente en comparación con el tiempo inicial. Este efecto de desplazamiento hacia el rojo, así como los valores del índice de agregación están de acuerdo con la formación de al menos un tipo de agregado en esta condición.

Por microscopía electrónica, fue detectado inicialmente (t_0) nanoesferas tipo vesículas con un diámetro promedio de 58 nm (Figura 6.16). A las 24 hs de incubación (t_{24}) se pudo detectar la

presencia de cintas, en este caso además se observan pequeñas nanoesferas que este esta caso son muy parecidas a las observadas en la reacción control con TCEP puro, pensamos que son debida al oxido de trifenilfosfina obtenido por reducción del TCEP (ver Figura 6.17 y compararla con la Figura 6.5, TCEP puro). En este caso, como la dimerización esta inhibida por la presencia de TCEP, el agregado se debe a la autoorganización exclusiva de las moléculas de **A**. Las fibras finales a las 24 hs, tienen un diámetro de 13 nm. Teniendo en cuenta que estas condiciones son similares a las obtenidas a pH 3.0, donde hay una transformación esferas a fibras, es evidente que el aumento de pH y el agregado de TCEP disminuyen la velocidad de la transición, si lo comparamos con el experimento sin TCEP y pH 3.0 (sección 6.4.1). En ambos se favorece la autoorganización de los monómeros en lugar de los dímeros. Estos resultados son similares a lo reportado por Gazit con el péptido CFF¹², sin embargo en nuestro caso hay una clara evolución del sistema hacia la formación de las fibras.

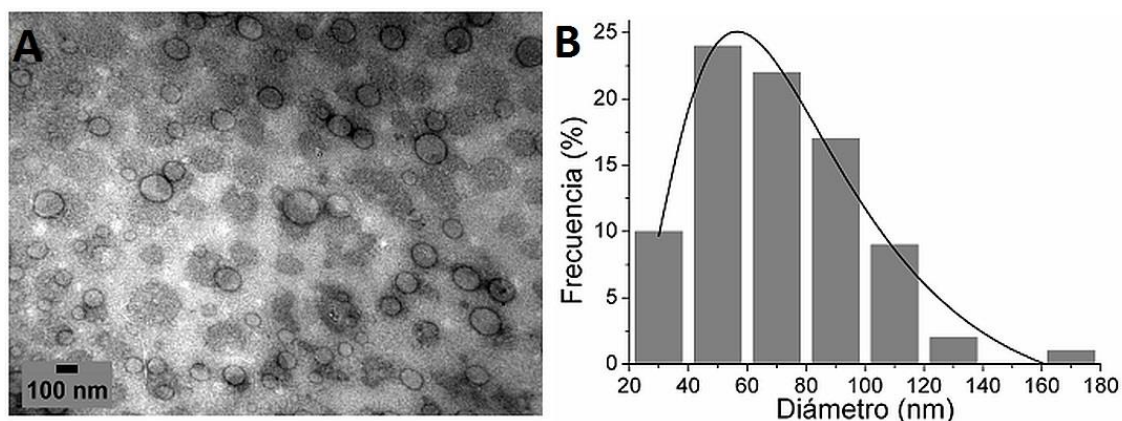


Figura 6.16 A) Microscopía TEM de la reacción del autoagregado del péptido A en solución a pH 8.0 t_0 + TCEP t_0 . B) Distribución de los diámetros de las nanoesferas determinadas en (A).

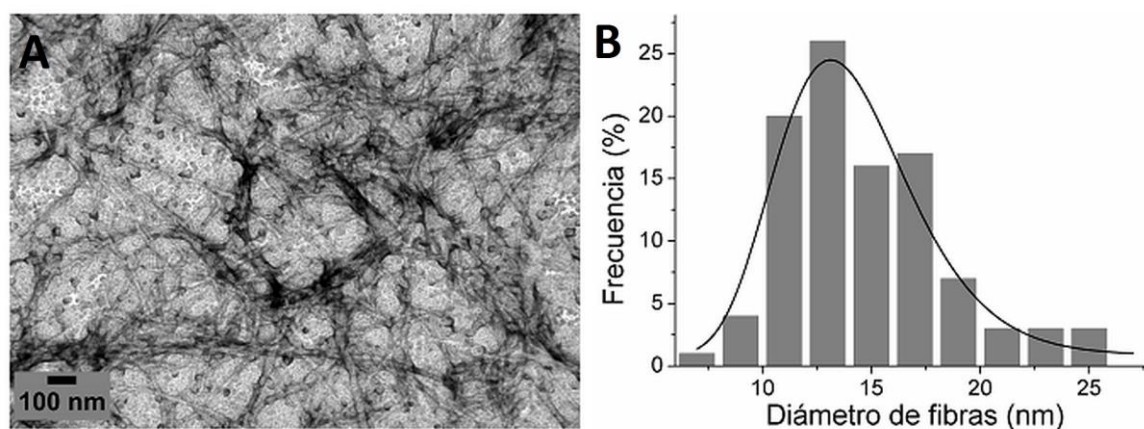
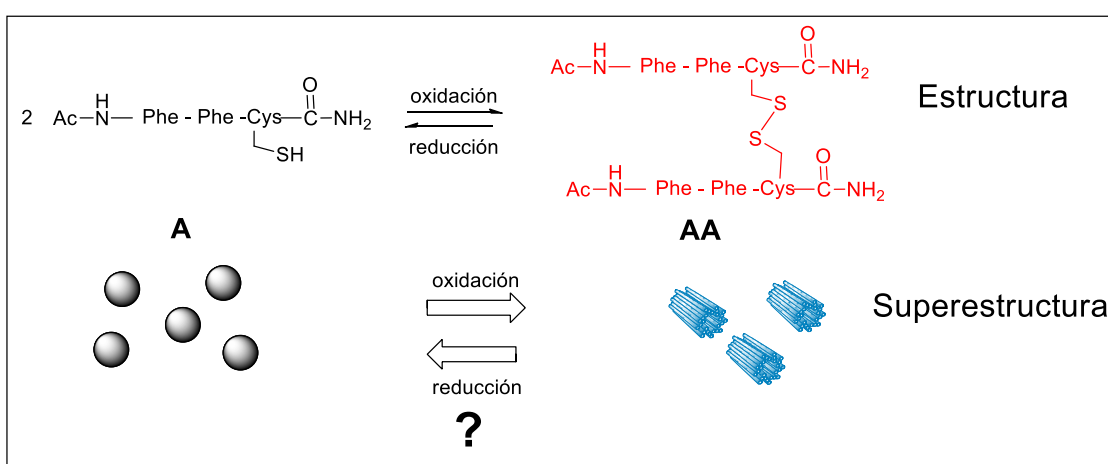


Figura 6.17 A) Microscopía TEM de la reacción del autoagregado del péptido A en solución a pH 8.0 t_{24} + TCEP t_{24} . B) Distribución de los diámetros de las nanocintas determinadas en (A).

De este experimento podemos concluir, que a pH 8.0 el agregado de TCEP hace más lenta la transición de esferas a fibras, a diferencia del efecto a pH 3.0 donde el agregado de TCEP, hace que no seamos capaces de detectar la formación de las esferas.

6.5. Modulación de la capacidad de autoorganización mediada por estímulos externos

Finalmente, nos propusimos modular el proceso de agregación una vez formadas las fibras, en función de la adición de TCEP. Para ello trabajamos con las fibras obtenidas a pH 8, estabilizadas por 7 días, a las cuales se les agrego un pequeño volumen de TCEP (50 µL, concentración final de TCEP: 1,40 µM) a modo de no modificar la concentración final del sistema.



Esquema 6.3 Hipótesis del autoensamblado mediado por estímulos.

Se calculó el índice de agregación (Tabla 6.3), observándose que ocurría una disminución considerable del IA desde 23.2% a 2.0% en función de tiempo de reacción con el agente reductor, lo que se traduce como una disminución de la agregación del sistema en estas condiciones reductoras.

Condiciones del solvente	I.A. (%) Peptido A
pH8 fibras	23,2
pH8 fibras + TCEP t ₀	18,9
pH8 fibras + TCEP t _{1h}	11,1
pH8 fibras + TCEP t _{24h}	2,0

Tabla 6.3. Índice de agregación de la reacción antes y después del agregado de TCEP.

El análisis del máximo de λ en la derivada segunda, mostró un corrimiento hacia el azul del espectro, desde 257.6 m hacia 257.4 nm luego de las 24 horas de agregado el TCEP, lo que es

una evidencia de que los grupos aromáticos de las fenilalaninas se encuentran en un entorno cada vez más polar, es decir más expuestos al agua (Figura 6.18).

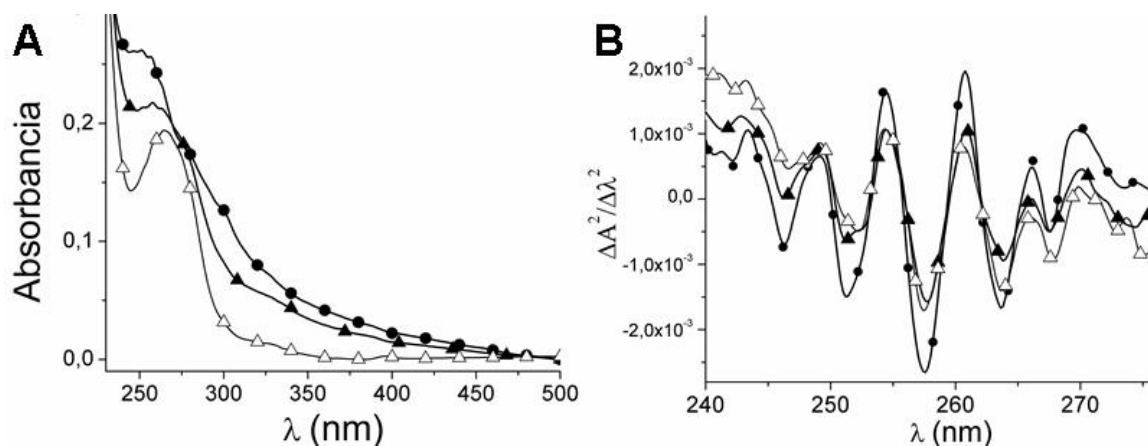


Figura 6.18 A) Espectro UV-Vis del péptido A incubado por 7 días: pH 8 fibras (●); pH 8 fibras + TCEP t_0 (▲); pH 8 fibras + TCEP t_{24hs} (△). B) Derivadas segundas de los espectros de (A).

Finalmente, el sistema se evaluó por microscopía electrónica, detectándose una transición de fibras de 17.8 nm de diámetro promedio (Figura 6.19) hacia agregados de tipo anillos, que estarían compuestos de nanoesferas y nanotubos de 56.6 nm (Figura 6.20), para luego formar nanoestructuras tipo vesículas de 28.9 nm. Estas últimas formaban parte de micro-vesículas, como pudo observarse en la Figura 6.21.

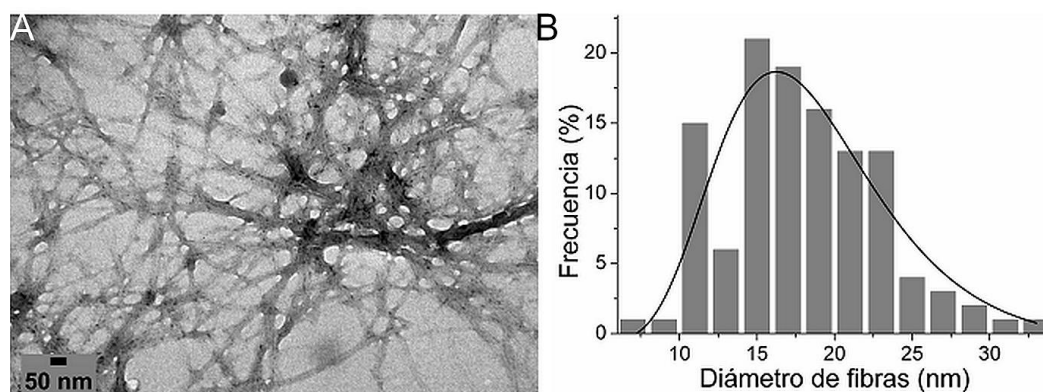


Figura 6.19 A) TEM de las fibras estabilizadas del péptido A obtenidas a pH 8 (pH 8 fibras). B) Distribución de los diámetros de las nanofibras observadas en (A).

Una mejor inspección de las nanoestructuras después de la adición de TCEP, muestra que los anillos están compuestos por esferas, que se organizan en tubos, para finalmente ensamblarse en anillos (Figura 6.20B).

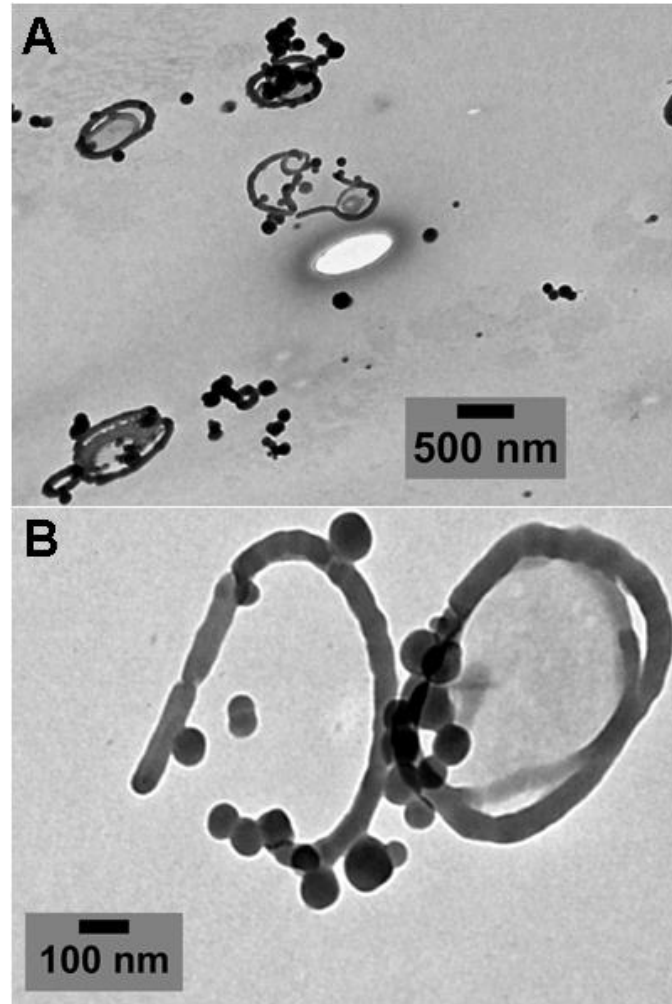


Figura 6.20 A) TEM de las fibras del péptido A en condiciones reductoras a tiempo 0 (pH 8 fibras + TCEP t_0)
B) Ampliación de A, observándose la organización de esferas a anillos.

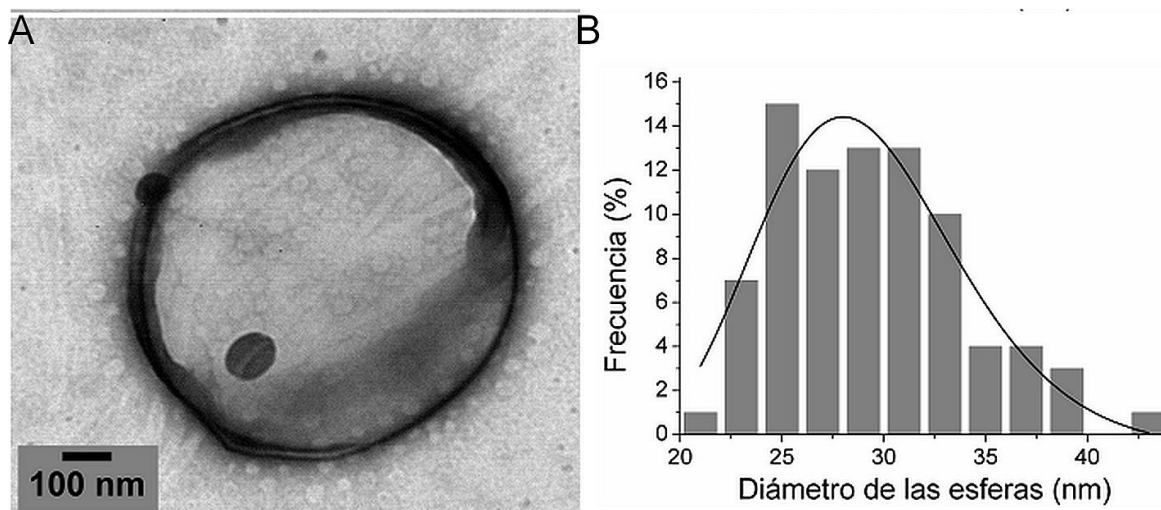


Figura 6.21 A) TEM de las fibras del péptido A en condiciones reductoras a tiempo 24hs. (pH 8 fibras + TCEP t_{24hs}). B) Distribución de los diámetros de las nanoestructuras determinadas en (A).

La morfología de las esferas formadas inicialmente es muy diferente a las obtenidas luego de las 24 h., que tienen apariencia de vesículas.

Estos resultados, nos permiten hipotetizar que la reducción de los enlaces S-S lleva a cambios estructurales importantes, donde es posible observar una transición fibras-tubos-vesículas en función del tiempo.

6.6 Conclusión y Perspectivas

En este capítulo hemos descrito la síntesis de un nuevo **tripéptido A** (AcFFCNH_2) utilizando una metodología simple y eficiente en fase sólida. Este compuesto es soluble en HFIP a la concentración de 2 mM. Hemos evaluado la capacidad de formación de nanoestructuras del péptido **A** mediada en primera instancia por el solvente a pH 3.0 y pH 8.0 en condiciones oxidantes y también reductoras por el agregado de TCEP. En estas condiciones observamos que el péptido **A**, forma nanoestructuras tipo vesículas, las cuales sufren una transición esfera-cinta-fibra en función del tiempo, observando en todos los casos a las 24 h., la formación de manojos de fibras, las cuales fueron más robustas a pH 3.0 en condiciones oxidantes. A pH ácido, el agregado de TCEP aumenta la velocidad de formación de las fibras, aunque las fibras finales son menos robustas. Al contrario ocurre a pH 8.0, donde la velocidad de generación de las fibras es más lenta con el agregado de TCEP. A la vista de los resultados es evidente que tanto los monómeros **A** o los dímeros **AA** son capaces de formar nanoestructuras similares.

Finalmente llevamos a cabo la reducción mediada por TCEP de las fibras obtenidas a pH 8.0. En este caso, observamos que la adición de TCEP rompió instantáneamente los manojos de

fibras y formó inicialmente anillos compuestos por nanoesferas sólidas y nanotubos. Finalmente el sistema evoluciono hacia la formación de agregados tipo vesículas.

Puesto que la funcionalidad de estas arquitecturas está intrínsecamente ligada a su estructura jerárquica y a su morfología, las cuales a su vez son consecuencia de una compleja historia de auto-ensamblaje, proponemos avanzar en el estudio de la elucidación de los mecanismos de este modelo minimalista pero complejo para una mejor comprensión del proceso de autoagregación proteica.

Capítulo VII

Parte Experimental

7.1 Materiales y Métodos del Capítulo III

7.1.1 Materiales

Los anfililos estudiados y sus precursores se obtuvieron experimentalmente mediante reacciones realizadas con reactivos disponibles comercialmente. La purificación de cada uno de ellos se llevó a cabo por distintas técnicas, principalmente recristalización y cromatografía en columna.

Todos los solventes utilizados fueron purificados por destilación, previo secado sobre agente desecante. Los agentes desecantes empleados fueron activados previamente por calentamiento en estufa.

Las reacciones que debieron resguardarse bajo condiciones inertes, se desarrollaron o almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno.

El control del avance de las reacciones se llevó a cabo utilizando cromatofolios de silicagel-60 F 254 "Merck". El revelado de los cromatogramas en capa fina se realizó por visualización con luz ultravioleta de longitudes de onda 254 nm y/o en solución reveladoras: p-Anisaldehído, Cerio molibdeno (Pancaldi) y Fosfomolibdico.

Para las cromatografías en columna se utilizó como relleno óxido de alúmina neutro "Fluka AG, Bursch SG". La columna fue preparada compactando una suspensión del adsorbente en el solvente adecuado, evitando la presencia de burbujas y fisuras en el relleno. Las fracciones eluidas fueron agrupadas en función de los resultados observados por cromatografía en capa fina.

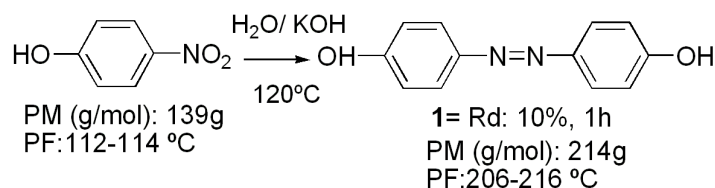
Los puntos de fusión y transiciones de mesofases fueron determinados en un microscopio Karl Zeiss, modelo Phomi III POL y la platina calefactora es marca Mettler modelo FP52. Al estar provisto de polarizadores, fue posible un seguimiento más preciso de los cambios en las estructuras cristalinas de los compuestos.

Los espectros de RMN para la caracterización estructural de los compuestos se registraron en la Universidad Nacional del Sur (^1H y ^{13}C) con un espectrómetro FT-NMR modelo Avance III 300, marca Bruker, con frecuencias de 300 MHz para ^1H -RMN y 75 MHz para ^{13}C -RMN. Los espectros ^1H -RMN para el estudio de la fotoisomerización y fotoreversión se realizaron y con un espectrómetro FT-NMR modelo Avance 600, marca Bruker (600 MHz) en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

Los espectros de masas, utilizando diferentes técnicas de ionización, EM-FAB; EM-AR, fueron obtenidos en la Universidad de Santiago de Compostela, España, a partir de un Espectrómetro Micromass AUTOSPEC, y en la Universidad de Bielefeld, Alemania, a partir de un Espectrómetro EM-Maldi-Tof, modelo Voyager System 1161, marca Applied Biosystems.

7.1.2 Síntesis de compuestos anfifílicos

7.1.2.1 Reacción de obtención de 4, 4'-hidroxiazobenceno



La reacción inicial comprendió la síntesis de 4, 4'-hidroxiazobenceno y fue llevada a cabo según el método descrito en bibliografía¹ de Willstatter y Benz.² En un balón de dos bocas conteniendo un agitador magnético, se colocó 5,00 g de p-nitrofenol (35,95 mmoles) y 25 g de KOH (380 mmoles) en 5 mL de agua MilliQ. Se llevó a reflujo a 120 °C y se fue incrementando la temperatura lentamente por 1 h. Cuando la temperatura llegó a 195-200 °C, la reacción comenzó vigorosamente a dar un líquido viscoso marrón con un gran número de burbujas en desarrollo. Una vez completada la reacción, los productos se disolvieron en 40 mL agua. Se acidificó a pH 3 agregando una solución de HCl concentrado, observándose un crudo de reacción color rojo oscuro y se procedió a la extracción en ampolla de decantación con éter etílico. Los extractos de éter combinados se secaron sobre Na₂SO₄ durante una noche. El éter se eliminó a sequedad bajo presión reducida con rotavapor. El residuo se recrystalizó en solución acuosa al 50% (v/v) de etanol. Al observar diferencias entre el PF experimental (120°C) y el teórico³ (204-214 °C) se repitió la recrystalización hasta un total de 10 veces, para dar cristales amarillos del compuesto 1. El seguimiento de la purificación se realizó por TLC de gel de sílice, utilizando como eluyentes hexano: acetato de etilo (1:1). R_f = 0.32. Se observó por microscopía con placa calefactora, en el sólido purificado, un cambio en la forma de los cristales a 105-120 °C y la fusión total entre 213-216 °C. El compuesto 4,4' dihidroxiazobenceno, soluble en ACN y acetona, se obtuvo con un 10% de rendimiento.

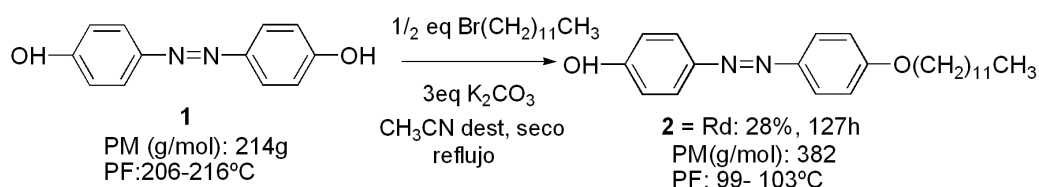
¹ H. Okuno et al., 'Selective Synthesis and Kinetic Measurement of 1:1 and 2:2 Cyclic Compounds Containing 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane and Azobenzene Units' (2000) 65 *J. Org. Chem.* 8979.

² R. Willstatter y M. Benz (1906) 339 *Chem. Ber.* 3492.

³ *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 39, III, pag 3497.

Se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el producto puro, asignándose las siguientes señales: ^1H -RMN (CD_3CN 300 MHz) δ (ppm): 6.95 (d, $J = 8.90$, 4H); 7.77 (d, $J = 8.91$, 4H); 8.12 (s, 2H). ^{13}C -RMN (CD_3CN) δ (ppm): 116.71; 118.24; 125,21; 160.42.

7.1.2.2 Reacción de obtención de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno

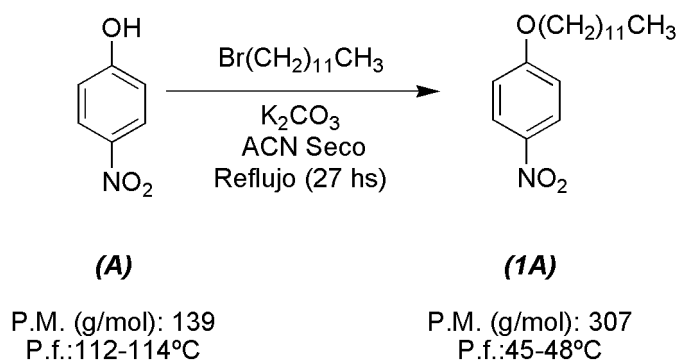


Para la obtención del compuesto 2 (4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno) se colocaron en un balón 200 mg de 4,4' dihidroxiazobenceno (0,935 mmoles) y 3 eq de K_2CO_3 seco (2,805 mmoles) en 20 mL de ACN previamente secado (se optimizó la síntesis al cambiar el solvente acetona, propuesto por Kim y colaboradores,⁴ por ACN). Se agregaron 0,11 ml (0,4675 mmoles) de bromuro de dodecilo y se adaptó un refrigerante a reflujo a la boca del balón, previo purgado del sistema con N_2 . La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo a 40 °C durante 3.30 horas, y luego 2hs. más a temperatura ambiente. El avance de la reacción se controló por TLC de sílice gel, utilizando como eluyentes hexano: acetato de etilo (1:1). $R_f = 0.58$. El crudo de reacción fue filtrado en embudo con placa sinterizada cubierta por Celite. Se observó por RMN la mezcla de productos dialquilado y monoalquilado por lo que se procedió a recrystalización en hexano. El compuesto 2, 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno fue obtenido con un 28% de rendimiento.

Se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el producto puro, asignándose las siguientes señales: ^1H - RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.88 (t, 3H, $J^3 = 6.9$ Hz, CH_3), 1.27-1.47 (m, 18H, CH_2), 1.81 (m, 2H, CH_2), 4.03 (t, 2H, $J^3 = 6.0$ Hz, OCH_2), 4.63 (s, 1H, OH), 6.93 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz, Ar-H), 6.98 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz Ar-H), 7.81 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz Ar-H), 7.85 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz, Ar-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.07 (CH_3), 22.67, 26.03, 29.22, 29.33, 29.38, 29.56, 29.58, 29.62, 29.65, 31.91 (CH_2), 68.40 (OCH_2), 114.72, 115.76, 124.33, 124.51, 146.91, 147.23, 161.27(Ar-C).

⁴ Y. Kim et al., 'Copper-catalyzed conjugate addition on macrocyclic, cyclic, and acyclic enones with a chiral phosphoramidite ligand having a C2-symmetric amine moiety' (2002) 13 (8) *Tetrahedron: Asymmetry* 801.

7.1.2.3 Reacción de obtención de 1-dodeciloxi-4-nitrobenzono (1A)



En un balón de dos bocas conteniendo un agitador magnético, se colocó 1,00 g (7,19 mmoles) de p-nitrofenol **(A)** y 20 ml de ACN seco y se mantuvo la agitación hasta disolución completa. Luego fue agregado 5,96 g (43,16 mmoles) de K₂CO₃ seco, se adaptó un refrigerante a reflujo a la boca del balón y se llevó a cabo el purgado del sistema. Para finalizar, se adicionó 2,10 ml (2,15 g; 8,63 mmoles) de bromuro de dodecilo y 20 ml del mismo solvente. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 27 horas. El crudo de reacción fue filtrado en embudo con placa sinterizada cubierta por Celite. El sobrenadante fue sometido a evaporación por presión reducida para eliminar el solvente. A partir de una cromatografía en columna (alúmina neutra) se logró purificar el producto. Como mezclas de elución se utilizaron hexano y hexano: acetato de etilo (80:20). Se obtuvieron 1,98 g (6,45 mmoles; **90%**) de 4-dodeciloxi-nitrobenzono **(1A)**.

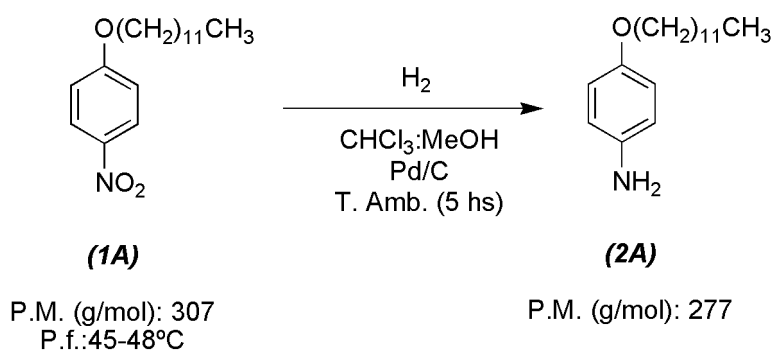
El avance de la reacción fue seguido mediante cromatografía de capa fina, con cubas compuestas por hexano y CHCl₃:CH₃OH (10:1), observándose valores de R_f=0.13 y R_f=0.62 para el bromuro de dodecilo y el producto, respectivamente. Las distintas fracciones obtenidas durante la purificación también fueron identificadas por TLC con cámara de hexano (R_f= 0.10 para el producto).

Se obtuvieron los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN para el producto puro, asignándose las siguientes señales:

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0.88 (t, 3H, J³= 6.9 Hz, CH₃), 1.27-1.47 (m, 18H, CH₂), 1.82 (m, 2H, CH₂), 4.05 (t, 2H, J³= 6.0 Hz, OCH₂), 6.93 (d, 2H, J³= 9.0 Hz, Ar-H), 8.19 (d, 2H, J³= 9.0 Hz, Ar-H).

¹³C-RMN (CDCl₃) δ (ppm): 14.07 (CH₃), 22.67, 25.91, 28.98, 29.29, 29.32, 29.52, 29.56, 29.62, 29.63, 31.91 (CH₂), 68.93 (OCH₂), 114.41, 125.8, 141.4, 164.26 (Ar-C).

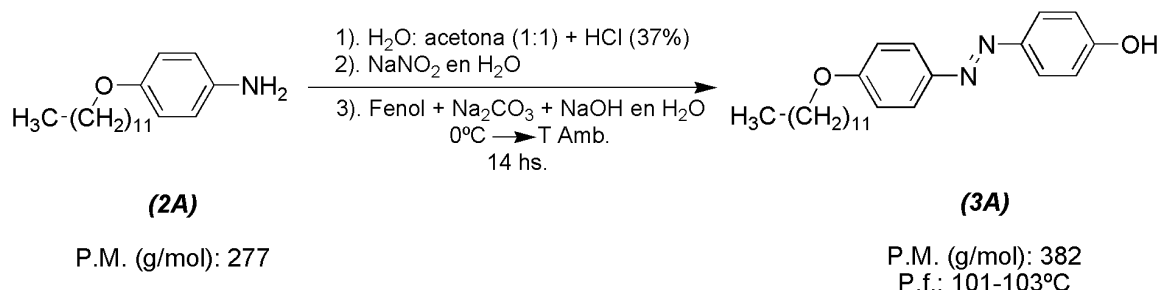
7.1.2.4 Síntesis de 4-dodeciloxianilina (2A)



En un balón de dos bocas conteniendo un agitador magnético, se colocó 0,30 g (0,98 mmoles) de 1-dodeciloxy-4-nitrobenzene (1A). Se agregó 10 ml de CHCl₃ anhidro y se mantuvo en agitación hasta que se produjo la disolución completa. Luego se adicionó 8,6 ml de MeOH y se llevó a cabo el purgado del sistema utilizando N₂. Para continuar, se colocó 50 mg al 10% del catalizador de Pd/C (cantidad equivalente a dos puntas de espátula pequeña) y el equipo fue purgado con hidrógeno. El sistema se mantuvo bajo atmósfera de hidrógeno durante 4-6 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se filtró sobre embudo con placa sinterizada cubierto de Celite y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto (2A) se mantuvo en frío (3-5°C) y bajo atmósfera inerte de N₂. Se considero 100% de conversión por evaluación de la TLC en cuba de hexano: éter etílico (1:1), donde el producto presenta un R_f=0.13.

Comentarios: La apariencia física del producto (2A) es notablemente diferente a la del compuesto de partida (1A): la presencia de un sólido gris rosáceo brillante al final de la reacción comprueba el éxito de la reducción.

7.1.2.5 Síntesis de 4-dodeciloxy-4'-hidroxiazobenceno (3A)



Se adaptó un protocolo de la reacción de obtención de una sal de diazonio publicada por Kunitake y colaboradores.⁵ Se prepararon tres tubos de vidrio, todos provistos con agitadores magnéticos, en los que fue colocado:

TUBO Nº 1. 4,51 ml de la mezcla H₂O: Acetona (1:1) y 0,45 mL de HCl concentrado. Se mantuvo a temperatura ambiente y bajo agitación.

TUBO Nº 2. 93,15 mg (1,35 mmoles) de NaNO₂ purificado⁶ y 2,25 ml de H₂O. Se cerró con un séptum, y se agitó bajo atmósfera inerte y en baño de hielo y sal (0°C).

TUBO Nº 3.⁷ 131,6 mg de fenol (1,40 mmoles), 229,0 mg (2,16 mmoles) de Na₂CO₃, 52,86 mg (1,32 mmoles) de NaOH y 3,78 ml de H₂O MilliQ por las paredes del tubo. Se tapó con un séptum y se mantuvo la agitación bajo atmósfera inerte y baño de hielo y sal.

En primera instancia, el contenido del **TUBO Nº 1** fue vertido dentro del balón conteniendo 271,46 mg (0,98 mmol) del producto de la reducción (**2A**), provisto de agitador magnético y en condiciones de atmósfera inerte (N₂). Se dejó agitar unos minutos hasta que se observó la disolución total del sólido. El sistema fue llevado a 0°C en un baño de hielo y sal. Al mismo balón, posteriormente, se incorporó el contenido del **TUBO Nº 2** utilizando una jeringa limpia cuidando que la temperatura no sobrepase los 0°C. Seguidamente, se mantuvo tanto al balón de reacción, así como al **TUBO Nº 3**, en agitación, a 0°C en sendos baños de hielo y sal, y bajo atmósfera inerte, durante 1 hora. Para finalizar, utilizando un sistema compuesto por una aguja metálica larga adosada a una jeringa, previamente enfriado antes de cada agregado, se fue adicionando lentamente pequeñas porciones del contenido del balón de reacción dentro del **TUBO Nº 3**. Se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y atmosfera para la nueva mezcla de reacción bajo continua agitación por 1 hora adicional, para posteriormente alcanzar espontáneamente la temperatura ambiente al derretirse el hielo. Luego de 14 horas de agitación, se procedió a medir el pH del crudo de reacción. Como el mismo resultó ser básico, se adicionó ácido acético hasta alcanzar la neutralidad. El precipitado obtenido de esta forma fue filtrado en un embudo con placa sinterizada cubierta por papel de filtro. Posteriormente se realizaron sucesivos lavados con H₂O marca MilliQ hasta observarse la ausencia de fenol en el

⁵ T. Kunitake et al., ' Formation of Stable Bilayer Assemblies in Water from Single-Chain Amphiphiles. Relationship between the Amphiphile Structure and the Aggregate Morphology' (1981) 13 (18) *J.Am.Chem.Soc.* 5401.

⁶ El NaNO₂ fue purificado según el procedimiento indicado en el manual "*Purification of laboratory chemicals*", pág 495, Perring, 6ª edición.

⁷ Como en este recipiente finaliza la reacción, debe utilizarse uno cuya capacidad sea suficiente para contener las cantidades de reactivos y solventes con que se trabaje.

sobrenadante. Así purificado, el compuesto fue recuperado con CHCl_3 , y obtenido en estado sólido por evaporación del solvente a presión reducida en rotavapor. Se obtuvo 0,291 g (0,76 mmoles; **78 %**) del producto sólido **3A**. El compuesto obtenido es de color pardo y presenta gran adherencia a las superficies. La purificación del producto fue controlada a partir de cromatografías en capa fina corridas en una cámara de hexano: éter etílico (1:1), donde se registró un $R_f = 0.40$ para el mismo.

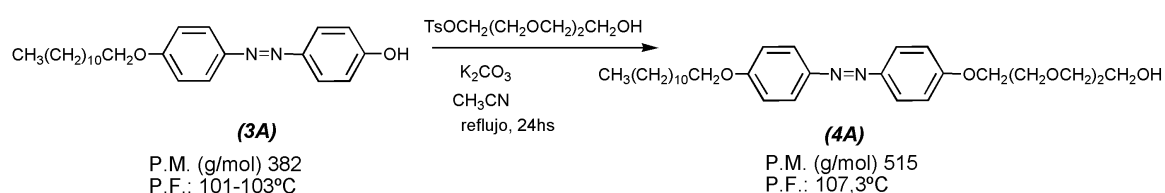
El producto fue caracterizado a partir de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN:

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.88 (t, 3H, $J^3 = 6.9$ Hz, CH_3), 1.27-1.47 (m, 18H, CH_2), 1.81 (m, 2H, CH_2), 4.03 (t, 2H, $J^3 = 6.0$ Hz, OCH_2), 4.63 (s, 1H, OH), 6.93 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz, Ar-H), 6.98 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz Ar-H), 7.81 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz Ar-H), 7.85 (d, 2H, $J^3 = 9.0$ Hz, Ar-H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 14.07 (CH_3), 22.67, 26.03, 29.22, 29.33, 29.38, 29.56, 29.58, 29.62, 29.65, 31.91 (CH_2), 68.40 (OCH_2), 114.72, 115.76, 124.33, 124.51, 146.91, 147.23, 161.27(Ar-C).

EM-FAB: (m/z): 382,10 ($\text{M}^+ + 1\text{H}^+$)

7.1.2.6 Síntesis de 4-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4A)



Se purgó con N_2 una suspensión conteniendo 75mg (0.197mmol) de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno y 300 mg (2.17 mmol) de K_2CO_3 , y luego fueron agregados 63 mg (0.207 mmol) de trietilenglicol p-toluensulfonilo en 10 mL de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo (80 °C) por 24 horas y luego se filtró en un embudo con placa sinterizada cubierta por papel de filtro. No debe usarse Celite porque forma un precipitado. El sólido fue purificado por columna cromatográfica utilizando óxido de aluminio neutro como adsorbente y como mezcla de eluyentes CH_2Cl_2 : MeOH, (1 vol.: 45 mL) El producto se recuperó al 3^{er} volumen en una relación de solventes 99:1. De esta manera se obtuvo **4A** puro con un **75%** de rendimiento como un sólido amarillo. El control de la purificación se realizó con TLC de sílice gel, utilizando como eluyentes hexano: acetona (1:1). $R_f = 0.45$, y CH_2Cl_2 : MeOH (10:1), $R_f = 0.50$.

Las señales obtenidas en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto purificado fueron:

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.88 (t, 3H, $J^3 = 6.9$ Hz, CH_3), 1.27-1.47 (m, 18H, CH_2), 1.81 (m, 2H, CH_2), 2,08 (s, 1H-, OH); 3,61-3,74 (m, 8H, CH_2); 3,90 (t, 2H, $J^3 = 6.0$ Hz, CH_2); 4.03 (t, 2H, $J^3 = 6.0$

Hz, OCH₂), 4,22 (t, 2H, $J^3 = 6.0$ Hz, CH₂); 6.99 (d, 2H, $J^3 = 8.93$ Hz, Ar-H); 7.00 (d, 2H, $J^3 = 8.96$ Hz, Ar-H), 7.87 (d, 4H, $J^3 = 8.90$ Hz, Ar-H).

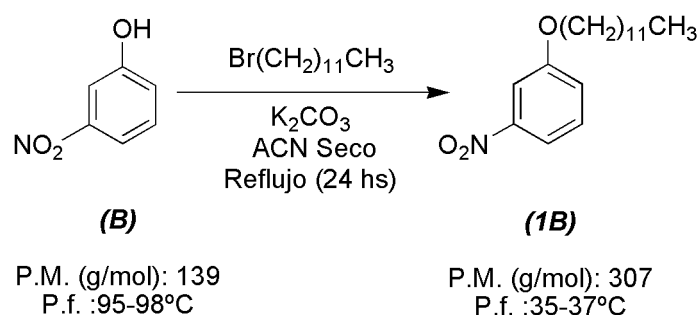
¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 14.10 (CH₃), 22.68, 26.00, 29.22, 29.33, 29.40, 29.50, 29.60, 29.63, 29.65, 31.91 (CH₂), 61.8, 69.15, 69.71, 70.45, 70.59, 70.90, 72.50 (OCH₂), 114.71, 114.85, 124.26, 124.32, 146.97, 147.32, 160.65, 161.28 (Ar-C).

Las señales obtenidas en los espectros de masas fueron

EM-FAB: (m/z): 515,40 ($M^+ + 1H^+$)

EMAR: calculado para C₃₀H₄₇N₂O₅: 515,3485. Encontrado: 515,3497.

7.1.2.7 Síntesis de 3-dodeciloxi-nitrobencono (1B)



En un balón de una boca provisto de agitador magnético, se colocó 1,00 g (7,19 mmoles) de m-nitrofenol (**B**) y 5,96 g (43,16 mmoles) de K₂CO₃ seco. Se cerró el recipiente con un séptum, y luego de realizado el purgado, se agregó con jeringa 20 ml de ACN seco. El contenido del balón se mantuvo en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se adicionó 2,10 ml (2,15 g; 8,63 mmoles) de bromuro de dodecilo y 20 ml del mismo solvente, y se conectó el balón a un refrigerante a reflujo. La mezcla se mantuvo bajo atmósfera inerte, en continua agitación, calentándose a reflujo durante 8 horas y a 50°C las restantes 16 horas. El contenido del balón fue filtrado en un embudo con placa porosa, cubierto con Celite, conservándose el sobrenadante. El solvente se eliminó a presión reducida y el producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna (alúmina neutra). Como mezclas de elución se utilizaron hexano, hexano: éter etílico (90:10) y hexano: éter etílico (80:20). Se obtuvieron 1,880 g (6,12 mmoles; **85 %**) de 3-dodeciloxi-nitrobencono puro (**1B**).

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por TLC en cuba de CHCl₃:CH₃OH (10:1), observándose un R_f = 0.75 para el compuesto. Como no fue posible una clara distinción entre la mancha del bromuro de dodecilo remanente y la del producto utilizando este sistema, se optó por realizar cromatografías en capa fina utilizando una cámara de hexano. El producto mostró un

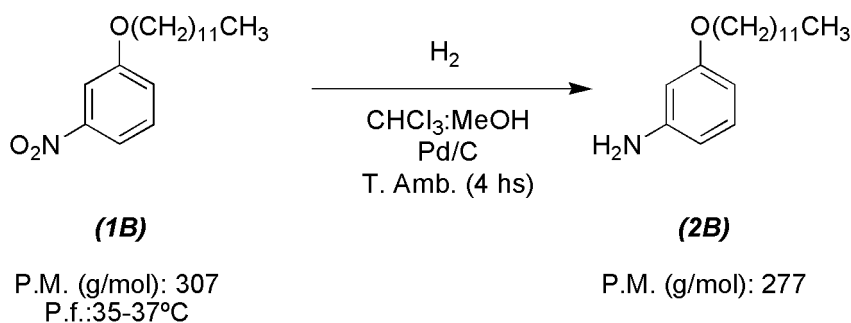
$R_f = 0.13$ bajo estas condiciones, que fueron las mismas que se aplicaron para monitorear el avance de la purificación del compuesto.

Se caracterizó espectroscópicamente al producto obtenido mediante $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$. Las señales obtenidas fueron:

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.81 (t, 3H, $J^3 = 6.9$ Hz, CH_3), 1.10-1.40 (m, 18H, CH_2), 1.73 (m, 2H, CH_2), 3.96 (t, 2H, $J^3 = 6.0$ Hz, OCH_2), 7.16 (d, 1H, $J^3 = 8.1$ Hz, Ar-H), 7.41 (d, 1H, $J^3 = 8.31$ Hz, Ar-H), 7.70-7.75 (m, 2H, Ar-H).

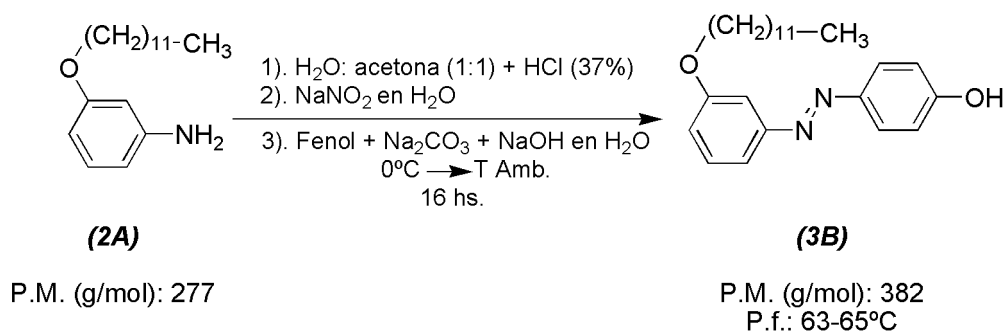
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 14.072 (CH_3), 22.67, 25.91, 28.98, 29.29, 29.32, 29.52, 29.56, 29.62, 29.63, 31.91 (CH_2), 68.93 (OCH_2), 114.41, 125.8, 141.4, 164.26 (Ar-C).

7.1.2.8 Síntesis de 3-dodeciloxianilina (2B)



En un balón de una boca provisto de agitador magnético, se colocó 0,300 g (0,98 mmoles) de 3-dodeciloxi-nitrobenceno (*1B*) y 10 ml de CHCl_3 . Se mantuvo la agitación hasta observar la disolución completa del sólido. A continuación fue adicionado 8,6 ml de CH_3OH , e inmediatamente se tapó la boca del balón con un séptum y se procedió a purgar el sistema con nitrógeno. Se agregaron dos puntas de espátula pequeña del catalizador de Pd/ C y luego de unos minutos de agitación de la mezcla de reacción, se purgó con hidrógeno, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas. El crudo de reacción fue filtrado con embudo con placa sinterizada cubierta con Celite. El sobrenadante obtenido se evaporó a presión reducida. El producto (*2B*) fue conservado bajo atmósfera inerte y en frío. Como en el caso de la reducción de 4-dodeciloxi-nitrobenceno, la reacción se consideró completa debido a que el seguimiento con TLC en cuba de hexano: éter etílico (1:1) ($R_f = 0.10$ para el producto), demostró la ausencia de compuesto de partida.

7.1.2.9 Síntesis de 3-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3B)



En un tubo de vidrio con tapa a rosca (**TUBO Nº 1**), provisto de un agitador magnético, se colocó 4,51 mL de la mezcla H₂O: Acetona (1:1), junto con 0,45 mL de HCl concentrado. Se mantuvo el contenido bajo agitación a temperatura ambiente.

A continuación, en otro tubo de vidrio (**TUBO Nº 2**) también provisto de agitador magnético, se colocó 93,15 mg (1,35 mmoles) de NaNO₂ purificado y 2,25 ml de H₂O. Se cerró el recipiente con un séptum, se mantuvo la agitación en baño de hielo y sal y atmósfera inerte.

En un último tubo de vidrio (**TUBO Nº 3**) conteniendo un agitador magnético, fue añadido 131,6 mg de fenol (1,40 mmoles), 228,96 mg (2,16 mmoles) de Na₂CO₃, 52,86 mg (1,32 mmoles) de NaOH. Se adicionaron 3,45 mL de H₂O por las paredes del recipiente y se tapó con un séptum. Inmediatamente el tubo fue llevado a un baño de hielo y sal, se realizó el purgado y se mantuvo la agitación bajo atmósfera inerte y frío.

Una vez preparados todos los reactivos y solventes necesarios, se procedió a realizar la reacción tal como se desarrolló en la sección 7.1.2.5. La mezcla de reacción se mantuvo bajo continua agitación, atmósfera inerte y en baño de hielo y sal, hasta alcanzar espontáneamente la temperatura ambiente en el transcurso de las 16 horas en que se llevó a cabo la experiencia.

Luego de las 16 horas, se procedió a medir el pH del crudo de reacción. Como el mismo resultó ser ácido, se adicionó NaOH al 37% hasta alcanzar la neutralidad. En un embudo con placa sinterizada cubierta por papel de filtro fue filtrado el contenido del tubo, obteniéndose 0,28 g (0,74 mmoles; **76%**) del compuesto (3B). Fueron realizados sucesivos lavados con H₂O MilliQ hasta observarse la ausencia de fenol en el sobrenadante. El compuesto fue recuperado con CHCl₃ y separado del solvente utilizando rotavapor.

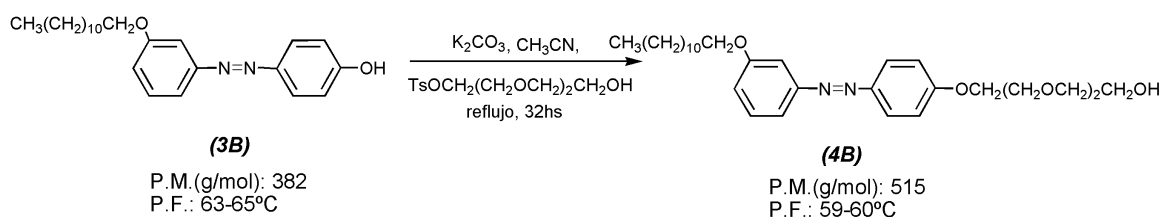
La identidad del compuesto, así como la eliminación del fenol remanente, fueron comprobados mediante TLC en una cámara de hexano: éter etílico (1:1), donde se observó un R_f = 0.45 para el producto.

Las señales obtenidas en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto purificado fueron:

^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.81 (t, 3H, $J^3=6.9$ Hz, CH_3), 1.10-1.40 (m, 18H, CH_2), 1.73 (m, 2H, CH_2), 3.96 (t, 2H, $J^3=6.0$ Hz, OCH_2), 4.50 (s, 1H, OH), 6.79-7.00(m, 3H, Ar-H), 7.14-7.22 (m, 3H, Ar-H), 7.73-7.88 (m, 2H, Ar-H).

^{13}C -RMN (CDCl_3) δ (ppm): 12.35 (CH_3), 21.00, 24.40, 27.70- 28.00 (CH_2), 75.30 (OCH_2), 110.50, 114.21, 114.82, 115.93, 123.30, 123.35, 127.94, 146.91, 148.00, 158.22 (Ar-C).

7.1.2.10 Síntesis de 3-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B)



A una mezcla conteniendo 100mg (0.26 mmol) de 3-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno y 400 mg (2.89 mmol) de K_2CO_3 , fueron agregados 84 mg (0.276 mmol) de trietilenglicol p-toluensulfonilo en 15 mL de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción fue mantenida a reflujo por 32 horas y luego se filtró en un embudo con placa sinterizada cubierta por papel de filtro. El sólido fue purificado por columna cromatográfica utilizando óxido de aluminio neutro como adsorbente y como mezcla de eluyentes CH_2Cl_2 : MeOH. De esta manera se obtuvo **4B** puro con un **70%** de rendimiento como un sólido rojo anaranjado.

Las señales obtenidas en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto purificado fueron:

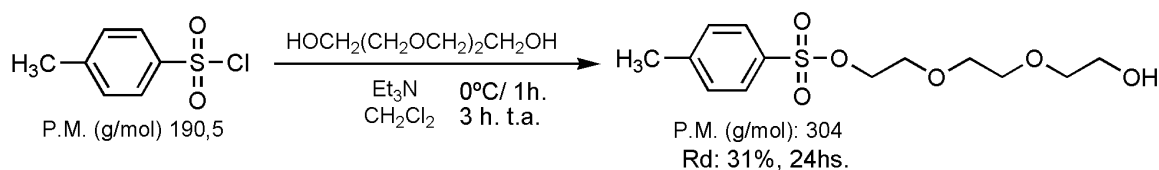
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 0.81 (t, 3H, $J^3=6.9$ Hz, CH_3); 1.05-1.45 (m, 16H, CH_2); 1.63-1.67 (m, 4H, CH_2); 3,84 (t, 2H, $J^3=6.0$ Hz, CH_2); 3,90 (t, 2H, $J^3=6.0$ Hz, OCH_2); 7.00 (d, 1H, $J^3=8.10$ Hz, Ar-H); 7.03 (d, 2H, $J^3=8.89$ Hz, Ar-H); 7.37 (d, 1H, $J^3=8.31$ Hz, Ar-H); 7.39 (s, 1H, Ar-H); 7.49 (d, 1H, $J^3=7.79$ Hz, Ar-H); 7.90 (d, 2H, $J^3=8.90$ Hz, Ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 13.10 (CH_3), 21.70, 25.10, 28.30, 28.60, 30.90 (CH_2), 60.80, 67.20, 68.71, 69.45, 70.30, 71.40, 76.40 (OCH_2), 105.40, 115.40, 115.50, 116.61, 123.70, 128.60, 153.00, 153.10, 158.90, 160.20 (Ar-C).

Las señales obtenidas en los espectros de masas fueron

EM-FAB: (m/z): 515,40 ($\text{M}^+ + 1\text{H}^+$)

EMAR: calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_5$: 515,3485. Encontrado: 515, 3482.

7.1.2.11 Síntesis de trietilenglicol p-toluensulfonato⁸

En un balón fueron mezclados 0,78 g de 2- [2- (2- hidroxietoxi) etoxi] etanol (trietilenglicol) (1 mol); y 162,3 μL de trietilamina (Et_3N , previamente destilada) (1,5 mol) en 4 mL de CH_2Cl_2 (160mL). El sistema se purgo con N_2 , luego fue agregado 0,5 g de cloruro de tosilo (cloruro de p-toluensulfonilo, previamente purificado)¹ (0,5 moles), a 0 °C en 1 hora. La mezcla de reacción fue mantenida bajo agitación por 3 horas a temperatura ambiente y 1 hora a reflujo para completar la reacción. El seguimiento de la reacción fue realizado por TLC de sílice gel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, (10:1). El crudo de reacción fue vertido en 3 mL de una solución de HCl 6M enfriada en un recipiente con hielo. Luego de la separación de las capas en ampolla de decantación, la acuosa fue extraída con CHCl_3 (6 x 3 mL). Las fases orgánicas reunidas fueron lavadas con NaHCO_3 (2 mL) (eliminar el excedente de Et_3N) y NaCl (2mL). Fueron secadas con MgSO_4 (4 espátulas) y tras filtración y posterior evaporación del solvente se obtuvo una mezcla oleosa de ambos productos mono y ditosilado 2- [2- (2- hidroxietoxi) etoxi] etanol. Para separar la mezcla de tosilados, la mezcla fue disuelta en 3 mL de MeOH y llevada al freezer (-20 °C) durante toda la noche para que precipite el ditosilado. El producto monotosilado puro fue obtenido con un 31% de rendimiento como un aceite, tras separación del ditosilado por filtración y evaporación del solvente bajo vacío.

Las señales obtenidas en los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto purificado fueron:

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 2.45 (s, 3H, CH_3); 3.5-3.8 (m, 10 H, OCH_2); 4.1-4.2 (m, 2H, OCH_2); 7.34 (d, 2H, $J_{3,2} = 8.7$ Hz, Ar H-3); 7.80 (d, 2H, $J_{2,3} = 8.7$ Hz, Ar H-2).

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ (ppm): 21.55 (CH_3); 61.70 (CH_2OH); 68.69, 69.10, 70.28, 70.75, 72.46 (OCH_2); 127.92 (Ar C-3); 129.79 (Ar C-2); 133.07 (Ar C-4); 144.80 (Ar C-1).

7.1.3 Espectroscopía Uv-Vis:

Los datos espectroscópicos fueron adquiridos en un Espectrofotómetro JASCO V-630BIO equipado con un sistema Peltier EHCS-760 para el control de la temperatura. Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C. Para realizar las determinaciones espectroscópicas las muestras fueron

⁸ D. N. Reihhoudt et al., 'Synthesis of Uranyl Salophene Metallo-Macrocycles with Additional Functional groups' (1992) *Synthesis* 119.

disueltas en CHCl_3 grado HPLC a concentraciones entre 7,5 y 10 μM . En todos los experimentos se utilizaron cubetas de cuarzo con tapa de cierre hermético. Los mismos experimentos fueron también realizados en EtOH y MeOH observándose $\lambda_{\text{máx}}$ equivalentes a las presentadas para cada compuesto, aunque la resolución de los resultados de fotoconversión en el espectrofotómetro utilizado fue mayor utilizando CHCl_3 . Se llevó a cabo un barrido espectral entre 200 y 500nm. Los experimentos de fotoirradiación *E-Z* fueron realizados con una lámpara de arco de mercurio de 8 watts con filtro de 360 nm de Pleuger Antwerp Brussels. En todos los casos también se utilizó una lámpara de iluminación de 150 watts sin observar diferencias. Los experimentos de irradiación *Z-E* se llevaron a cabo con luz blanca proveniente de un foco de 60 watts. Ambos experimentos fueron realizados manteniendo la temperatura de las muestras a 20 ± 5 °C usando un baño de agua fría.

7.1.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Breve teoría del método: La Calorimetría Diferencial de Barrido, comúnmente conocida como DSC, acrónimo del nombre inglés “Differential Scanning Calorimetry”, es la técnica experimental más directa y precisa para caracterizar sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al modificar la temperatura.⁹ Constituye, consecuentemente, la técnica más adecuada para caracterizar termodinámicamente desde organizaciones más simples como las de sistemas anfífilos, a sistemas más complejos,¹⁰ como proteínas y biomembranas.

El uso de DSC nos permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así lo que comúnmente se denomina termograma. Compara las diferencias entre la energía adquirida o liberada por una muestra y una referencia adecuada en función de la temperatura o el tiempo, mientras que la muestra y la referencia están sujetas a un aumento o a una disminución controlada de temperatura. La forma y el tamaño del pico resultante contienen información sobre el tipo de transición implicada y la cantidad de energía que requiere la transición.¹¹ A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura: cambios de

⁹ M. Brown, *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, Elsevier, Amsterdam (1998).

¹⁰ M. H. Chiu y E. J. Prenner, 'Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions' (2011) 3 (1) *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 39.

¹¹ *Physical Methods of Chemistry*, 2nd ed, Vol. 6: Determination of Thermodynamic Properties Ed. Rossiter, B. W.; Baetzold, R. C. John Wiley&Sons Inc. 1992

entalpía (ΔH), de entropía (ΔS), de energía de Gibbs (ΔG) y de la capacidad calorífica (ΔC_p).¹² Así, esta técnica se utiliza para determinar puntos de fusión, polimorfismo y pureza para sistemas de un componente, así como la organización de estados líquidos cristalinos y otras formas de auto-organización. Los "picos" que se originan en las áreas bifásicas son amplios y pueden ser difíciles de observar ya que la energía de transición se extiende a lo largo de un intervalo de temperatura grande.¹³

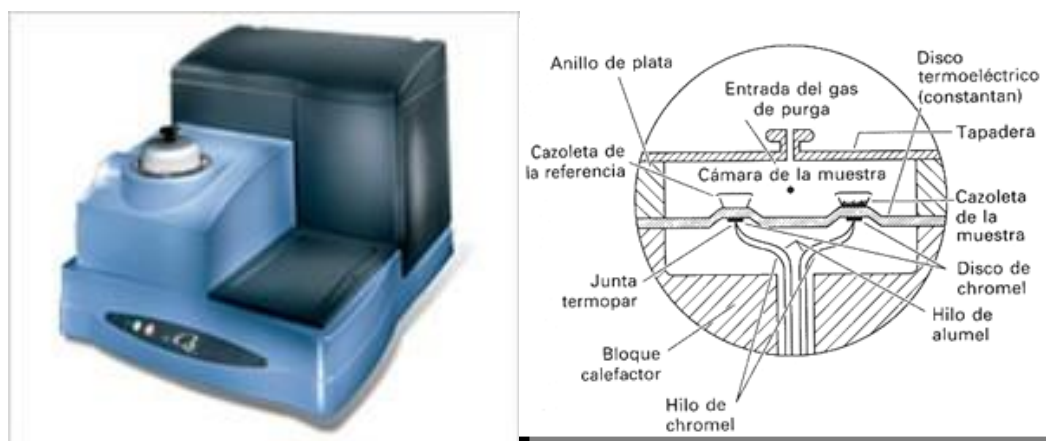


Figura 7.1 Imagen del Analizador Térmico DSC Q-20 TA-Instruments y Esquema de una celda de flujo de calor. El calor fluye hacia la muestra como hacia el material de referencia a través de un disco termoelectrico de constantan calentado eléctricamente. La diferencia entre el flujo de calor hacia la muestra y la referencia se controla mediante unos termopares de superficie de chromel/constantan formados por la unión entre la plataforma de constantan y los discos de chromel sujetos a la parte inferior de la plataforma.

Procedimiento experimental: Todas las mediciones calorimétricas presentadas en la presente tesis se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido Q20 (TA Instruments) (Figura 7.1). Este equipo mide la temperatura y los flujos de calor ($mW=mJ/s$) asociados con transiciones en el material en función del tiempo y de la temperatura bajo una atmósfera controlada de nitrógeno.

Las muestras fueron preparadas usando cápsulas de aluminio (pans) cerradas herméticamente, las cuales han sido pesadas en balanza analítica con ± 0.00001 g de precisión. Las muestras fueron tratadas bajo condiciones de vacío a $35^{\circ}C$ durante 24 horas para la

¹² J. Mc. Naughton y C. Mortimer, *Calorimetría Diferencial de Barrido*, Perkin Elmer Corporation, (1975).

¹³ G. C. Chernik, 'Enthalpies of non-isothermal phase transitions in binary systems' (1993) 220 *Thermochim. Acta* 37.

obtención de sólidos estables para su pesada. A cada cápsula utilizada para las medidas calorimétricas se le agregó entre 5 y 10 mg en peso seco de cada compuesto.

El equipo dispone de un software que permite editar un programa específico de temperaturas. En este experimento, se realizaron 5 barridos de los ciclos térmicos determinados para cada compuesto y fueron presentados los datos obtenidos del 2° barrido en cada caso.

Ciclo térmico para 3A: El primer barrido consistió en la estabilización de la muestra a 0 °C y posterior aumento de la temperatura hasta alcanzar los 120 °C a una velocidad constante de 5 °C/minuto. Este primer barrido permite borrar la historia térmica del material. El segundo barrido consiste en un enfriamiento hasta 25 °C a una velocidad programada de 5 °C/minuto y posterior calentamiento hasta 120 °C a una velocidad de 5 °C/minuto. Se repiten las rampas de temperatura hasta un total de 5 barridos.

1^{er} ciclo térmico para 3B: estabilización de la muestra a 0 °C; rampa de calefacción de 25 °C a 100 °C a 5 °C/minuto; rampa de enfriamiento de 100 °C a 25 °C. Se repiten las rampas de temperatura hasta un total de 5 barridos.

1^{er} ciclo térmico para 4A: estabilización de la muestra a 0 °C; rampa de calefacción de 25 °C a 250 °C a 5 °C/minuto; rampa de enfriamiento de 250 °C a 25 °C. Se repiten las rampas de temperatura hasta un total de 5 barridos.

1^{er} ciclo térmico para 4B: estabilización de la muestra a 0 °C; rampa de calefacción de 25 °C a 130 °C a 5 °C/minuto; rampa de enfriamiento de 130 °C a 25 °C. Se repiten las rampas de temperatura hasta un total de 5 barridos.

7.1.5 Microscopía Óptica de Luz Polarizada (POM) con platina de temperatura controlada y placa de retardación de 1λ .

Breve Teoría del método: A través de esta técnica, se puede determinar la presencia de las diferentes mesofases en función de los cambios de temperatura. Al observar la muestra entre un microscopio con polarizadores cruzados, se puede obtener información sobre la anisotropía de la misma. Las fases que aparecen oscuras cuando se ven entre polarizadores cruzados se describen como isotrópicas, mientras que aquellas que se ven brillantes son anisotrópicas. Estas expresiones que se refieren a propiedades ópticas, también se usan para describir las estructuras de fase. Las estructuras isotrópicas son idénticas a lo largo de cualquiera de las tres direcciones ortogonales en el espacio, mientras que las anisotrópicas no lo son. La actividad óptica de las fases anisotrópicas se debe al hecho de que los índices de refracción varían

dependiendo de la dirección de polarización de la luz incidente con respecto a la estructura de la fase. Cuando la luz pasa por una fase anisotrópica, el rayo emergente se divide en dos rayos paralelos, uno para el cual el índice de refracción, n , es independiente de la dirección (el ordinario) y uno para el cual n varía con la dirección (el extraordinario)



Figura 7.2 Efecto de las fases anisotrópicas en la luz polarizada. A) polarizadores cruzados, sin muestra. No se transmite la luz. El mismo efecto se obtiene cuando se inserta una muestra isotrópica entre los polarizadores b) polarizadores cruzados, muestra anisotrópica. La luz es transmitida.

El resultado es que un componente vectorial no nulo de la luz emergente es transmitido por el analizador, y tal confluencia hace que aparezca brillo. Dependiendo de la estructura del cristal líquido observado, se producen diferentes patrones.^{14, 15} El cizallamiento o desplazamiento lateral de las moléculas producido por una fuerza externa, induce anisotropía fácilmente observable, o birrefringencia, en todas las fases cúbicas (tanto cristales como cristales líquidos) y en soluciones micelares con micelas filiformes largas cilíndricas o enredadas. Esto se describe como birrefringencia de corte o flujo.¹⁶

Procedimiento Experimental: La microscopia óptica se realizó con un microscopio de polarización Nikon Eclipse E-200 POL (Tokio, Japón). Las transiciones de fase fueron analizadas a través de un microscopio Karl Zeiss, modelo Phomi III POL con platina calefactora marca Mettler modelo FP52 (PLAPIQUI). Cada una de las muestras fue puesta sobre porta y cubre dentro de una cavidad que posee la platina calefactora. La elección de las temperaturas a las cuales se observaron las muestras fue determinada previamente por DSC. De esta manera, se puso en evidencia la presencia de cada mesofase a la temperatura de transición y además, se pudo observar como se produce el cambio de estas fases al variar la temperatura. Las

¹⁴ R. G Laughlin, *The aqueous phase behavior of surfactants*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, (1996).

¹⁵ F.J. Bueche, *Introduction to Physics for Scientists and Engineers*, 4th ed.; McGraw-Hill Book Company, NewYork, (1986).

¹⁶ S.J. Johnson y G.G. Fuller, 'The Optical Anisotropy of Sheared Hematite Suspensions' (1988) 124 *J. of Coll. And Interfac. Sci.* 441.

microfotografías fueron tomadas con y sin polarizadores cruzados, y en algunos casos con un intercalado de una placa de retardación de 1λ .

7.2 Materiales y Métodos del Capítulo IV

7.2.1. *Materiales*

Lipoid s75TM conteniendo un 69-75% de fosfatidilcolina fue comprada en Lipoid Co. (Alemania). Fueron utilizados CHCl₃ y MeOH calidad HPLC. El agua fue purificada por un sistema MilliQ (Millipore, Billerica, MA), para obtener un producto con una resistividad de ~ 18,5 MΩ y ausencia de impurezas con actividad superficial.¹⁷

7.2.2 *Monocapas de Langmuir*

Breve descripción del método: Las monocapas insolubles o de Langmuir se aplican al estudio de las interacciones y afinidades entre diferentes anfifilos y las interfases aire-agua o aire-lípido. Se producen y caracterizan en un instrumento que se conoce como balanza de Langmuir, el cual consta de una cubeta que contiene la subfase acuosa y cuenta con barreras móviles que son usadas para comprimir la monocapa. Esta cubeta está construida con materiales hidrofóbicos como el Teflón.

En la Figura 7.3 se muestra una representación de una balanza de Langmuir como la que se usó en este estudio. La muestra en estudio fue preparada disuelta en un líquido inmisible en agua, como el cloroformo, o mezcla de este con metanol (1:1).

El estudio se basa en la formación de una monocapa con la o las moléculas de interés a través de la siembra de una cantidad conocida de las mismas sobre una subfase acuosa, para luego, comprimirlas y expandidas utilizando las barreras móviles una vez que el solvente se haya evaporado. La formación de la monocapa, cuando se trabaja a temperatura constante, es evidenciada por medio de la isoterma de compresión, en la cual se grafica el cambio en la presión superficial (π) en función del área molecular promedio (MMA),¹⁸ o sea, el área o sección promedio que ocupa cada molécula en todo el área circunscripta entre las barreras, en Å². Esta medida se realiza generalmente en pseudo equilibrio dado que existe una compresión constante de la monocapa a medida que va registrándose la π en mN/m a una temperatura, T en °C.

¹⁷ I. Bianco y B. Maggio, 'Interactions of neutral and anionic glycosphingolipids with dilauroylphosphatidylcholine and dilauroylphosphatidic acid in mixed monolayers' (1989) 40 *Colloids Surfaces* 249.

¹⁸ N.M. Jones y D. Chapman D, *Micelles, Monolayer and Biomembranes*, Wiley-Liss, New York, pp 58-60 (1995).

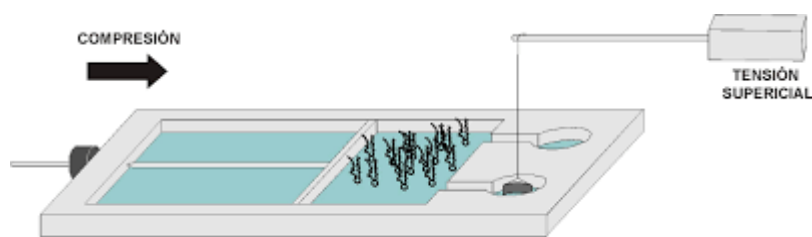


Figura 7.3 Representación esquemática de una Balanza de Langmuir que posee además, una sonda de potencial superficial.

Una propiedad de interés de las moléculas que puede ser estudiada formando estas películas es la eléctrica. Ésta puede evaluarse por medio de medidas de potencial superficial (ΔV). La adsorción de una película monomolecular a una subfase, trae como consecuencia un cambio en la función trabajo y por lo tanto, del potencial superficial. Este, ΔV , se produce como la diferencia entre el potencial de la subfase descubierta y el producido cuando se encuentra la película. Este potencial se puede medir mediante la técnica del capacitor vibrante o, como en este trabajo de tesis, con la de ionización.¹⁹

Procedimiento Experimental: *Isotermas de Compresión. Presión Superficial-Área Molecular.* Se realizaron isotermas de compresión a 24 ° C y 13 °C para los compuestos 4A y 3A. Estos compuestos se disolvieron en una mezcla de metanol/cloroformo (2:1) para obtener una solución de concentración total de 1 mg/ml que se extendió en una cubeta de Teflón de 266 cm² rellena con 200 ml de subfase. La concentración final de Lipoid s75 también fue de 1 mg/ ml. Se utilizó el mismo protocolo para la obtención de las monocapas constituidas por la mezcla de Lipoid s75: 4A (80:20 mol%). La solución acuosa utilizada como subfase fue una solución salina a $pH \sim 5,5$ (NaCl 145 mM) para todos los experimentos de monocapas. La película se dejó reposar durante 5 minutos para la evaporación del disolvente y para alcanzar la relajación a < 0.1 mN/m antes de ser comprimida isométricamente (la velocidad de compresión fue de $2 \pm 1 \text{ \AA}^2 \text{ molécula}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dependiendo de las propiedades de compresibilidad de la película) hasta la presión objetivo.

La presión superficial se determinó con una placa de Pt usando el método de Wilhemy y se midió y registró continuamente el área total de la película utilizando un equipo KSV Minicuveta (KSV, Helsinki, Finlandia) el cual se encuentra dentro de una cubierta acrílica enriquecida

¹⁹ P. Dynarowicz, A. Dhanabalan y O. N. Oliveira Jr., 'Modern physicochemical research on Langmuir monolayers' (2001) 221 *Advances in Colloid and Interface Science* 91.

continuamente con gas N₂ para prevenir la oxidación lipídica.²⁰ El área molecular promedio (MMA) fue calculada para cada experimento a partir del área total de la monocapa y los datos de concentración de la solución de cada compuesto. La temperatura de la subfase (± 0,5 °C) se controló mediante un baño de circulación externo y se mantuvo a 25 °C, a menos que se indicara lo contrario.

Un experimento representativo de un conjunto de tres experimentos independientes se muestra en cada una de las figuras que difieren en MMA y las medidas de presión superficial en menos de 2 Å² y 0,2 mN/m, respectivamente.

Con el fin de analizar el comportamiento elástico de la película de moléculas adsorbidas, fue calculado el módulo de compresibilidad, C_s^{-1} , a partir del cálculo de la pendiente de la curva π en función de MMA, datos extraídos de la correspondiente isoterma utilizando la siguiente ecuación²¹

$$C_s^{-1} = -MMA \left(\frac{d\pi}{dMMA} \right)_T$$

(Ecuación 7.1)

donde MMA, representa al área molecular promedio, en Å²; π es la presión superficial en mN/m y T la temperatura en °C. Las medidas fueron realizadas en condiciones de oscuridad para 4A (Z).

7.2.3 Medidas de BAM

Breve descripción del método: La microscopía de ángulo de Brewster (BAM) muestra la organización bidimensional de una monocapa en una balanza de Langmuir, incluido el tamaño, la forma y la heterogeneidad de los dominios en los sistemas anfifílicos. En este instrumento la fuente de luz emite luz polarizada, la cual incide sobre la superficie descubierta o limpia de la subfase con un ángulo de 53,1°. Este es el ángulo de Brewster. La imagen recolectada por el detector en este caso es el fondo, observándose una imagen oscura porque no hay luz reflejada. En estas condiciones, cuando aparece una monocapa sobre la subfase y la luz polarizada incide sobre esta, se genera una modificación de las condiciones del ángulo de Brewster y se detecta una imagen diferente a la del fondo. Así se pueden observar los diferentes estados bidimensionales de las monocapas.

²⁰ E. Brown y H. Brockman *Methods in Molecular Biology*, 398, pag 41, (2007).

²¹ G. L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience Publishers: New York (1966).

Procedimiento Experimental: Las monocapas de 4A (Z) y 4A (Z) se prepararon como se describe más arriba, usando un equipo de monocapas pequeño (KSV, Helsinki, Finlandia). Esta balanza de Langmuir se montó sobre un Elipsómetro Nanofilm EP3 (Accurion, Goettingen, Alemania) utilizado en la modalidad de BAM. El cero de reflexión se estableció con un láser polarizado de $\lambda = 532$ nm, incidiendo sobre la superficie acuosa descubierta (agua sin monocapas) calibrado experimentalmente en el ángulo de Brewster ($\sim 53,1^\circ$). Después de la formación de la monocapa y de su compresión, la luz reflejada se recogió mediante un objetivo 20X. Bajo las condiciones de calibrado establecidas, el nivel de gris de cada píxel de las imágenes de BAM está directamente relacionado con el cuadrado del espesor de la película y el índice de refracción, en películas que no muestran actividad óptica;²² en caso contrario, el nivel de grises también depende de la orientación 2D del cristal.

7.2.4 Fotoisomerización de las monocapas

Los experimentos de fotoirradiación E-Z tanto para las monocapas de 4A puro como para las mezclas [Lipoid s75: 4A (80:20 mol%)] en agua fueron realizados con la misma lámpara utilizada para la irradiación de 4A en CHCl_3 (sección 7.1.3). La diferencia se evidenció en los tiempos de irradiación, en este caso de 40 minutos para alcanzar el PSS informado. Para realizar las mediciones las monocapas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad. Los espectros UV fueron adquiridos en el equipo ya mencionado.

7.2.5 POM

Las muestras fueron preparadas colocando una gota de cada dispersión en una concentración de 2,8 mg/ml, entre porta y cubre objeto. Las microfotografías se realizaron a 25°C, bajo polaroides cruzados (Nikon Eclipse E200 POL con cámara Nikon acoplada).

7.2.6 DSC

Las muestras fueron preparadas usando cápsulas de aluminio cerradas herméticamente, pesadas en balanza analítica con ± 0.00001 g de precisión. A las cápsulas se les adicionó 10 mg del correspondiente compuesto o dispersiones acuosas (2.8 mg/mL) hasta completar el mismo volumen final por cápsula: (a) 4A (E) sólido; (b) dispersión vesicular multilamelar de Lipoid s75 puro; (c) mezclas de dispersiones laminares de Lipoid s75: 4A (E); y (d) mezclas de dispersiones laminares de Lipoid s75: 4A (Z), obtenidas por irradiación de la mezcla Lipoid s75: 4A (E) por 40

²²M. L. Fanani, B. Maggio, 'Liquid-liquid Domain Miscibility Driven by Composition and Domain Thickness Mismatch in Ternary Lipid Monolayers' (2011) 115 *J. Phys. Chem. B* 41.

min. con luz UV (360 nm, 8 Watts). Este mismo procedimiento fue realizado a las membranas vesiculares de Lipoid s75 puro, sin observar cambios físicos significativos. Los ciclos térmicos establecidos para todas las muestras fueron: enfriamiento de 25 °C a 0 °C; estabilización a 0 °C x 3min; rampa de calentamiento hasta 120 °C a una tasa de 5 °C/min; rampa de enfriamiento hasta 25 °C, tasa 5 °C/min, estabilización a 25 °C x 3min. Todas las medidas calorimétricas presentadas corresponden a los segundos barridos de cada ciclo térmico.

7.2.7 Monocapas de Gibbs

Para lograr la adsorción de los azoanfílicos a la interfaz aire/ agua descubierta se aplicó el siguiente procedimiento: se inyectó 4A (25 µL de solución de *E*, o 50 µL de *Z*) en metanol en el seno de la subfase acuosa de una cuba de Teflón bajo agitación continua [volumen de la subfase: 15 ml, concentración final de la subfase 3,2 µM para 4A (*E*) y 6,39 µM para 4A (*Z*)]. Se registraron los cambios en la presión superficial y el potencial superficial a área constante en función del tiempo, de esta manera se estableció una monocapa de Gibbs para cada uno de los compuestos. La presión superficial se determinó como se ha descrito anteriormente.

Las curvas de adsorción se efectuaron sobre una superficie sin fosfolípidos y otra con monocapas de los fosfolípidos constituyentes del Lipoid s75TM. En este último caso las curvas de tiempo de penetración se realizaron por deposición de una solución clorofórmica de Lipoid s75TM en la interfase aire/ agua para formar una monocapa de fosfolípidos previo a la inyección de 4A en la subfase. Fueron utilizadas diferentes concentraciones del Lipoid, que dieron lugar a distintas presiones superficiales iniciales (mN/m).

El equipo utilizado fue una balanza de Langmuir circular (Monofilmeter) construida en el laboratorio, controlada por una unidad electrónica. Todos los experimentos se realizaron a 23 ± 2 °C. Las mediciones se realizaron en oscuridad cuando se trabajó con 4A (*Z*).

7.3 Materiales y Métodos del Capítulo V

7.3.1 Determinación de la concentración de agregación crítica (CAC)

Las muestras fueron preparadas a partir de una madre (0,1 M) agitando con imán en H₂O tridestilada a temperatura ambiente. Se obtuvo por dilución un set de concentraciones ($1 \cdot 10^{-4}$ M - $5 \cdot 10^{-7}$ M) las cuales fueron directamente utilizadas en las mediciones de los experimentos de DLS (ver sección 7.3.5) y UV (ver sección 7.3.6) a diferentes temperaturas seleccionadas entre 0°C – 90 °C.

7.3.2 Síntesis de vesículas por evaporación inducida (EISA)

Se desarrolló un protocolo para inducir la formación de agregados basándonos en la técnica de obtención de un film delgado. El procedimiento consistió en la formación de una película orgánica homogénea por evaporación a vacío, a temperatura ambiente, de una disolución del anfifilo E (E-Z 95:5, 19mM) en cloroformo, expuesta a luz blanca. Con el fin de hidratar el film, se adicionó al balón agua MilliQ a la temperatura de transición del estado líquido cristalino (70°C), bajo ligera agitación por 2hs. Finalmente se agitó vigorosamente utilizando un vórtex para obtener la suspensión del film por desprendimiento de las paredes, y posteriormente se procedió a la sonicación de la muestra (3 ciclos de 3 min a 25 °C). La dispersión así obtenida fue incubada por al menos dos días a 0°C para lograr la formación de una suspensión de vesículas color amarillenta en el exceso de solución acuosa, de concentración aproximada 0,5mM.

7.3.3 POM

Las muestras fueron preparadas colocando una gota de cada dispersión en una concentración de 2,8 mg/ml, entre porta y cubre objeto. Las microfotografías se realizaron a 25°C, bajo polaroides cruzados (Nikon Eclipse E200 POL con cámara Nikon acoplada).

7.3.4 Microscopía electrónica (EM)

La utilización de estas técnicas requiere la preparación previa de la muestra debido a que la misma debe ser analizada en condiciones de alto vacío y debe ser eléctricamente conductiva. El método es bastante invasivo pero una magnificación de más de 200000 veces ofrece una resolución de 10-20 Å. Para la preparación de las muestras se utilizó agua Milli-Q obtenida de un sistema de ultrapurificación SMART SYNERGY UV. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado. Fueron preparados los controles correspondientes usando agua sin azoanfifilo, en los cuales no se observaron vesículas o esferas. Las muestras fueron sometidas a envejecimiento de

1 semana a 1 mes para inducir la organización supramolecular. La evaluación estadística se completó utilizando el software Image J.

7.3.4.1 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Breve descripción del método: El Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones en lugar de luz que es dirigido y focalizado a través de una muestra mediante lentes electromagnéticas en un ambiente de alto vacío. Las imágenes y los contrastes asociados derivan de las diferencias regionales en las densidades electrónicas. Esta técnica tiene una resolución de aproximadamente 1 a 100 nm, y por lo tanto puede proporcionar información estructural muy detallada sobre materiales poliméricos, incluso hasta el nivel molecular.

Al formarse la imagen, las zonas que más desvían los electrones aparecerán más oscuras que las que desvían menos. La magnitud de cambio de la trayectoria y pérdida de energía aumenta con el número atómico. En las muestras orgánicas compuestas por C, H, O, N, S esas diferencias son escasamente apreciables debido a que las moléculas son atravesadas por los electrones con facilidad. Por este motivo es necesario realizar una serie de tinciones que introducen átomos pesados (Os, U, Pb, etc.) selectivamente en determinadas partes de la muestra. Las muestras en suspensión (micropartículas, nanopartículas, virus, etc.) pueden estudiarse fácilmente aumentando el contraste mediante tinción negativa. Mediante este procedimiento se tiñe el entorno de la muestra donde se impide el paso de los electrones. Como resultado se obtiene imágenes con un fondo oscuro adecuado sobre el que queda contrastada la estructura. Las soluciones de contraste más utilizadas son acetato de uranilo (1%) o ácido fosfotúngstico al 1-2%.^{23, 24}

Las secciones ultrafinas de tejidos o muestras en suspensión se colocan sobre rejillas portaobjetos metálicos de 3 mm (grid). Para la visualización de muestras particulares es imprescindible aplicar previamente sobre la rejilla una membrana de soporte de Formvar o carbono.

²³ M. A. Hayat, *Principles and techniques of electron microscopy*, University Press: Cambridge, (2000).

²⁴ D. S. Booth, Agustin Avila-Sakar y Yifan Cheng, 'Visualizing Proteins and Macromolecular Complexes by Negative Stain EM: from Grid Preparation to Image Acquisition' (2011) 58 *Journal of Visualized Experiments : JoVE (Pt MyJove Corporation)* 3227.



Figura 7.4 Ejemplo de tinción negativa de vesículas multilaminares.

Preparación de las muestras: cada alícuota de muestra (5 μL) se depositó sobre un grid de cobre o níquel (200 mesh) recubierta con Formvar. Después de 5 min de interacción, el exceso de líquido se eliminó por capilaridad. La muestra se tiñó negativamente con 2% de acetato de uranilo en agua. Después de 2 min, se retiró el exceso de fluido, se dejó secar y se observó en un microscopio JEOL 100CX II con un haz de 100 kV.

El acetato de uranilo es un agente de tinción negativa, por lo que a diferencia de otros, rodea a las estructuras de los autoagregados. De esta manera, las nanoesferas se observan como una región clara con un borde oscuro debido a la interacción de este agente con la superficie de las mismas.

7.3.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Es otra técnica de microscopía electrónica muy valiosa con una resolución de aproximadamente 5 nm. En SEM un fino haz de electrones es escaneado a través de la superficie de una muestra opaca, y un detector apropiado recoge los electrones emitidos desde cada punto. De esta manera, una imagen que tiene una gran profundidad de campo y una apariencia tridimensional notable se construye línea por línea. Para producir imágenes estables, se suele recubrir la muestra con una película conductora. En la mayoría de los casos, se usa una aleación de oro o de oro-paladio para revestir la superficie ya sea por evaporación o por pulverización catódica. El espesor típico de la película es de aproximadamente 20 nm. Otra ventaja de recubrimiento es que los materiales del recubrimiento pueden dar un alto rendimiento de electrones secundarios y por lo tanto aumentar el contraste de la imagen.

Preparación de las muestras: cada alícuota de la muestra (20 μL) fue depositada sobre una superficie de vidrio no revestido. Después de 5 min de interacción, se eliminó el exceso de fluido y se dejó secar en una placa de Petri. Las muestras resultantes se metalizaron con Au (0) utilizando el metalizador de pulverización Pelco 91000 y se observaron a través de un equipo JSM-35 CF equipado con detector de electrones secundarios (EVO 40). Todas las imágenes fueron analizadas utilizando el software Image J.

Por SEM se corroboraron los resultados obtenidos mediante TEM y debido a las características de esta microscopía, se pudo obtener imágenes con detalles topográficos de las estructuras presentes.

7.3.5 *Dispersión de Luz Dinámica*

La dispersión de luz dinámica (también conocida como PCS – Espectroscopía de correlación de fotón) mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. Esto lo hace iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersa. Este método da una información sobre el tamaño de los agregados en solución. Permite seguir la agregación en el tiempo y los cambios estructurales con la concentración o debido a distintos estímulos, como por ejemplo la variación del pH, añadido de sales, temperatura, etc.

Las mediciones de DLS se realizaron usando el espectrómetro Zetasizer-Nano® de Malvern. Las mediciones convencionales se realizaron con un ángulo de dispersión fijo (θ) de 90° a $25,0 \pm 0,1$ °C. En el caso del experimento de determinación de CAC se programó una rampa de temperaturas de 25 °C a 80 °C y se midió la dispersión de luz de un set de muestras del azoanfílo en agua a diferentes concentraciones entre $1 \cdot 10^{-4}$ M - $5 \cdot 10^{-7}$ M.

7.3.6 *Espectroscopía Uv-Vis*

Los espectros de absorción UV-Vis fueron realizados en un espectrofotómetro JASCO V-630BIO equipado con un peltier EHCS-760 que permite el control de la temperatura. A través del mismo se programaron rampas de temperatura para el experimento de determinación de CAC y se midió la absorbancia haciendo un barrido de 25 °C a 80 °C al $\lambda_{\text{máx}}$ correspondiente. Las rampas de temperatura ascendente y descendente para los azoniosomas 4A (E) y 4A (Z) fueron establecidas entre 0 y 90 °C.

7.3.7 *Espectroscopía de Fluorescencia*

Las mediciones de fluorescencia en estado estacionario se llevaron a cabo usando un espectrofluorímetro Jasco FP 8300 provisto con lámpara Xe con carcasa de lámpara blindada, (Shielded Lamp Housing, 150 W) y una célula Peltier intercambiable para el control de la temperatura.

7.3.7.1. Encapsulamiento y liberación de calceína

Para obtener azovesículas cargadas con calceína se realizó el ya mencionado protocolo de EISA descrito en el apartado 7.3.2. Una vez obtenida la película orgánica seca de 4A (E) adherida sobre la superficie de vidrio del balón, se realizó su rehidratación en buffer Hepes 5 mM, 50 mM NaCl, 100 mM de Calceína, pH 7 a 65°C por 2 horas, con agitación rotatoria suave a través del rotavapor. Con el fin de disminuir el tamaño de las vesículas, la dispersión resultante fue sonicada por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego de la sonicación la sonda fluorescente libre fue separada de las azovesículas por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna de SEPHADEX G-100 equilibrada con el buffer iso-osmótico HEPES 5 mM, 150 mM NaCl, a pH 7.0. Para la separación cromatográfica se dispuso de una columna de 1 cm de diámetro en la cual el gel fue empaquetado al momento de realizar la cromatografía. La dispersión de azovesículas se depositó cuando el nivel de eluyente alcanzó la parte superior del gel. El flujo del buffer fue impulsado por simple gravedad. Se dejó que la muestra penetrara completamente en el gel antes de añadir el pequeño volumen de buffer repetido para proceder a la elución. La liberación pasiva de las nanoazovesículas (E) fue inferior al 10% después de dos días en la oscuridad.

Para evaluar la liberación fotoinducida de la calceína contenida en los azoniosomas la muestra fue irradiada a 310 nm en ciclos de irradiación de 3 minutos de duración, por un tiempo total de 20 min. La irradiación se llevó a cabo en el espectrofluorímetro Jasco FP 8300 a 25°C y los cambios en la intensidad de fluorescencia de la muestra a $\lambda_{exc} = 495$ nm y $\lambda_{em} = 515$ nm fueron monitoreados a los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 min., posteriores a cada ciclo de irradiación. Los espectros de emisión fueron adquiridos entre 500-640 nm, utilizando pasos o slits de excitación y de emisión de 5 nm, respectivamente.

Se realizaron los respectivos controles de la sonda expuesta a la temperatura de trabajo y a un tiempo máximo de 20 min de irradiación sin evidenciarse cambios significativos en la intensidad de fluorescencia.

7.3.7.2 Liberación total de calceína utilizando Tritón X-100 (TX-100)

El experimento de desorganización de los azoniosomas se llevó a cabo agregando volúmenes crecientes de una dilución 1:100 de Tritón X-100, a la dispersión vesicular previamente sonicada (0,5mM). El experimento fue monitoreado a través de espectroscopía UV-Vis a 25°C. La disolución total de los azoniosomas se produjo con un agregado total de 2 μ L de TX-100 [0,1 % (m/v)]

Posteriormente se calculó el porcentaje de liberación total de calceína para un mismo volumen de muestra, considerando la intensidad de fluorescencia obtenida luego del tratamiento con 2 μ L de Tritón X-100 (fluorescencia total) comparativamente con la obtenida luego de cada ciclo de irradiación de acuerdo a la ecuación presentada, adaptada de Ávila y colaboradores.

7.3.7.3 Interacción con Rojo Nilo

Para estudiar la capacidad de interacción del colorante Rojo Nilo con las azovesículas 4A (E), una dispersión de éstas últimas obtenidas por EISA fue tratada con una concentración final 10 μ M de Rojo Nilo, e incubada por 10 minutos para permitir que el sistema llegue al equilibrio. Posteriormente, la transición fotoinducida de las vesículas fue realizada al irradiar la muestra durante 12 minutos a 310 nm. Antes y después de la irradiación, los espectros de emisión de Rojo Nilo se obtuvieron entre 580 y 740 nm por excitación del sistema a 552 nm. Estos experimentos se llevaron a cabo en un Fluorímetro Shimadzu RF a 25 °C. Se utilizaron slits de excitación y de emisión de 5 nm respectivamente. Como control, una disolución pura de Rojo Nilo en buffer HEPES 5 mM, NaCl 150 mM, a pH 7,0, fue tratada en las mismas condiciones que la muestra. No se observaron cambios en los espectros de emisión del Rojo Nilo después de la irradiación a 310 nm. Para comparar las condiciones experimentales antes y después de la irradiación, se graficaron los espectros de fluorescencia normalizados. Se tomó como base el máximo valor de absorbancia y la normalización se realizó para cada curva por separado. Las derivadas segundas de cada espectro fueron calculadas utilizando el software Origin Lab. Los espectros fueron suavizados usando el método de Savitzky-Golay usando una función de segundo orden utilizando 30 puntos del espectro.

7.4 Materiales y Métodos del Capítulo 6

7.4.1 Materiales

El agua empleada en todos los experimentos y preparaciones se utilizó desionizada y purificada de calidad MilliQ obtenida en un sistema *Ultrapurificación SYNERGY UV Serie SMART*.

Las soluciones acuosas a los distintos pHs de trabajo fueron preparadas a partir de soluciones HCl 1 mM y NaOH 0,1M. Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro marca OAKTON pH/mV/°C meter pH510 series y empleando tiras indicadoras de pH MERCK.

La liofilización del péptido se llevó a cabo en un liofilizador marca RIFICOR.

Los espectros de masas se realizaron utilizando diferentes técnicas de ionización: EM-Maldi-Tof, modelo Voyager System 1161, marca Applied Biosystems; Ionización por electrospray (EM-ESI), marca Esquire 3000; y Masas de Alta resolución (EM-AR), marca Apex III FT-ICR MS. Todas las técnicas se realizaron en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se llevaron a cabo con un espectrómetro FT-NMR modelo Avance III 500 y marca Bruker, en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

Para las representaciones gráficas de los espectros de UV obtenidos, se empleó el programa OriginPro 8.

7.4.2 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida

La síntesis de los péptidos se realizó en una escala aproximada de 0.24 mmol (carga práctica calculada, ver ecuación 7.2). La cantidad de resina a utilizar depende de la carga de la misma. La metodología aplicada fue Fmoc/tButilo

7.4.2.1 Montaje

Las síntesis se llevaron a cabo utilizando un tubo reactor descartable de plástico, donde no hay llaves, colocado en un Erlenmeyer, acoplado a una trampa de vacío para filtrar. En este caso no fue necesario siliconizar el aparato. La suspensión de la resina se agitó haciendo pasar una corriente de N₂ por el sistema. Los disolventes y reactivos se filtraron mediante el vacío aplicado. Otra opción sería tapar el reactor por ambos lados y agitar mecánicamente, y posteriormente filtrar con la trampa de vacío.

7.4.2.2 *Reactivos y disolventes utilizados*

Las disoluciones utilizadas se prepararan al inicio de cada síntesis:

HBTU/HOBt/DMF: se mezclan 3.8 g de HBTU y 1.35 g de HOBt en 50 mL de DMF (concentraciones finales de la disolución 0.2 M de HBTU y HOBt). Las disoluciones preparadas se pueden guardar en la heladera.

DIEA/DMF: 3 mL de DIEA en 90 mL de DMF (0.195 M DIEA).

7.4.2.3 *Método analítico para la determinación de aminas libres: test de Kaiser*²⁵

El test de Kaiser es un ensayo realizado con ninhidrina permite determinar de forma cualitativa la presencia de aminas primarias en una resina, sirviendo por lo tanto como control para cada uno de los acoplamientos durante la síntesis de un péptido en fase sólida. Para llevar a cabo el ensayo se prepararon las siguientes disoluciones, previo a comenzar con la síntesis:

Disolución A: 4 g de fenol en 20 mL de EtOH absoluto (disolución en caliente).

Disolución B: 0,1 mL de una disolución acuosa de KCN 1 mM con 4,9 mL de piridina, previamente destilada sobre ninhidrina.

Disolución C: 50 mg de ninhidrina en 1 mL de EtOH absoluto, conservándose esta disolución en ausencia de luz.

Una pequeña alícuota de la resina seca (entre 0.5 y 2 mg) se sitúa en un vial Eppendorf, y sobre ella se añaden dos gotas de cada una de las disoluciones A, B y C. La mezcla obtenida se calienta a 100 °C durante 4-6 min, se enfría el vial y se observa la coloración de la resina.

Una coloración azul en la resina se considera como positivo, y es indicativo de la presencia de grupos amino primarios, y por tanto, de un bajo grado de incorporación del aminoácido protegido que hace necesaria la repetición de la etapa de acoplamiento. Contrariamente, una coloración rojiza o amarilla (ensayo negativo) indica un grado de acoplamiento satisfactorio. Es conveniente realizar paralelamente un blanco para poder comparar las coloraciones.

²⁵ E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger y P.I Cook, 'Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides' (1970) 34 *Anal. Biochem* 595.

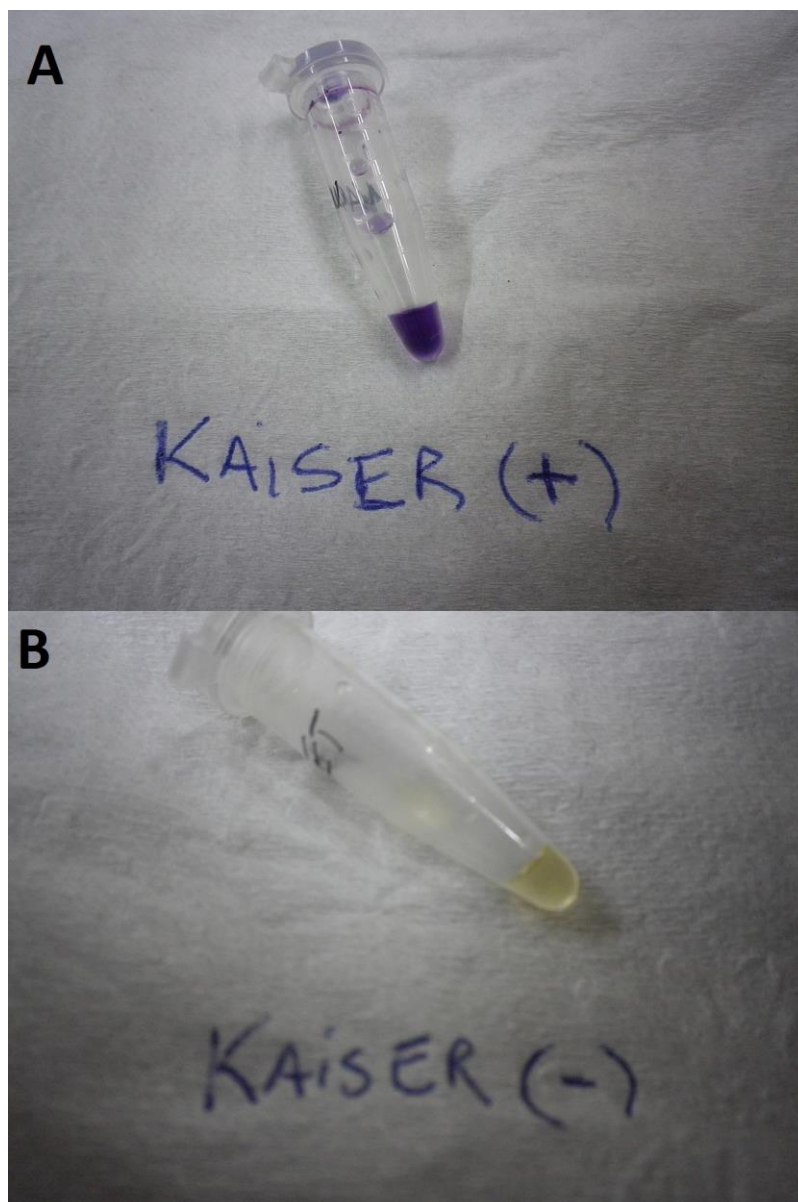


Figura 7.5 Resultados del test de Kaiser mostrando la coloración positiva (A) y negativa (B), al ser aplicado a una porción de la resina Rink amida AM durante la síntesis en fase sólida.

7.4.2.4 Preparación de la resina

La resina utilizada como soporte sólido para esta síntesis fue la resina Rink amida AM CBL Patras (200- 400 mesh), con una precarga inicial teórica de 0.30 mmol/g. Los Fmoc-aminoácidos requeridos para la síntesis se utilizaron protegidos en sus cadenas laterales.

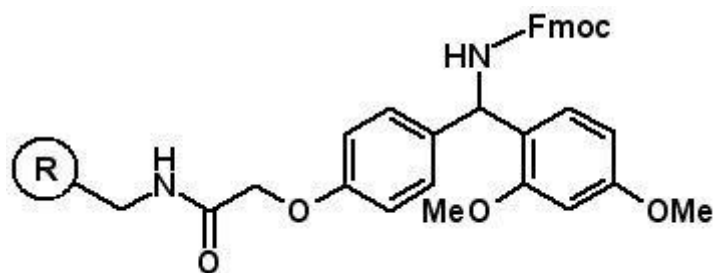


Figura 7.6 Resina Rink Amida AM.

El procedimiento inicial de preparación de la resina para iniciar la síntesis de péptidos en fase sólida es el siguiente:

- a) Lavar el matraz de reacción con MeOH (3 x 5 mL x 5 min).
- b) Añadir la resina (210 mg, \approx 0.1 mmol) y lavarla con DMF (5 mL x 10 min).
- c) Comprobar que el test de Kaiser es negativo
- d) Desproteger la resina: 20% piperidina/DMF (15 mL x 30 min).
- e) Lavar con DMF (3 x 5 mL x 5 min).
- f) Lavar con i PrOH (2 x 5 mL x 5 min).
- g) Comprobar que el test de Kaiser es positivo.
- h) Lavar con DMF (2 x 5 mL x 5 min).

Completada esta secuencia, la resina está lista para acoplar el primer aminoácido Fmoc-Cys (Trt)-OH.

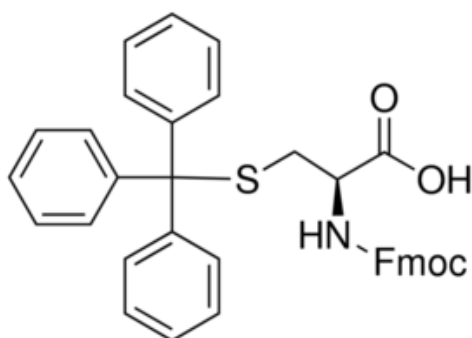


Figura 7.7 Fmoc-Cys (Trt)-OH.

7.4.2.5 Proceso sintético

- 1) *Acoplamiento del 1º aminoácido:* Se disuelve el aminoácido correspondiente (0.50 mmol) en TBTU/DMF (1 eq. en 1 mL) y DIPEA/DMF (2 eq. en 1,5 mL) y después de aproximadamente 1 min de activación se añade la mezcla sobre la resina. La suspensión

resultante se agitó vigorosamente durante 2 horas (dependiendo la dificultad del acoplamiento).

- 2) *Lavados*: Después del acoplamiento se lavó la resina: a) DMF (3 x 5 mL x 5 min) y b) ⁱPrOH (2 x 5 mL x 5 min). Estos fueron los tiempos y cantidades utilizadas para la síntesis de péptido A. Debe ser optimizarlo para cada caso, incluso el lavado con ⁱPrOH puede obviarse)
- 3) *Capping*: Este procedimiento anula la reactividad del resto de los centros reactivos de la resina. Se realizó con Anhídrido acético: DIPEA: DMF (1:2:17) por 30 min. y luego se repitió 2)
- 4) La carga práctica de la resina se determinó por espectroscopía UV- Vis midiendo la absorbancia a $\lambda = 290$ de una solución de la resina en 3 mL de 20% piperidina en DMF, según la siguiente formula:

$$\text{Carga práctica} = A_{\lambda 290} / 1,65 \times \text{mg de resina}$$

(Ecuación 7.2)

Se comprobó de esta forma una carga práctica de 0,2 mmol/g.

El paso siguiente para continuar con la síntesis fue humectar la resina con DMF y realizar el test de Kaiser para comprobar que diera negativo. Posteriormente se lavó la resina con DMF (2 x 5 mL x 5 min); ⁱPrOH (2 x 5 mL x 5 min) y DCM (2 x 5 mL x 5 min) y se procedió al acoplamiento del siguiente aminoácido (Fmoc-Phe-OH), utilizando un exceso de 4 equivalentes. Este paso fue repetido una vez más.

- 5) *Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc)*:
 - a) 20% piperidina/DMF (1,5 mL) durante 30 min.
 - b) Se lava la resina desprotegida con DMF (3 x 5 mL x 5 min).
- 6) *Acetilación N-Terminal*.
 - a) 20% de Ac₂O (1mL) en DMF (4mL), de los cuales se utilizan 3,4mL.
 - b) DIEA / DMF (0,2M) se utilizada 1,7mL.

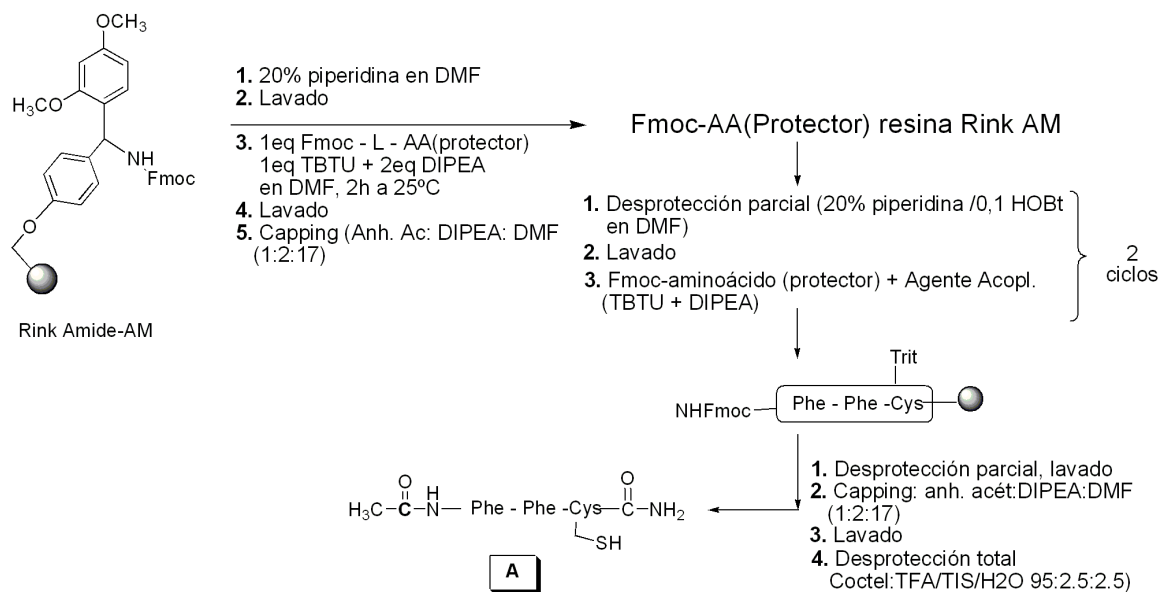
Toda la mezcla es agitada por 1 hora. Una vez terminada la síntesis se procede a la rotura de la unión péptido-resina.

7) *Rotura de la unión del péptido con la resina y desprotección total.* Las roturas de la unión del péptido con la resina se llevaron a cabo utilizando la siguiente mezcla:

Cóctel R: TFA/TIS/agua/ (95:2,5:2,5), 50mg /500 μ L resina, 3 horas.

Las roturas se llevaron a cabo según el siguiente procedimiento:

- La resina seca (50 mg, peso seco) se situó en un tubo de reacción. Fue añadido el *cóctel R* (500 μ L) recién preparado y enfriado a 0 °C. La mezcla resultante se dejó llegar a temperatura ambiente y se agitó mecánicamente durante 3 h.
- La suspensión se filtró para separar la resina de la mezcla de desprotección, lavándose la resina separada con \approx 50 μ L de TFA.
- Los filtrados combinados fueron añadidos lentamente sobre Et₂O (5 mL) enfriado a -10 °C en un baño de hielo seco-sal (se utilizaron varios Eppendorf).
- La suspensión del péptido en Et₂O se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 5 minutos y fue separado a continuación el líquido sobrenadante del sólido centrifugado.
- Se añadieron 5 mL de Et₂O sobre el sólido centrifugado y se repite el paso d) dos veces.
- El sólido obtenido se secó bajo una corriente de N₂, y se liofilizó con el equipo mencionado anteriormente.



El péptido Ac-Phe-Phe-Cys-NH₂ (A) fue obtenido con un 36% de rendimiento aproximado total (0.93 μmol). Dicho péptido fue utilizado sin mayor purificación debido a su pureza determinada por espectrometría de masas de alta resolución.

7.4.3 Caracterización estructural

1) RMN:

- ¹H NMR (Metanol-d₄) δ (ppm): 1.21 (t, 1H, SH); 1.89 (s, 3H, CH₃); 2.84-3.53 (m, 6H, CH₂); 4.45 (m, 1H, CH); 4.61(m, 2H, CH); 7.10- 7.31 (m, 10H, Ar-H); 8.12 (t, 1H, NH), 8.18 (d, 1H, NH).

- ¹³C-NMR (Metanol-d₄) δ (ppm): 15.39 (CH₃); 22.39 (CH₂SH); 38.34 (CH₂); 38.45 (CH₂); 56.30 (CHNH); 57.34 (CHNH); 66.9 (CHNH); 127.77, 127.96, 129.45, 129.63, 130.20, 130.43 (Ar-C); 173.26, 173.44 (CONH); 174.29 (CONH₂).

2) EM:

- **EM-ESI:** [M+Na]⁺: 479,2

-**EM-Maldi-TOF:** [M+Na+H]⁺ calculada para C₂₃H₂₈N₄O₄S₁Na⁺: 480,55, obtenida 480,18.
Dímero calculado para C₄₆H₅₄N₈O₈S₂Na⁺: 934, 11, obtenida 933,96.

- **EM-AR:** calculado para C₂₃H₂₈N₄O₄S₁Na⁺ 479,17252, obtenida 479,17235.

7.4.4 Espectroscopía UV-Vis

El péptido A se disolvió en HFIP obteniendo una concentración final de 2.0 mM. Diferentes alícuotas se agregaron a soluciones acuosas a pH 3 y pH 8, obteniendo una concentración final de péptido de 0,274 mM en cada una de ellas. Se adquirieron los espectros UV-Visibles de las soluciones del péptido A a t₀, t_{30min} y a t_{24h}, respectivamente. Este estudio fue llevado a cabo mediante un barrido espectral entre 230 a 500 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro V-630 BIO JASCO modelo iRM-700, con Peltier termostatzado de simple célula y celdas de cuarzo de paso óptico de 1cm. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C. Se realizaron las derivadas segundas para poder visualizar mejor los cambios observados, aplicando un suavizado usando una ecuación de Savitzky-Golay. Las mismas fueron fiteadas mediante una función cúbica usando un filtro de 9 puntos y superponiendo 99 puntos.

Se calculó el índice de agregación, a través de la siguiente ecuación:

$$I. A. [\%] = \left(\frac{100 \times A_{350}}{A_{258} - A_{350}} \right).$$

(Ecuación 7.3)

De acuerdo a este índice²⁶ la escala usada fue la siguiente: a) entre 0-2: solución; b) entre 2-5; formación de algunos agregados; c) > 5: agregación elevada.

Las pruebas de modulación de la agregación en el tiempo, respecto a la capacidad de óxido/reducción, se realizaron a pH 8 y a pH 3.0. Para evaluar la reducción a través de la adición de TCEP, se preparó una disolución madre de concentración 10 mM de TCEP en 1mL de H₂O. Se prepararon diluciones para cada pH, a las cuales se les añadió el péptido A disuelto en HFIP, obteniendo una relación agua / solvente (88: 12). La evolución del sistema reductor en el tiempo se realizó tomando alícuotas de cada muestra a t=0, t=30 min, t=24h y t=168h (7 días). Los experimentos de modulación de las fibras preformadas se llevaron a cabo agregando una pequeña alícuota de 50 µL de TCEP (1,40 µM concentración final). Como control, se realizó la medición de la absorción de una solución de TCEP puro en la misma relación agua / solvente (88: 12) que la utilizada para las muestras a diferentes pHs. No se observó absorción de los aditivos en el rango de λ evaluado para las Phe.

7.4.5 MO y POM

En el presente trabajo empleamos MO y POM como técnicas iniciales para evaluar la formación de los agregados del péptido a los distintos pHs y tiempos de envejecimiento. Para ello se utilizó el microscopio Nikon Eclipse LV100 con una cámara digital marca NIKON, acoplada al microscopio para la toma de las fotografías. Fueron realizadas las técnicas de observación convencional por secado de las muestras entre porta y cubre objetos y la técnica de Lawrence para todas las muestras.

7.4.6 TEM

Para estas observaciones se utilizó un microscopio JEOL 100CX II con un haz de 100 kV. Alícuotas del péptido a pH 3, y pH 8 a t₀, t_{30 min} y a t_{24h} respectivamente fueron depositadas sobre

²⁶ R. Esfandiary y C. Russell Middaugh, '*Ultraviolet Absorption Spectroscopy, Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*', John Wiley & Sons, Inc. 169 (2012)

un grid, cubierto con Formvar, lavadas y teñidas usando acetato de uranilo. La evaluación estadística se completó utilizando el software Image J.

7.4.7 SEM

Alícuotas del péptido a pH 3, y pH 8 a los diferentes tiempos fueron depositadas sobre vidrio y se permitió que se evapore el agua a temperatura ambiente, lavadas y secadas las muestras bajo campana, para luego ser metalizadas con oro. Se empleó un microscopio electrónico de barrido marca LEO, modelo EVO 40 XVP (Inglaterra).

Capítulo VIII

Anexo

8.1 Publicaciones

A continuación se detallan los trabajos que surgieron del desarrollo de esta tesis, y fueron publicados en actas de congresos nacionales e internacionales:

XVII Simposio SINAQO, SAIQO, Mendoza. Título: “Diseño y Síntesis de anfífilos fotomodulables. Hacia el desarrollo de materiales supramoleculares”. Autores: M. Alejandra Sequeira, Zulma B. Quirolo, Paula V. Messina y Verónica I. Dodero. Modalidad: Presentación de poster. Mendoza, **2009**. Libro de resúmenes: ISBN 978-987-24002-1-7, Pág. SO119.

XXVIII Congreso Argentino de Química “Bicentenario de Mayo”, 4to Workshop de Química Medicinal, Asociación Química Argentina, Universidad Nacional de Lanús. Título: “Estudio del comportamiento térmico de anfífilos basados en azobencenos. Hacia el desarrollo de materiales supramoleculares.” Autores: M. A. Sequeira, J. C. Santiago Valtierra, V. I. Dodero. Modalidad: Presentación de poster. Provincia de Buenos Aires, **2010**. Libro de resúmenes: ISBN 978-987-99428-1-9.

14th Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. 2010. Facultad de Ciencias-Campus Lugo, Universidad Santiago de Compostela. Título: “Synthesis and Characterization of Photomodulable Amphiphiles”. Autores: Alejandra Sequeira, Zulma Quirolo and Verónica Dodero. Modalidad: Conferencia electrónica. España. A035:1-4. Editores: Julio A. Seijas y M. Pilar Vázquez-Tato, CD-ROM edición, MDPI, Basilea, Suiza. Santiago de Compostela, **2010**. ISBN 3-906980-24-3.

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, Carlos Paz, Córdoba. Título: “Autoorganización Molecular de nuevos anfífilos no iónicos basados en azobencenos”. Autores: M. Alejandra Sequeira, Verónica Dodero. Modalidad: Presentación de poster. Córdoba, **2011**. Libro de Resúmenes: ISBN 978-987-24002-2-4, CDD 540, FQO-111, Pág. 189.

9th YBMRS Symposium. Young Belgian Magnetic Resonance Scientist Symposium, Bélgica. Título: “Characterization of photoswitchable amphiphiles by NMR spectroscopy” Autores: M. A. Sequeira, Z. B. Quirolo, J. C. Martins, V. I. Dodero. Modalidad: Presentación de poster. Comité organizador : Prof. Michel Luhmer, Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de RMN haute résolution, Département de Chimie, Bruxelles, Belgium, Blakenberge, Belgica, **2011**.

Congreso NanoCórdoba 2012, Villa Carlos Paz, Córdoba. Título: “Autoorganización Molecular de Nuevos Sistemas Peptídicos Basados en Fenilalanina” Autores: M. A. Sequeira, Z.

B. Quirolo, A. Zobel, M. Ritzefeld, N. Sewald, V. I. Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, **2012**.

Congreso NanoCórdoba 2012, Villa Carlos Paz, Córdoba. Título: "Hacia el Desarrollo de Nanocarriers Fotomodulables" Autores: M. Alejandra Sequeira, Verónica I. Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. **2012**.

IV Congreso de Materia Blanda (Mab IV); Bahía Blanca. Título: "Autoagregación fotomodulada. Hacia el diseño de nanocarriers inteligentes". Autores: M. Sequeira, V. Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, **2012**. <http://www.mabiv.uns.edu.ar/resumenes.php>

IV Congreso de Materia Blanda (Mab IV); Bahía Blanca. Título: "Síntesis y evaluación supramolecular de nuevos sistemas peptídicos basados en fenilalanina" Autores: M. Sequeira, Z. Quirolo, A. Zobel, M. Ritzefeld, N. Sewald, V. Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, **2012**. <http://www.mabiv.uns.edu.ar/resumenes.php>

XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.; San Javier, Tucumán. Título: "Towards the understanding of self-assembly and function in proteins using chemistry tools" Autores: Verónica I. Doderó, Zulma B. Quirolo, M. Alejandra Sequeira y M. Georgina Herrera. Modalidad: Conferencia. Argentina. Editores: SAB - Sociedad Argentina de Biofísica; Rosan Chehín, **2012**. ISBN 978-987-27591-1-7.

16th Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. 2012. Facultad de Ciencias-Campus Lugo, Universidad Santiago de Compostela. Título: "The Liquid Crystal Behavior of New Non-ionic Azobenzene-Amphiphiles" Proceedings: A. Sequeira, V. Doderó;. 2012. Editor: *Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez-Tato* CD-ROM edición MDPI, Basilea, Suiza **2012** ISBN 3-906980-26-3.

XIX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata. Título: "Monocapas de Langmuir y Gibbs como herramientas en el desarrollo de interruptores de membrana" Autores: Luciano Benedini, M. Alejandra Sequeira, Laura Fanani, Bruno Maggio, Verónica Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Argentina. Editores: Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, Silvina C. Pellegrinet, **2013**, 176 pag. ISSN 2346-9862, FQO-109, Pág. 81.

XIX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata. Título: "Síntesis de péptidos fotomodulables basados en fenilalaninas" Autores: M. Alejandra Sequeira, Zulma Quirolo,

Verónica Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Mar del Plata, Argentina. Editores: Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, Silvina C. Pellegrinet, **2013**. 176 pag. ISSN 2346-9862, SO-191, Pág. 157.

XIX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata. Título: "Diseño molecular orientado al desarrollo de sistemas nanotransportadores" Autores: M. Alejandra Sequeira, Luciano Benedini, Verónica Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Mar del Plata, Argentina. Editores: Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, Silvina C. Pellegrinet, **2013**. 176 pag. ISSN 2346-9862, SO-190, Pág. 157.

XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.; Villa Carlos Paz, Córdoba. Título: "Interfacial behavior of a novel non-ionic azobenzene amphiphile. Towards a new membrane photoswitch". Autores: Luciano Benedini, M. Alejandra Sequeira, Laura Fanani, Bruno Maggio, Verónica Doderó. Modalidad: Presentación de poster. Argentina. Editores: SAB - Sociedad Argentina de Biofísica; Natalia Wilke, **2013**, 146 páginas. ISBN 978-987-27591-2-4, BLM12, Pág. 34.

XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.; Villa Carlos Paz, Córdoba. Título: "Design, Synthesis and Characterization of a novel azoniosome". Autores: M. Alejandra Sequeira, Ivana Maric, Luciano Benedini, Veronica I. Doderó. Presentación de Poster. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Editores: SAB - Sociedad Argentina de Biofísica; Natalia Wilke, **2013**, 146 páginas. ISBN 978-987-27591-2-4, BLM30, Pág. 43.

XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica.; Villa Carlos Paz, Córdoba. Título: "Solvent-mediated assembly of new chemically modified Phe-Phe-Cys peptides". Autores: M. Alejandra Sequeira, Soraya Learte, Veronica I. Doderó. Presentación de Poster. Argentina. Editores: SAB - Sociedad Argentina de Biofísica; Natalia Wilke, **2013**, 146 páginas. ISBN 978-987-27591-2-4, BPA33, Pág. 68.

XX Simposio Nacional de Química Orgánica, Mar del Plata. Título: "Sistemas peptídicos fotomodulables. Hacia el entendimiento del proceso de autoorganización peptídica". Autores: Quirolo Z. B., Sequeira M. A., Doderó V.I. Presentación de Poster. Argentina. Editores: Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica, **2015**. 170 pag. ISSN 2346-9862, SO-169, Pág. 145.

34th European Peptide Symposium and 8th International Peptide Symposium, Leipzig, Alemania. Título: "Modulating the self-assembly of Phe-Phe-Cys peptide by external stimulus". Autores: M. A. Sequeira y V. Doderó. Modalidad: Proceeding. Alemania, **2016**.

A continuación se detallan los artículos que surgieron del desarrollo de esta tesis, y fueron publicados en revistas internacionales con referato:

Verónica I. Doderó, Zulma B. Quirolo, M. Alejandra Sequeira, "Biomolecular studies by Circular Dichroism" (2011) 16 (1) *Frontiers in Bioscience* 61. **FBS-ISSN:** 1093-4715.

Zulma B. Quirolo, Luciano A. Benedini, M. Alejandra Sequeira, M. Georgina Herrera, Tania Veuthey y Verónica I. Doderó, "Understanding Recognition and Self-assembly in Biology Using the Chemist's Toolbox. Insight into Medicinal Chemistry" (2014) 14 *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1. *Bentham Science Publ Ltd.* **ISSN:** 1568-0266.

Benedini, L. A.; Sequeira, M. A.; Fanani, M. L.; Maggio, B.; Doderó, V. I., "Development of a Non-Ionic Azobenzene Amphiphile for Remote Photocontrol of a Model Biomembrane" (2016) 120 *The Journal of Physical Chemistry B* 4053.

M. A. Sequeira, M. G. Herrera, Z. B. Quirolo y V. I. Doderó "Easy Directed Assembly of only Nonionic Azoamphiphile Builds up Functional Azovesicles" (2016) 6 *RSC Adv.*108132.

8.2 Espectros de las moléculas sintetizadas

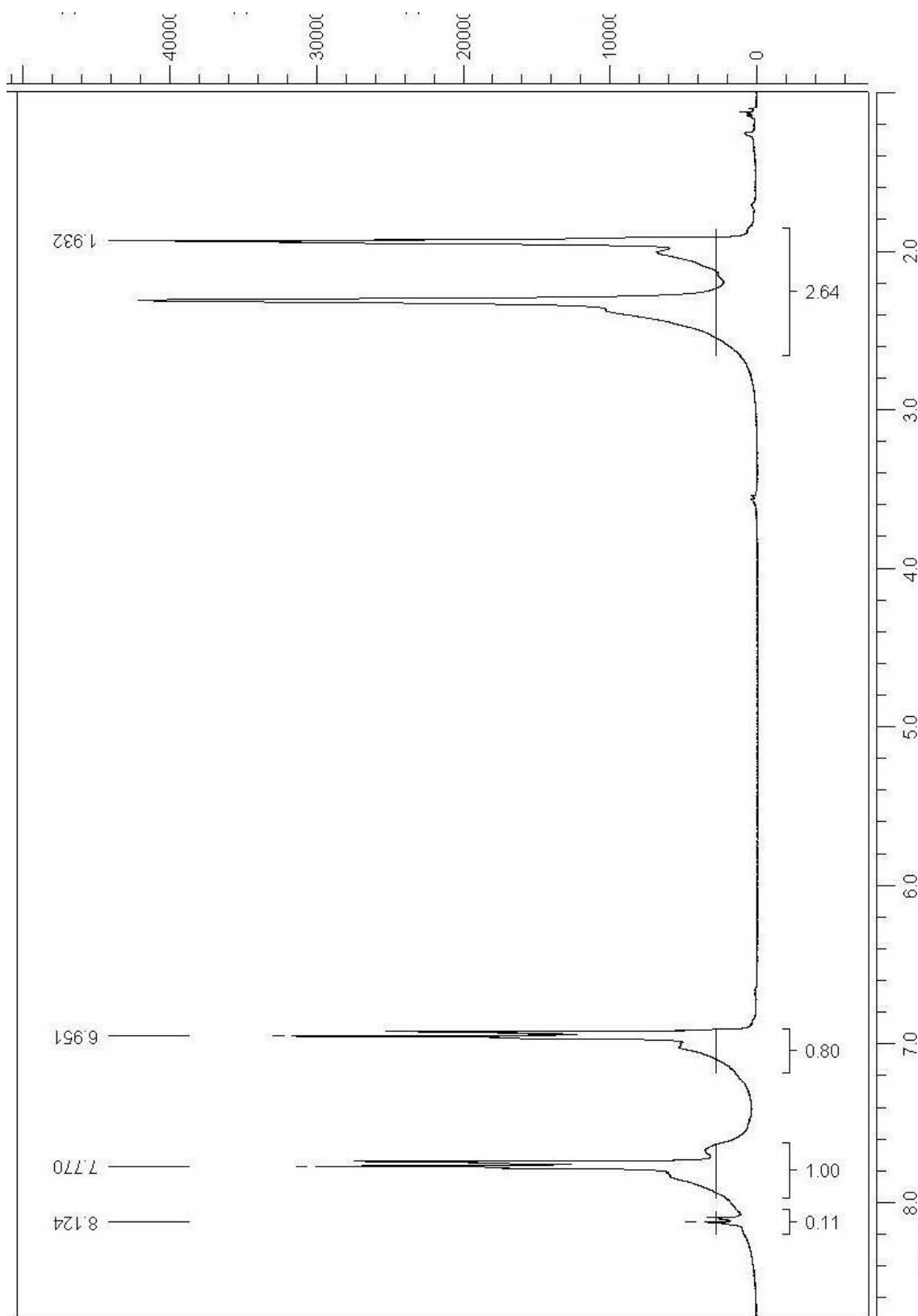


Figura 8.1 Espectro ^1H -RMN de 4, 4'-hidroxiazobenceno.

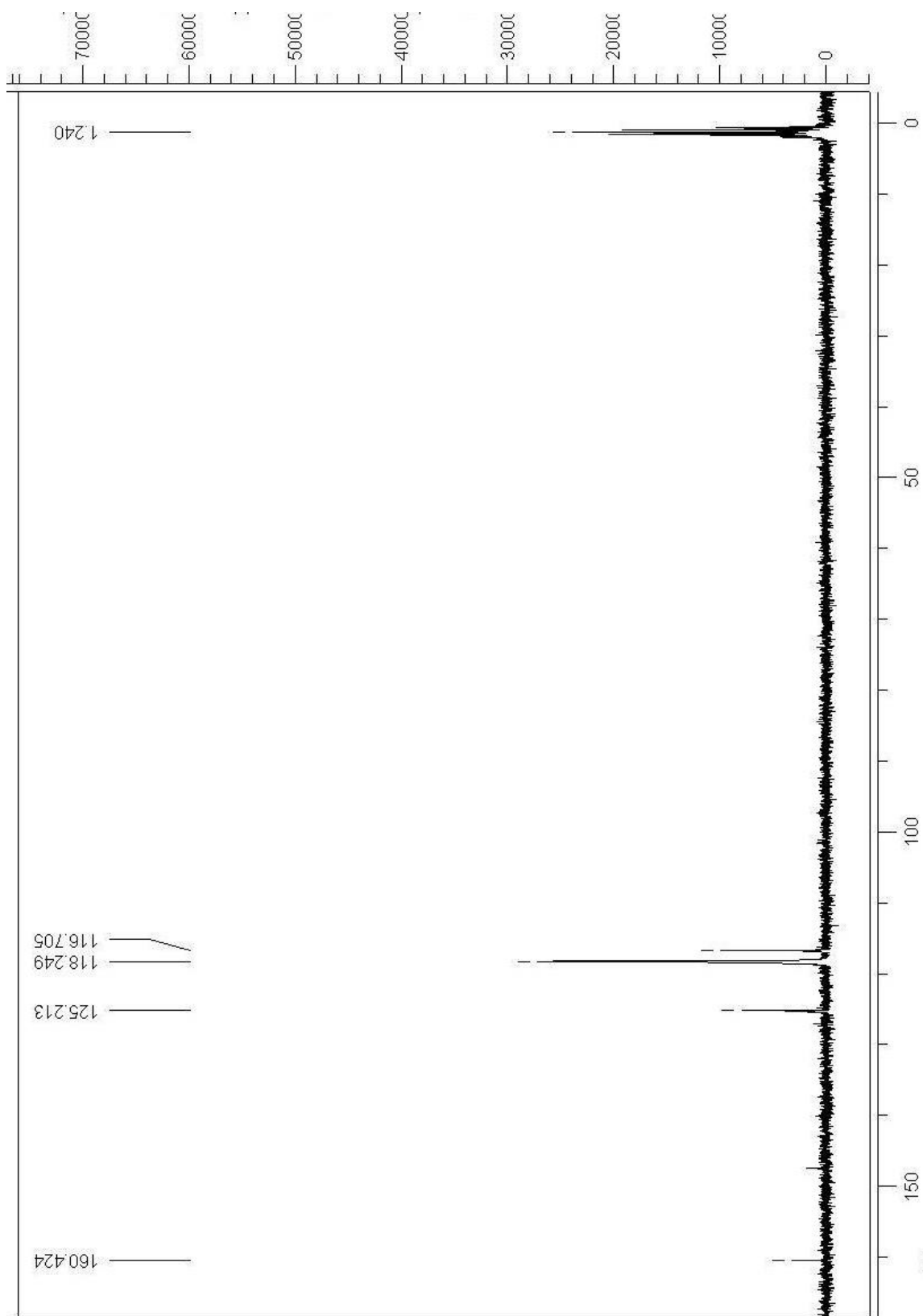


Figura 8.2 Espectro ^{13}C -RMN de 4, 4'-hidroxiazobenceno.

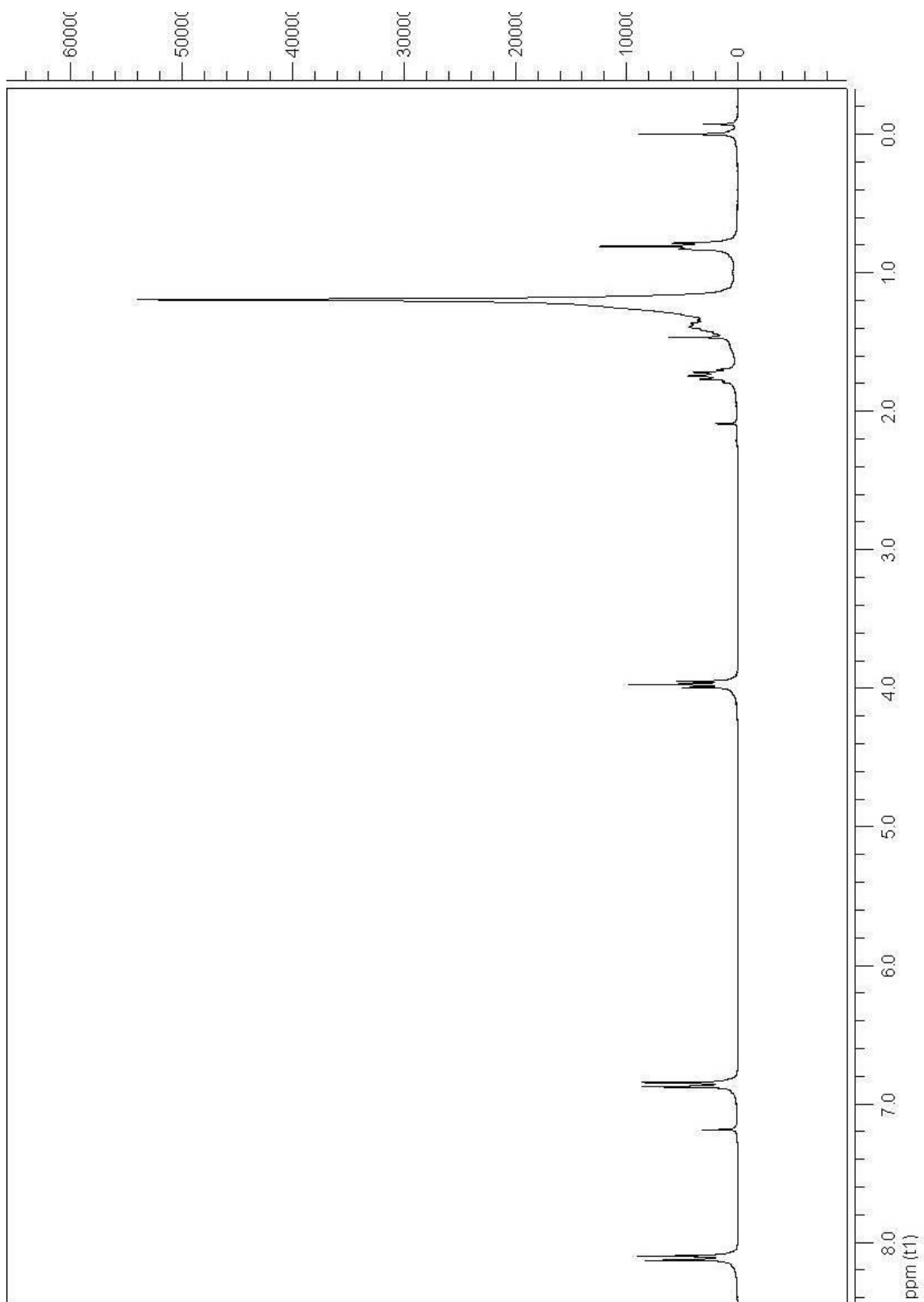


Figura 8.3 Espectro ^1H -RMN de 1-dodeciloxi-4-nitrobenceno (1A)

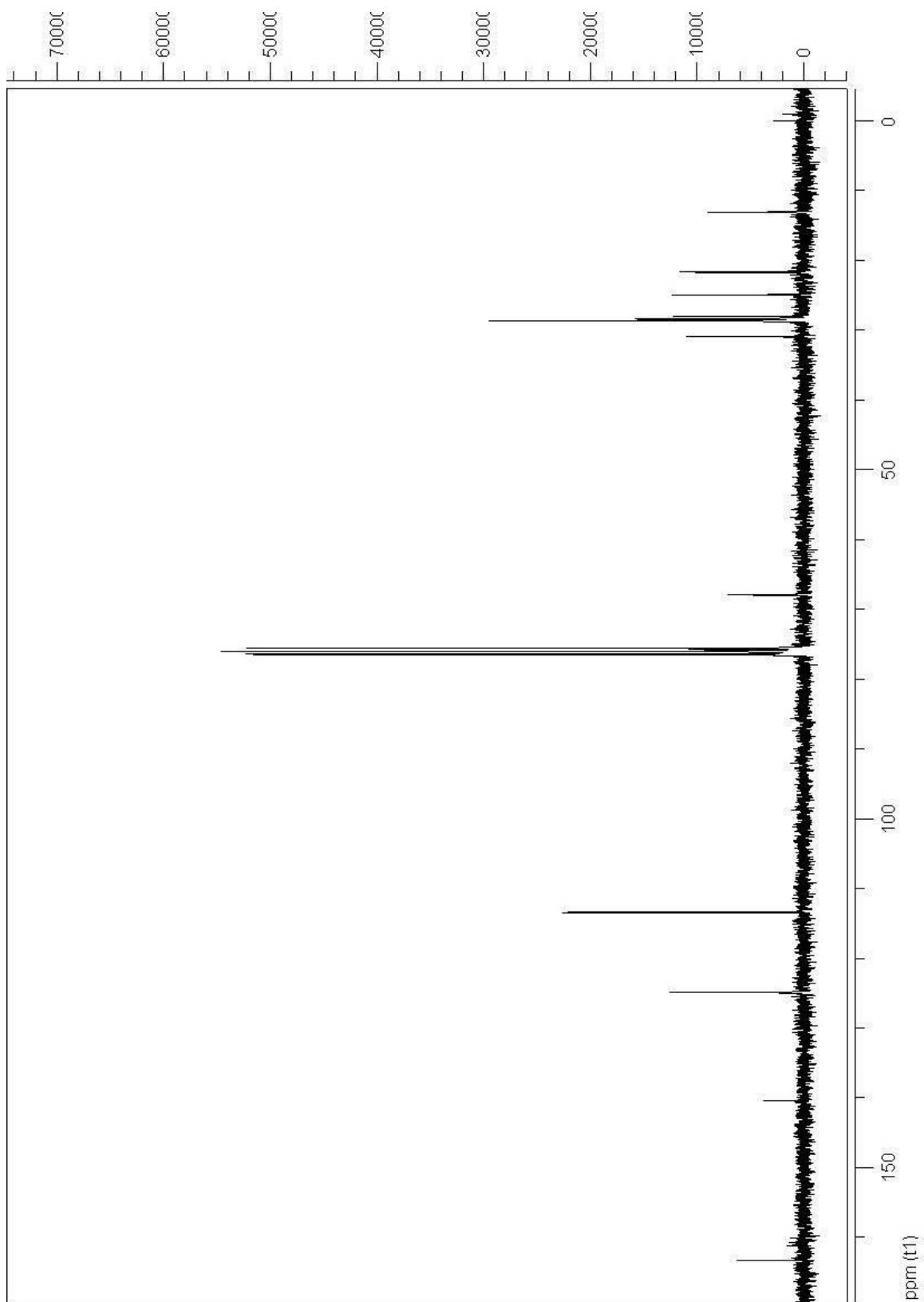


Figura 8.4 Espectro ^{13}C -RMN de 1-dodeciloxi-4-nitrobenceno (1A)

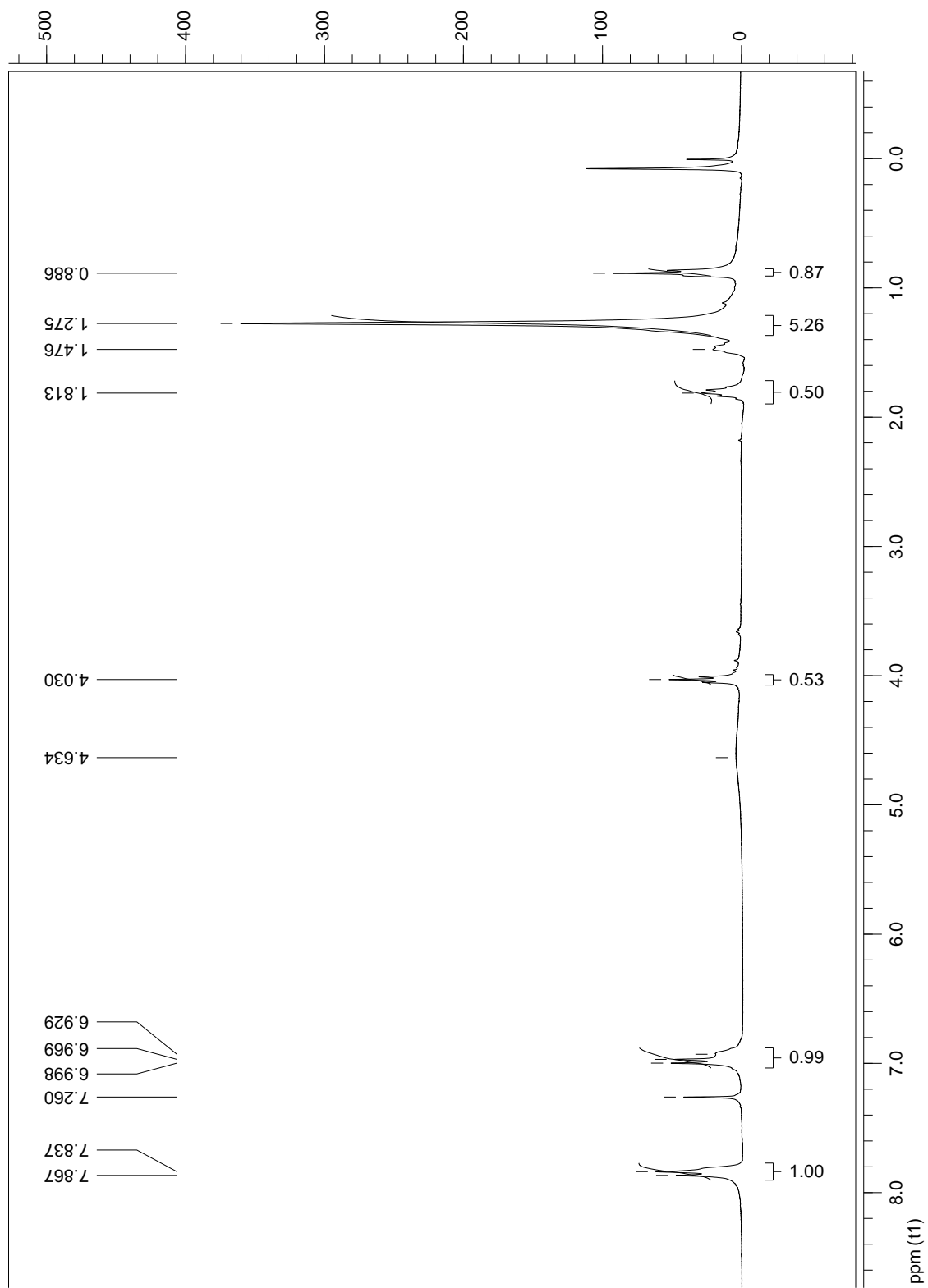


Figura 8.5 Espectro ^1H -RMN de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3A)

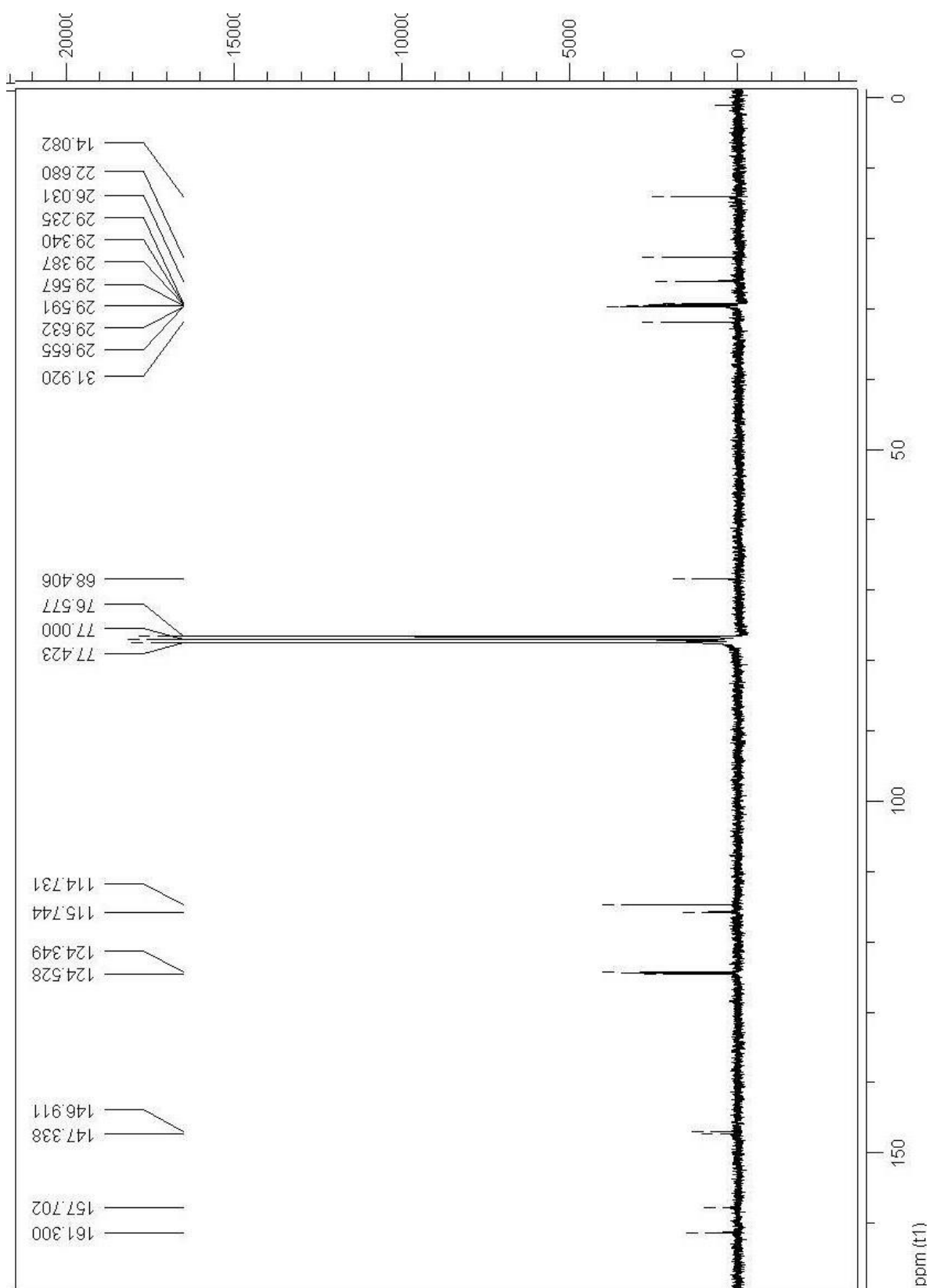


Figura 8.6 Espectro ^{13}C -RMN de 4-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3A)

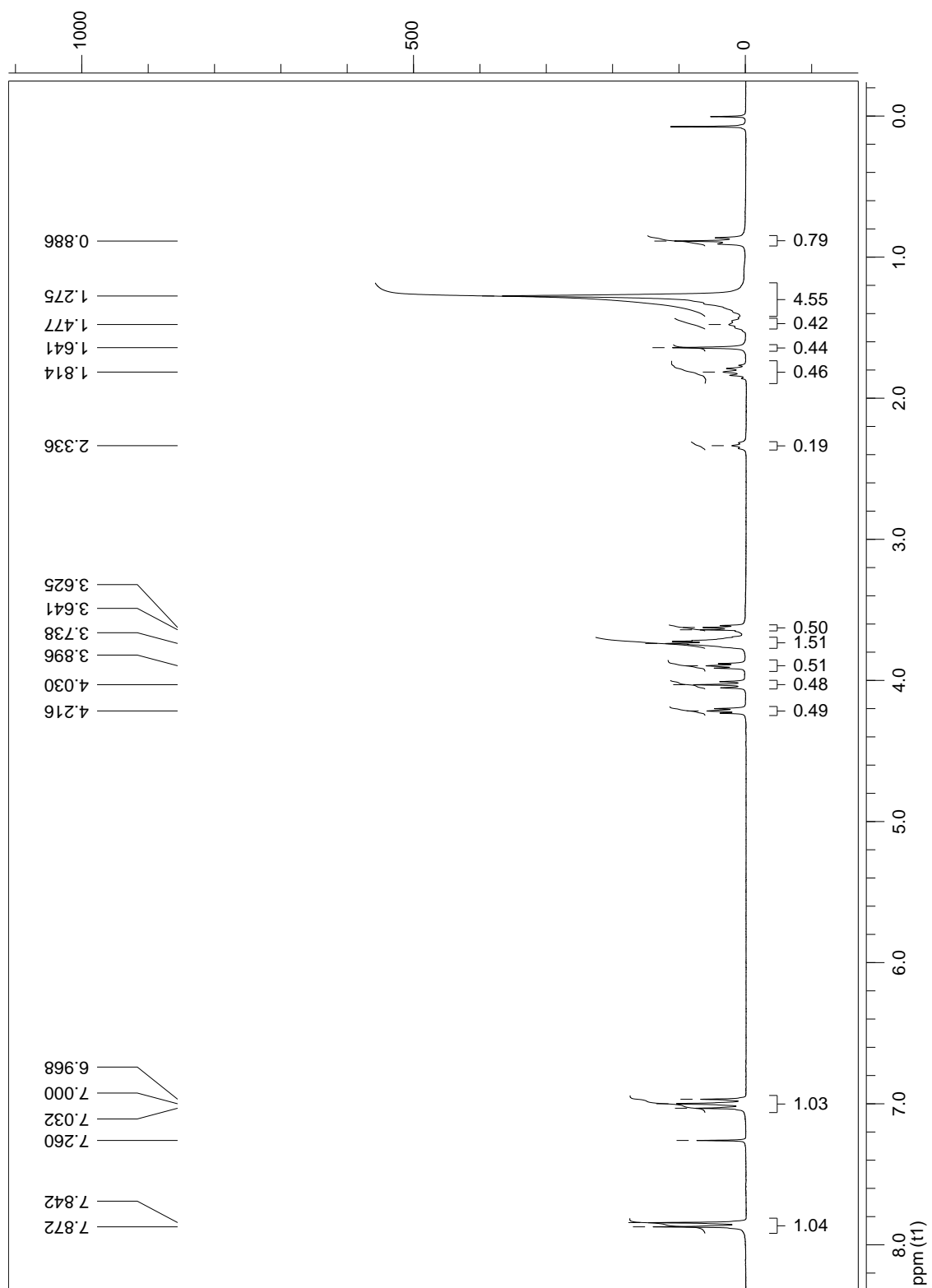


Figura 8.7 Espectro $^1\text{H-RMN}$ de 4-dodeciloxi-4' - (1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4A)

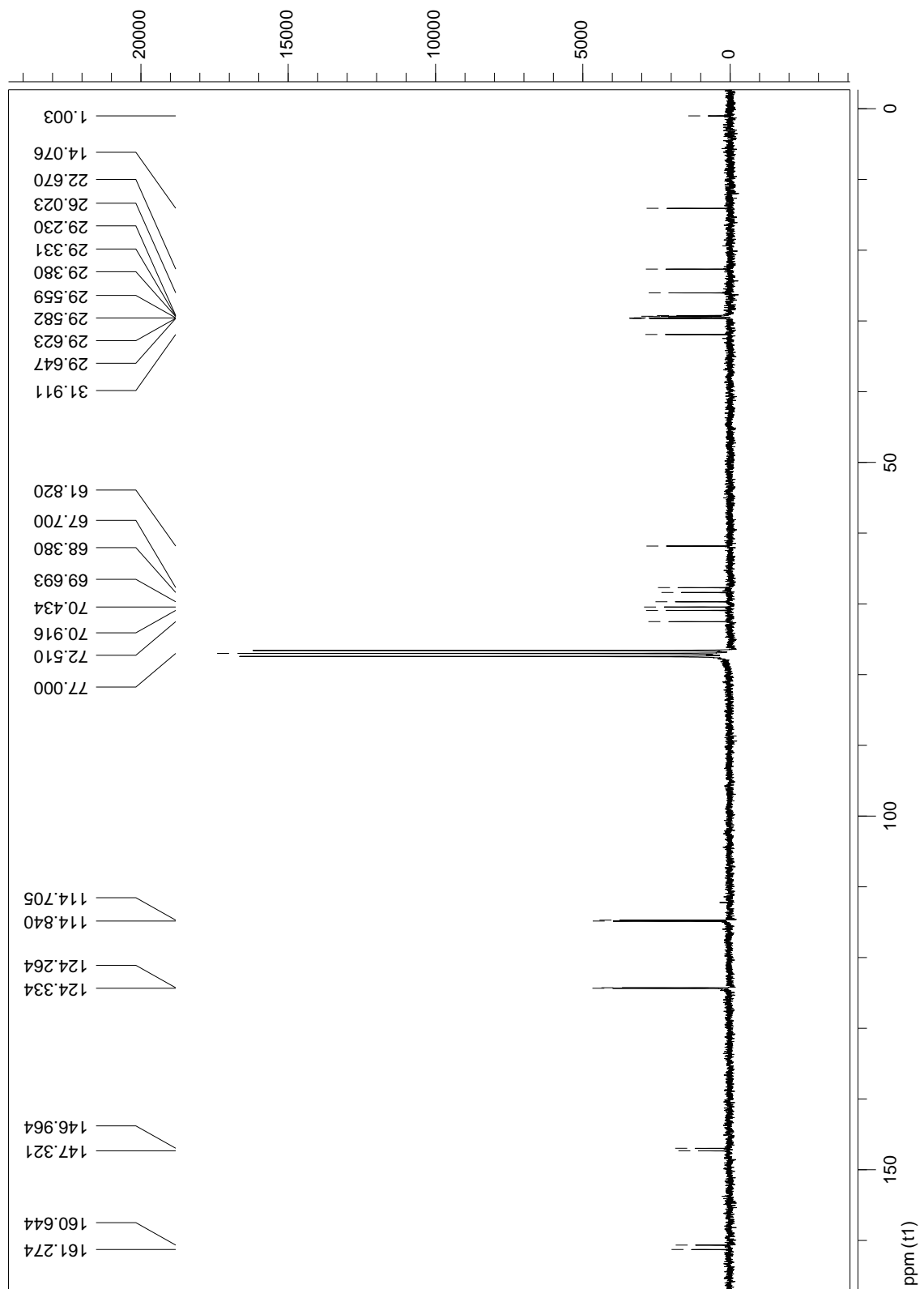


Figura 8.8 Espectro ^{13}C -RMN de 4-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4A)

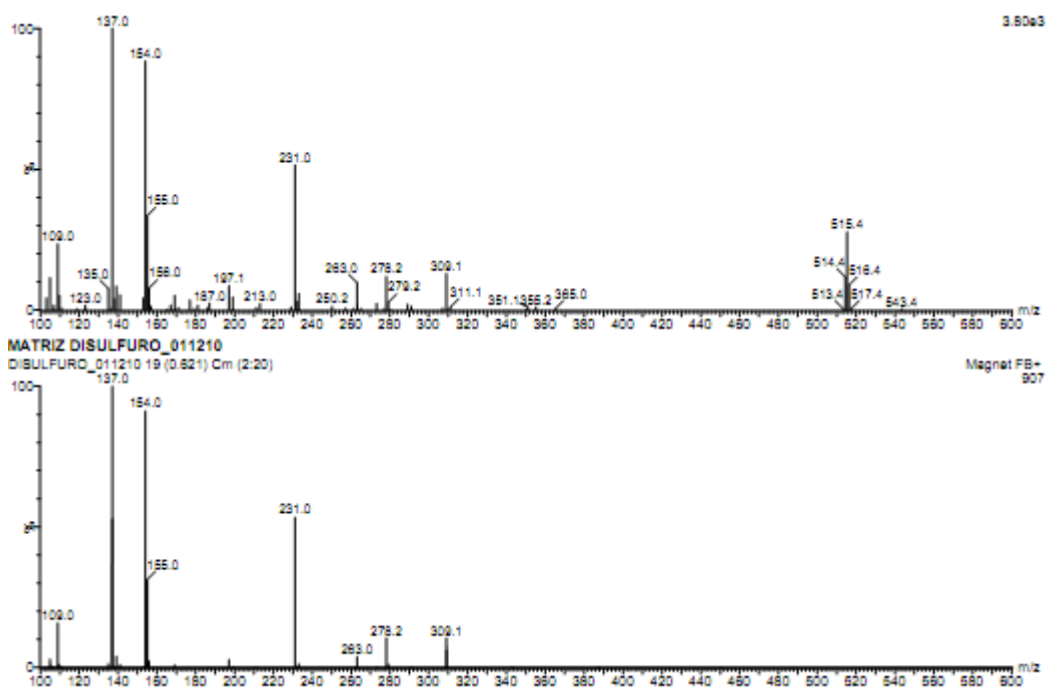


Figura 8.9 EM-FAB: (m/z): 515,40 ($M^+ + 1H^+$) de 4-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4A)

Elemental Composition Report

Multiple Mass Analysis: 160 mass(es) processed - displaying only valid results
 Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Selected filters: None

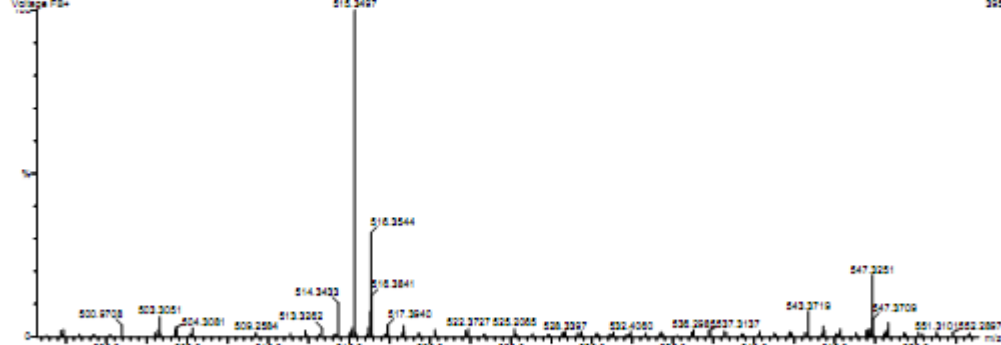
Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
 996 formula(e) evaluated with 3 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

12C: 28-30 13C: 0-4 H: 47-47 N: 2-2 O: 5-5

GRANJA A. MANUEL_078-A_514
 GRANJA A. MANUEL_078-A_514-4_45 (9.902) On (Det: A, 92.00, H): On (25.47)
 Voltage: FB+

UNIDADE DE MASSAS E PROTEOMICA, USC
 15-Dec-2010
 395



Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	L-PEP	Formula
515.3497	100.00	515.3485	1.2	2.3	9.5	6.3	C ₃₀ H ₄₇ N ₂ O ₅
516.3544	31.69	516.3519	2.5	4.8	9.5	7.2	C ₃₀ H ₄₇ N ₂ O ₅
517.3544	3.43	517.3552	-0.8	-1.5	9.5	6.3	C ₃₀ H ₄₇ N ₂ O ₅

Figura 8.10 EMAR: calculado para de 4-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B). calculado para C₃₀H₄₇N₂O₅: 515,3485. Encontrado: 515,3497.

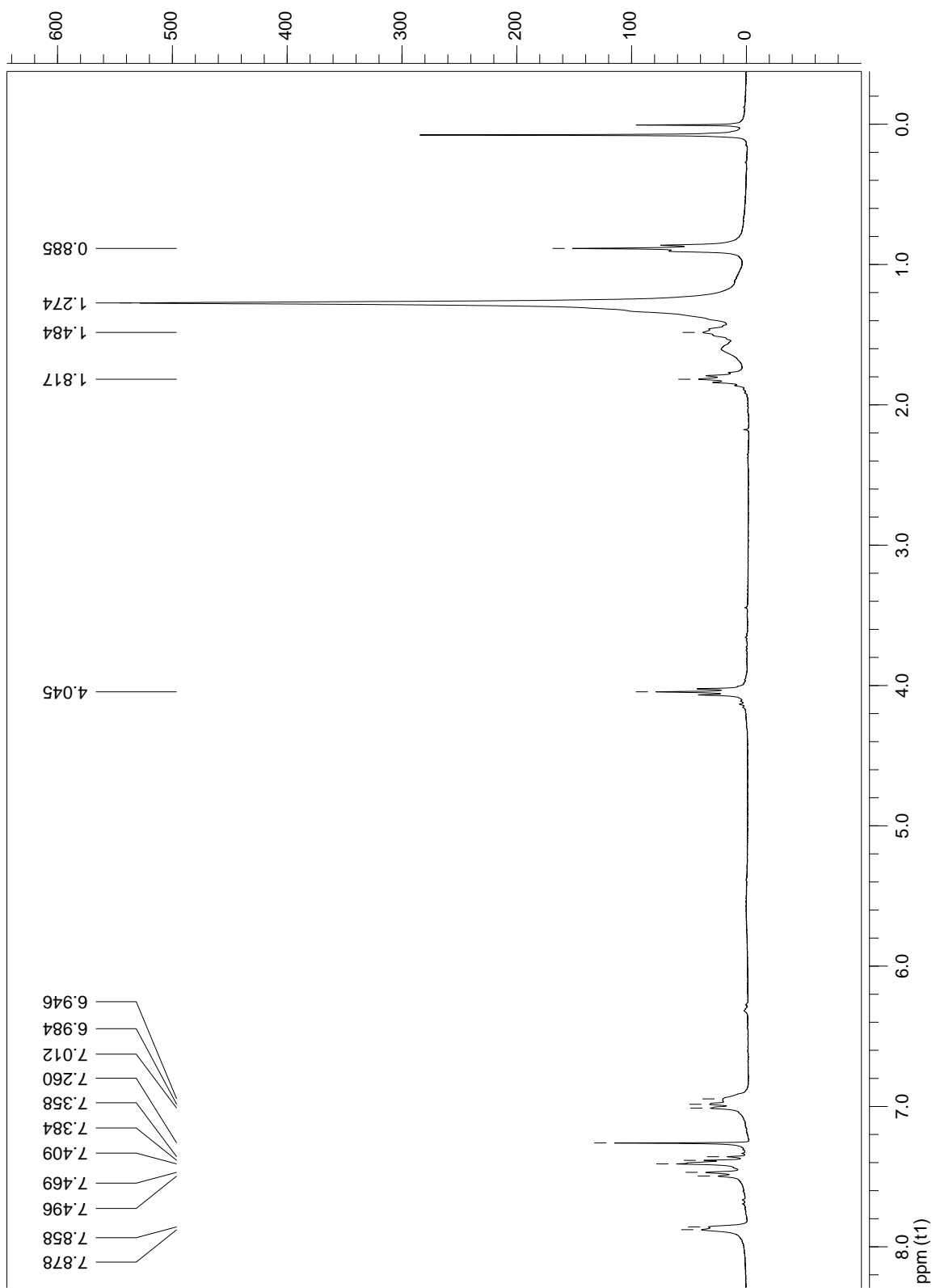


Figura 8.11 Espectro ^1H -RMN de 3-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3B)

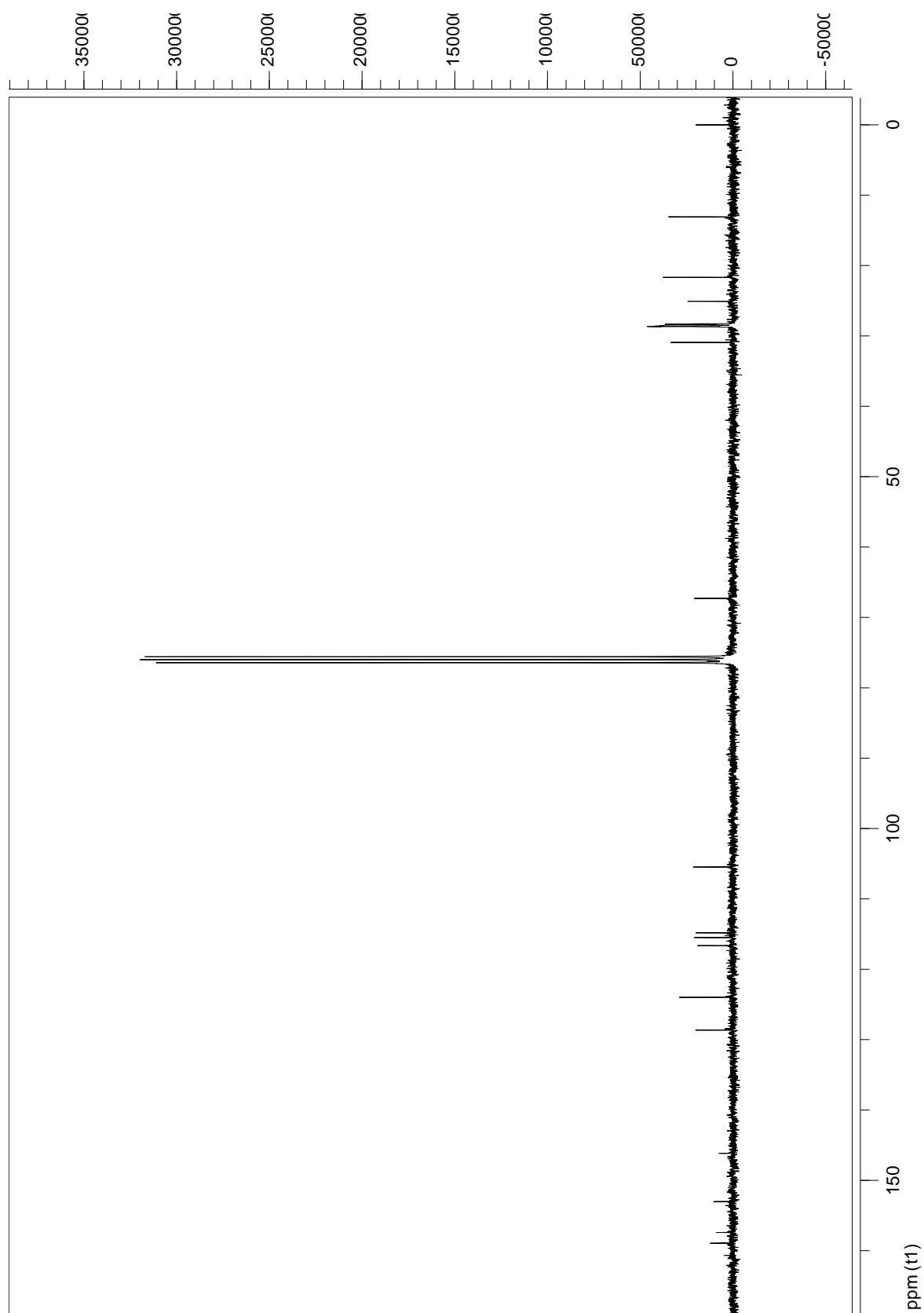


Figura 8.12 Espectro ^{13}C -RMN de 3-dodeciloxi-4'-hidroxiazobenceno (3B)

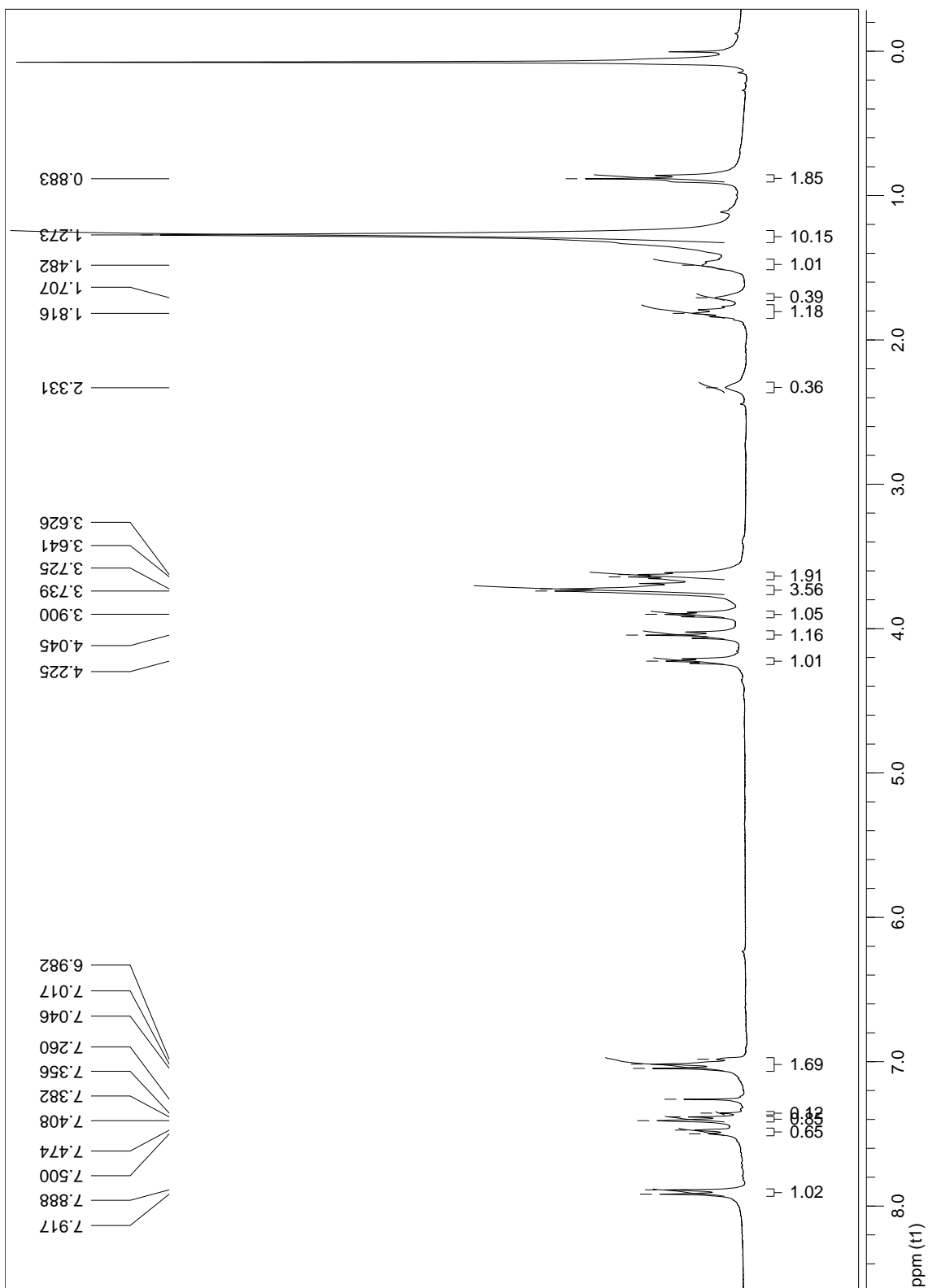


Figura 8.13 Espectro ^1H -RMN de 3-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B)

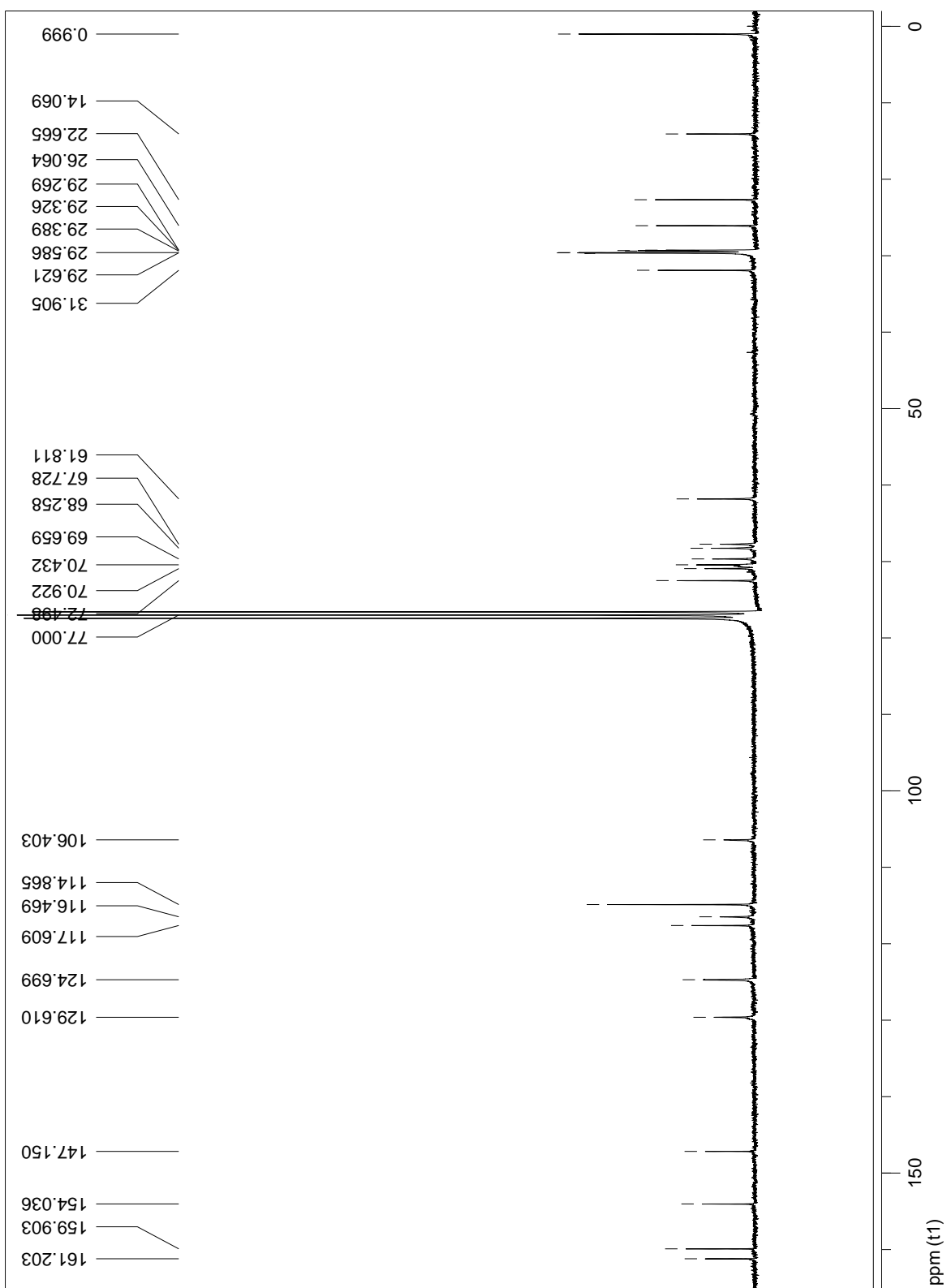


Figura 8.14 Espectro ^{13}C -RMN de 3-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B)

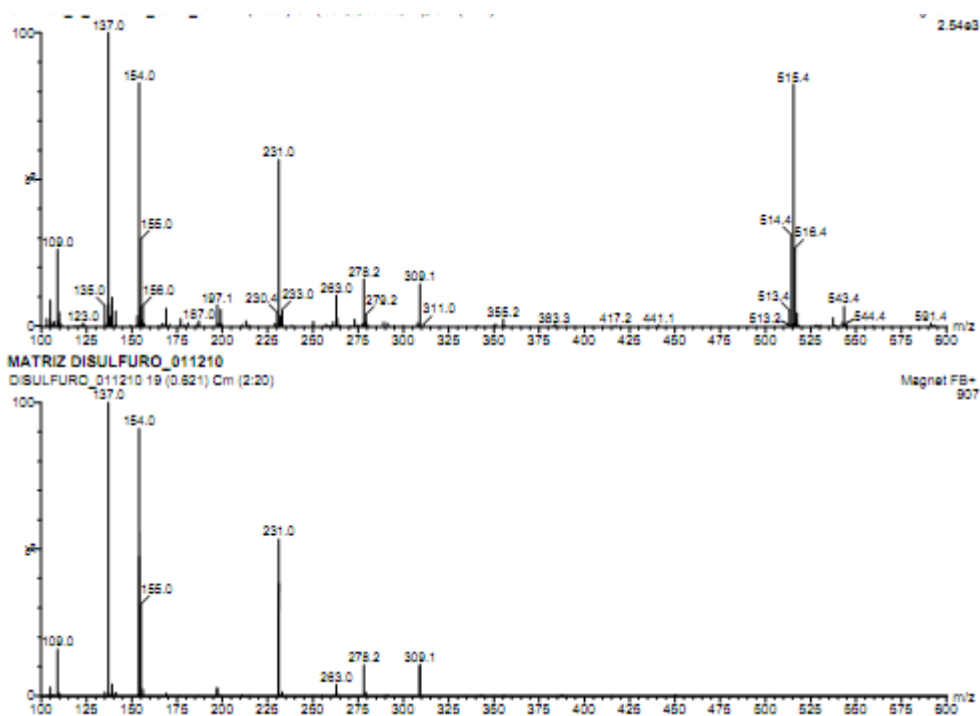


Figura 8.15 EM-FAB: (m/z): 515,40 ($M^+ + 1H^+$) de 3-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B)

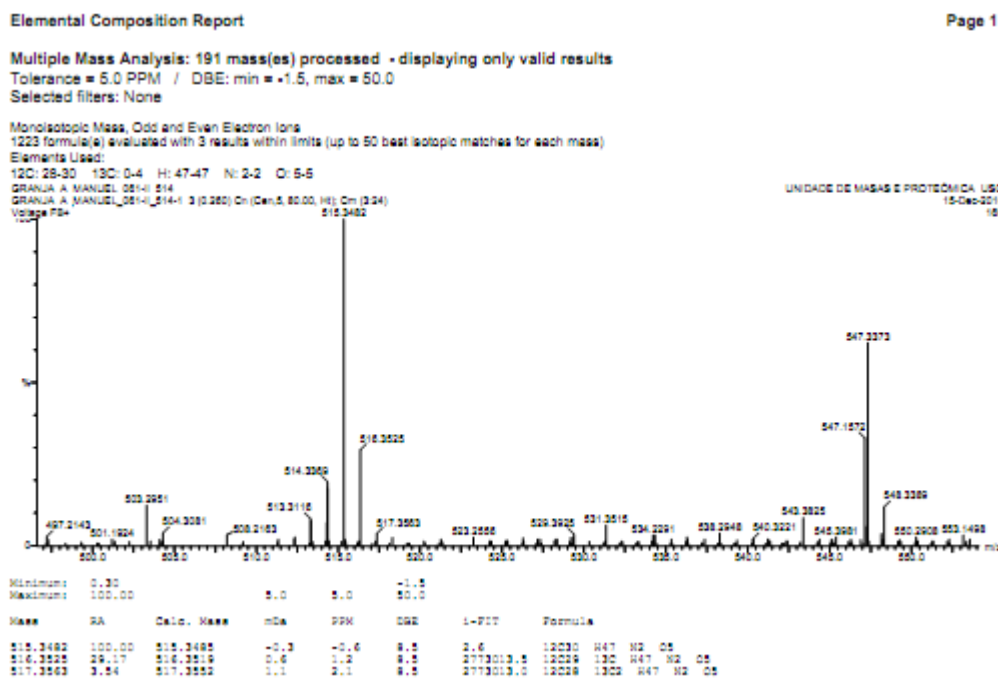


Figura 8.16 EMAR: calculado para de 3-dodeciloxi-4'-(1-hidroxitrietilenglicol) azobenceno (4B). $C_{30}H_{47}N_2O_5$: 515,3485. Encontrado: 515, 3482.

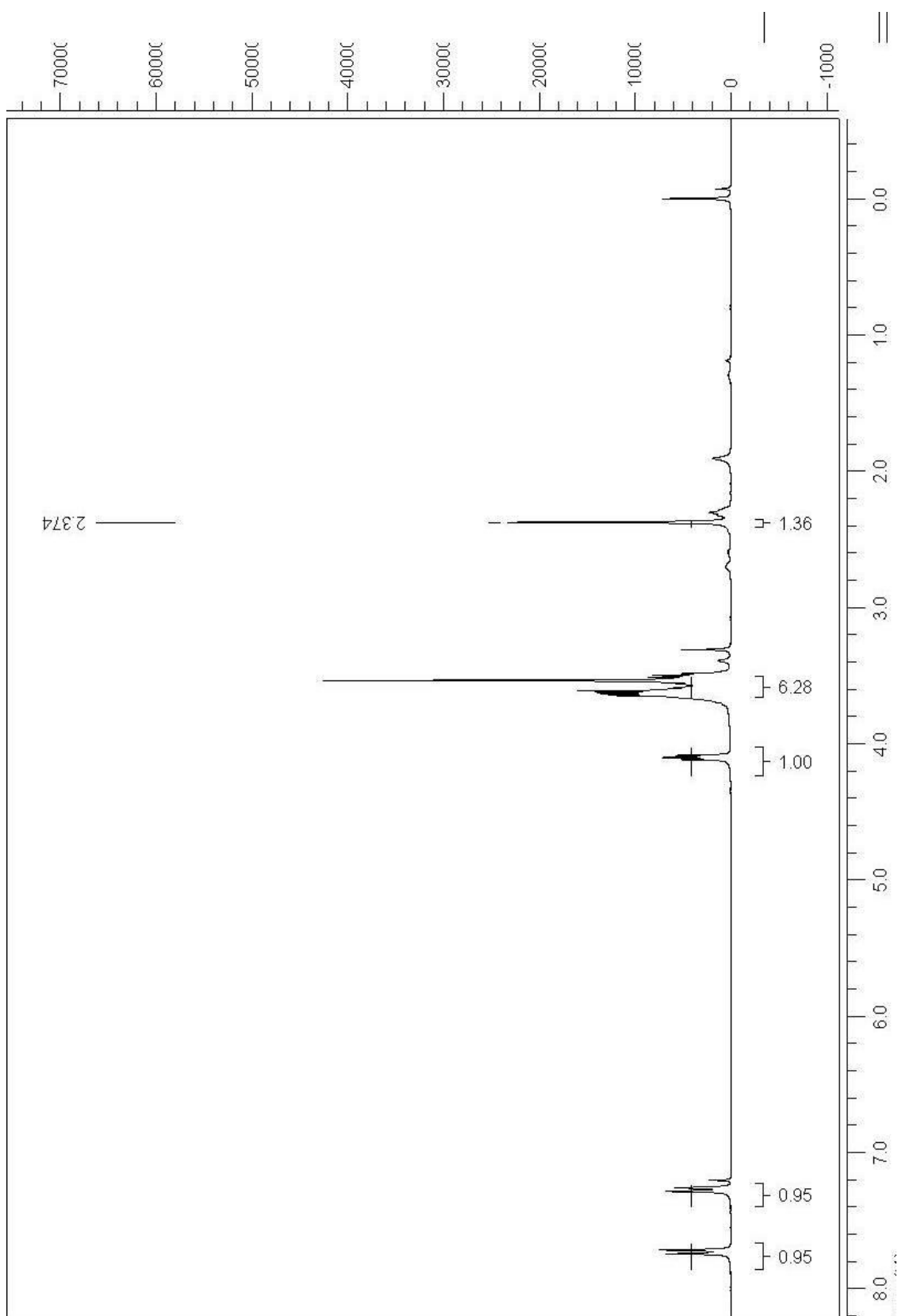


Figura 8.17 Espectro ^1H -RMN de trietilenglicol p-toluenesulfonato

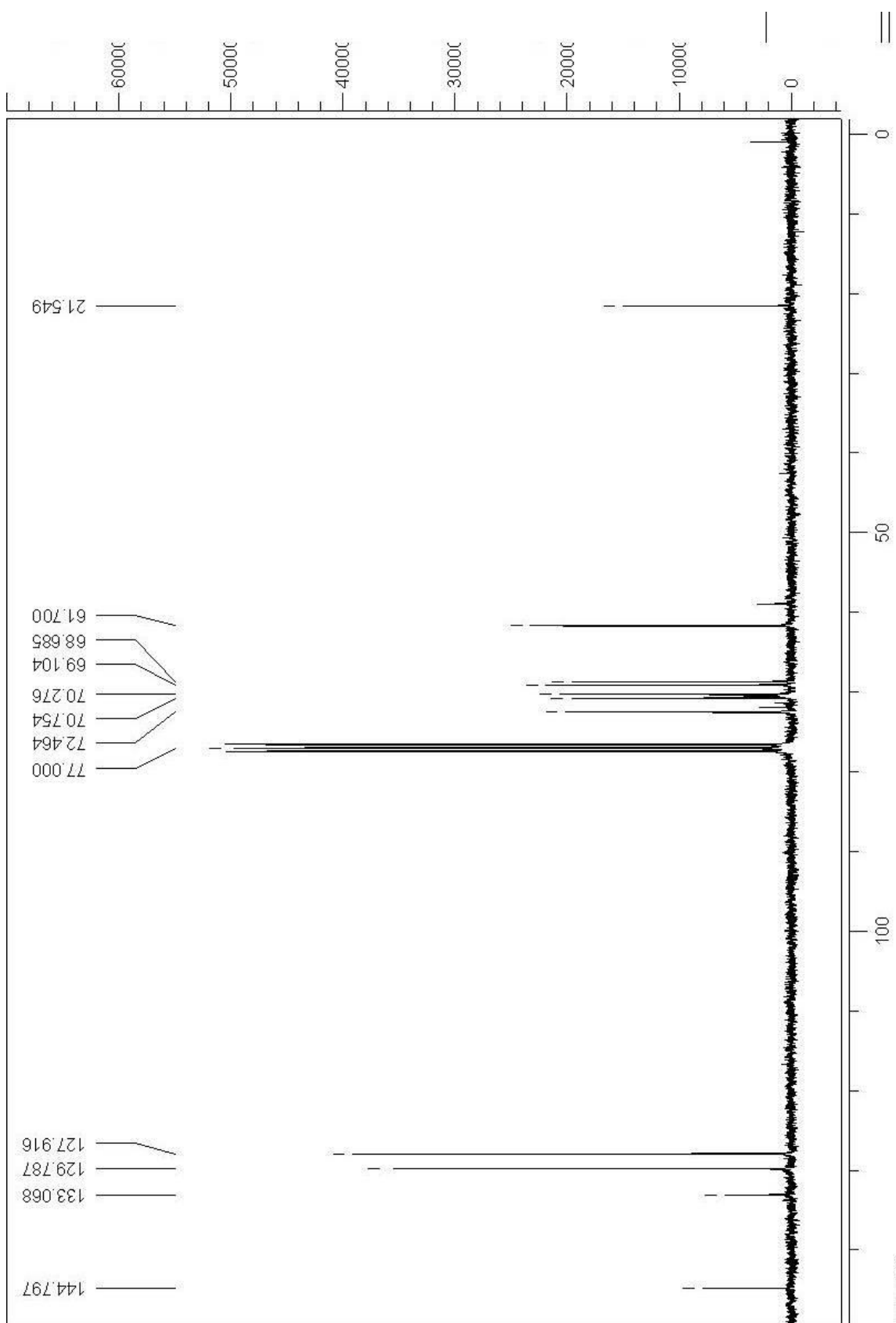


Figura 8.18 Espectro ^{13}C -RMN de trietilenglicol p-toluenesulfonato

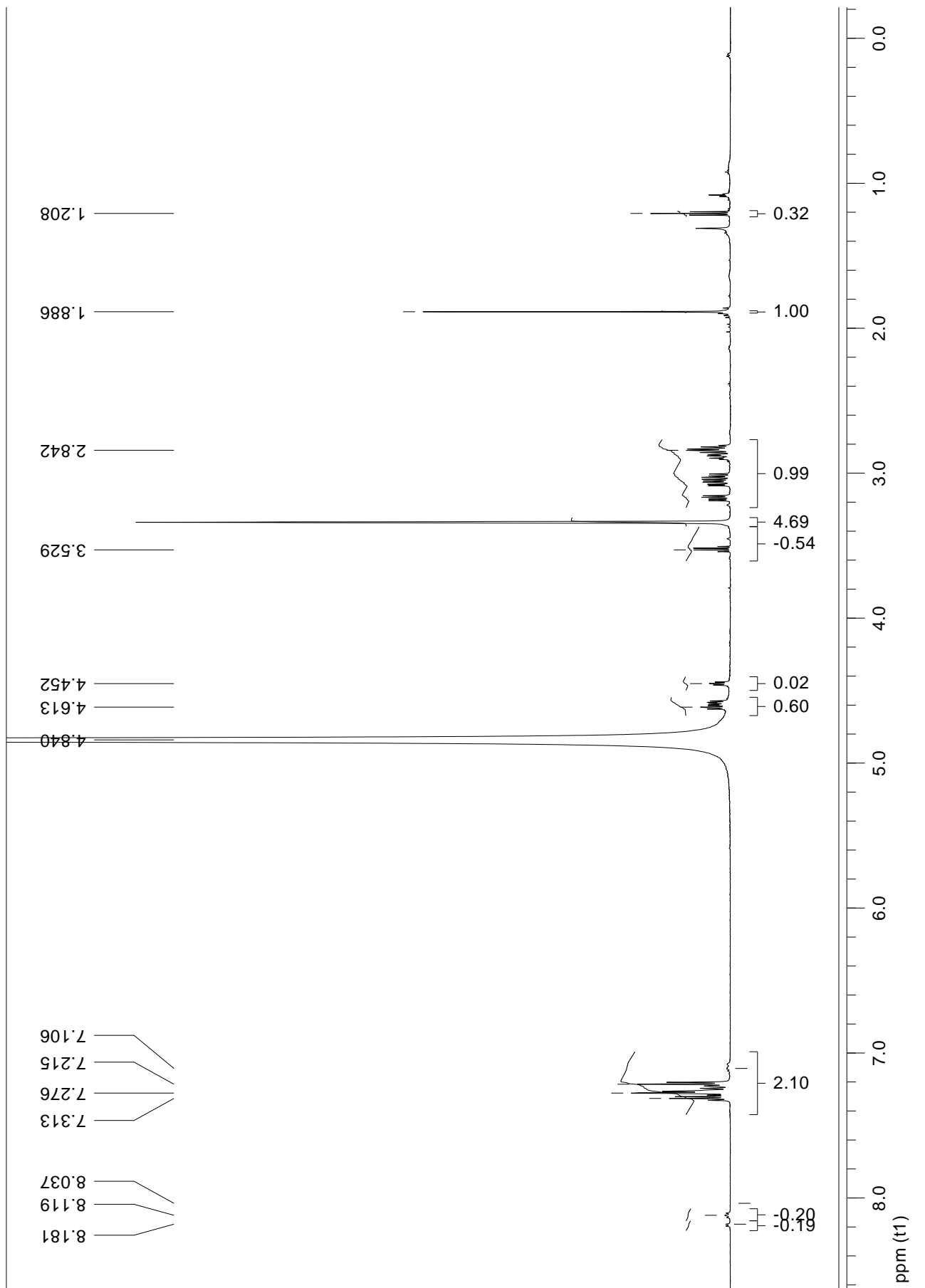


Figura 8.19 Espectro ^1H -RMN del Péptido A

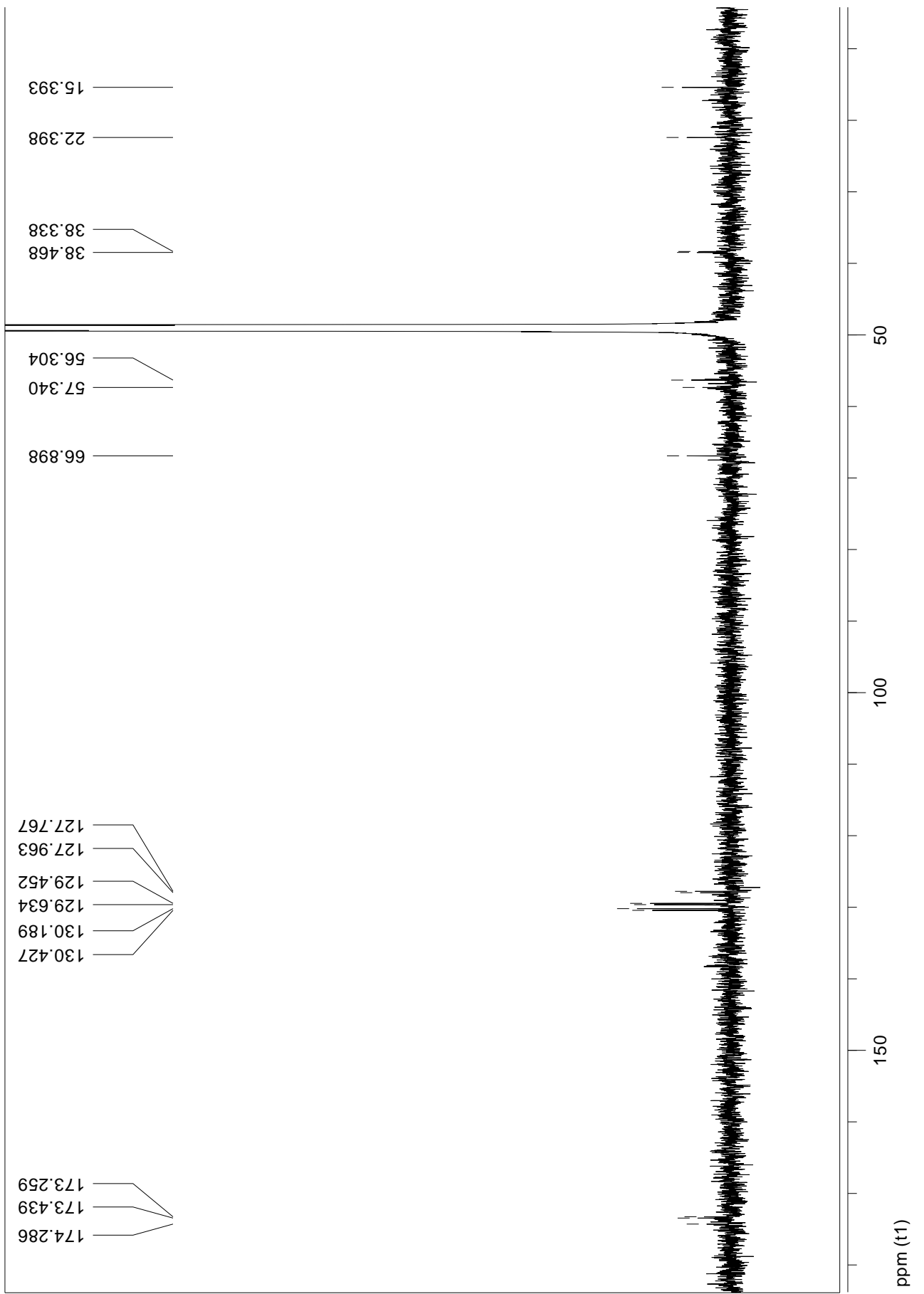


Figura 8.20 Espectro ^{13}C -RMN del Péptido A

Analysis Report

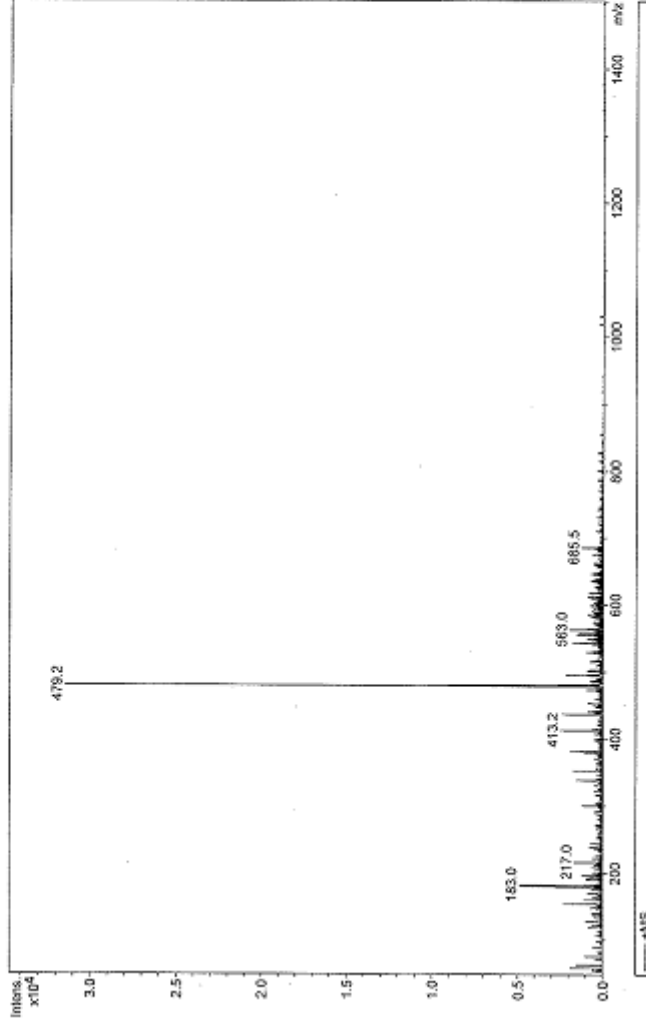
Analysis Info

Analysis Name: CC3_RitzefeldMa_0807_as03031_01.d
 Method: Tune-nan.MS
 Workgroup: CC3
 Comment: Ma. Ritzefeld, CC3, as03031, Melhanel

Esquire 3000

University of
 [Redacted]

Operator: Patruck
 Acquisition Date: 14.08.2012 14:10:25
 Print Date: 14.08.2012 14:12:07



Acquisition Parameter

Mode: NanoESI, off-line
Ion Source Type: Positive
Ion Polarity: Static/Normal
Mass Range Mode: 50 m/z
Scan Begin: 1500 m/z
Scan End: 20 Spectra
Averages: on
Rolling: on
Rolling Averages: 2 csa
Tune SPS:
Target Mass: 460 m/z
Compound Stability: 40 %
Smart Parameter Setting: active

Tune Instrument

Trap Drive: 43.4
Octopole RF Amplitude: 120.0 Vpp
Lens 2: -60.0 Volt
Capillary Exit: 94.4 Volt
Skim 1: 24.9 Volt
Skim 2: 5.0 Volt
Lens 1: -5.0 Volt
Cap Exit Offset: 69.5 Volt
Octopole: 2.59 Volt
Octopole Delta: 2.40 Volt
Dry Temp (Set): 100 °C
Nebulizer (Set): 2.00 psi
Dry Gas (Set): 2.00 l/min
Accumulation Time: 7285 µs
ICC Target: 5000
Charge Control: on

Analysis Report Spectrum

Analysis Info

Analysis Name OC3_RitzefeldMa_0807_as03031_01.d
Method Tune-nn,IMS
Workgroup OC3
Comment Ma_Ritzefeld, OC3, as03031, Methanol

Esquire 3000

Operator [REDACTED]
Acquisition Date 14.08.2012 14:10:25
Print Date 14.08.2012 14:12:30

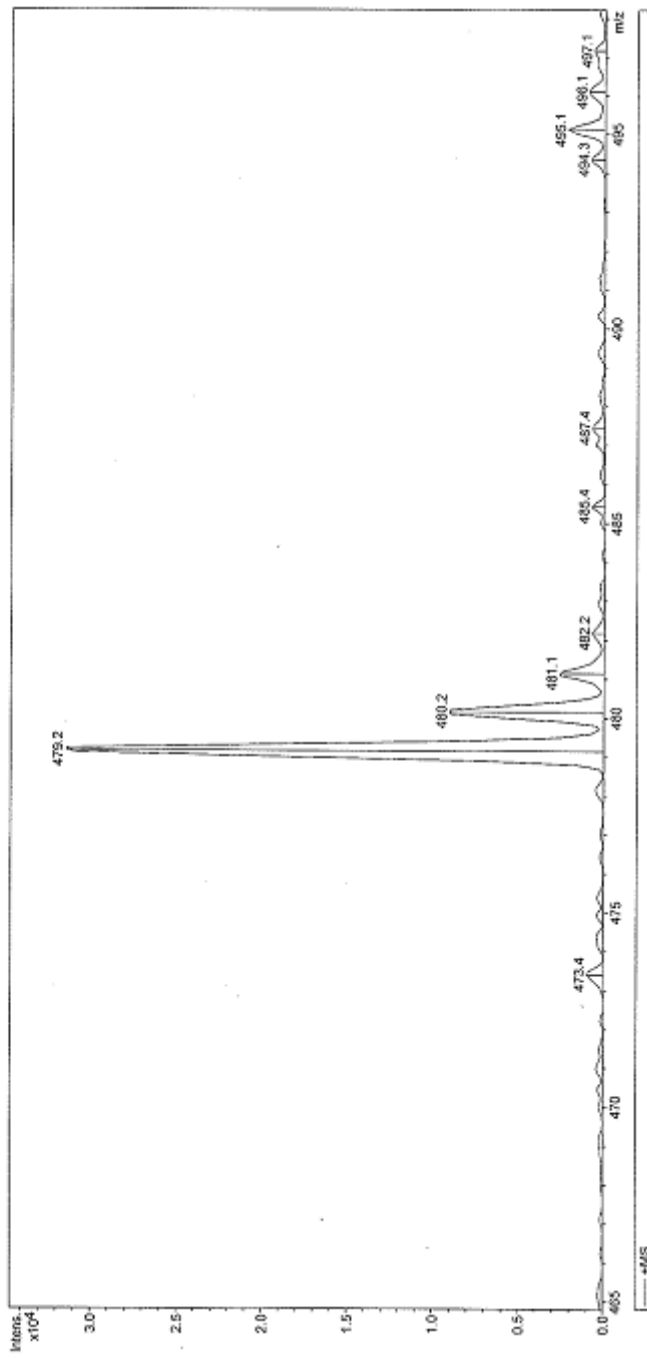
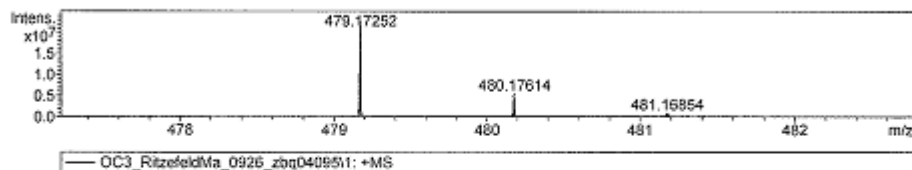


Figura 8.21 Espectro EM-ESI del Péptido A: [M+Na]⁺: 479,2.

Accurate Mass Measurement

Sample Name : zbq04095
Sample Supplier : Ritzefeld, Markus **Group :** OC3
Sample Filename : S:\APEX\aktuell\OC3\OC3_RitzefeldMa_0926_zbq04095\

Instrument : Bruker FT-ICR : APEX III (7.0 T)
Ionisation Method : ESI
Matching Method : HR with external calibration
Resolution : > 20000
Substance Inlet : ESI nano - Spray Emitter



Measured Ion Mass(es) : 479,17252 **Deviation [mmu] :** 0,17

Calculated Ion Mass(es) : 479,17235 **Deviation [ppm] :** 0,36

Potential Molecular Formula : C₂₃H₂₈N₄O₄S₁Na⁺

Comment : Measured and calculated masses are true ion masses, taking into account the mass of lost (or added) electrons.

Analysis Report Spectrum

Analysis Info
Analysis Name OC3_RitzefeldMa_0926_zbcq0409511
Apex III FT-ICR MS
University of Mainz
Acquisition Date 01.10.2012 15:15:09
Print Date 01.10.2012 16:38:45

Comment Ma, Ritzefeld, OC3, zbcq04095, ACN, ESI+

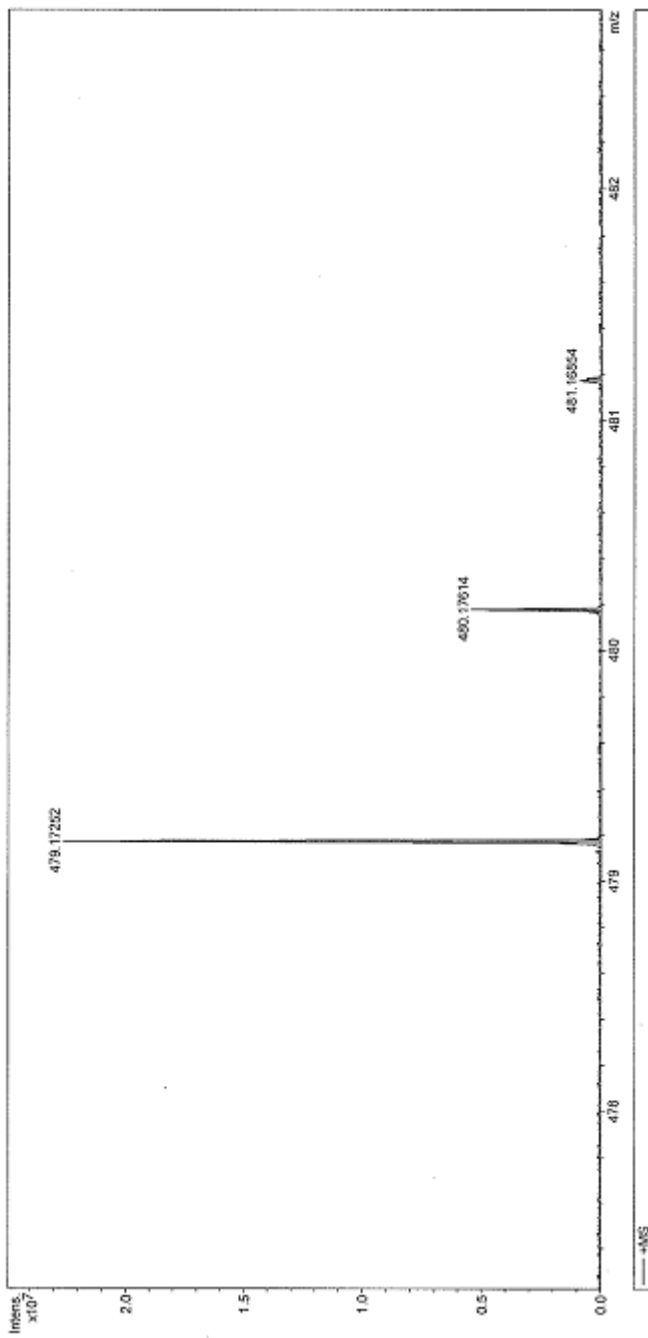


Figura 8.22 Espectro EM-AR del Péptido A: calculado para $C_{23}H_{28}N_4O_4S_1Na^+$ 479,17252, obtenida 479,17235.

