



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

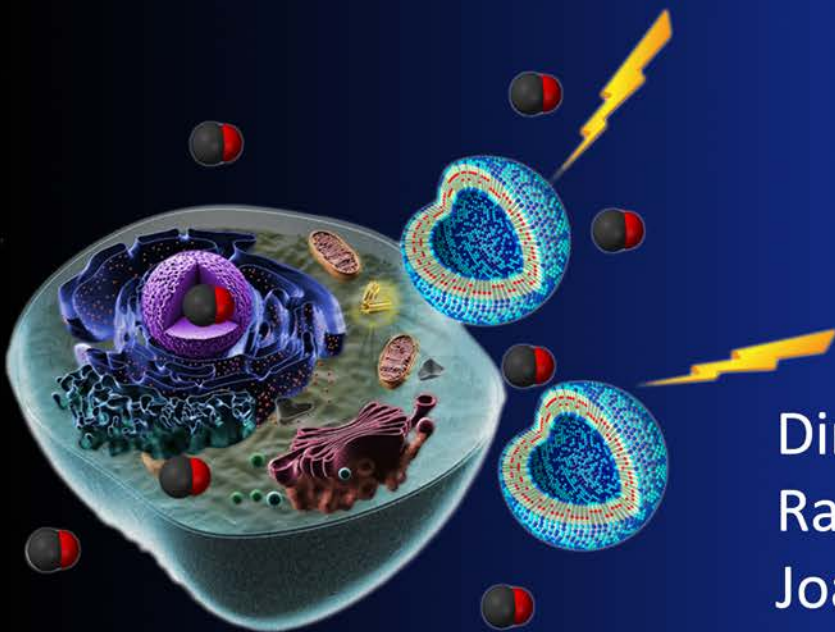
**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

## Metal·lotensioactius i fosfolípids: estudi d'agregats supramoleculars com a sistemes alliberadors de monòxid de carboni

Maribel Marín García

Tesi Doctoral  
2017



Directors:  
Ramon Barnadas Rodríguez  
Joan Suades Ortuño





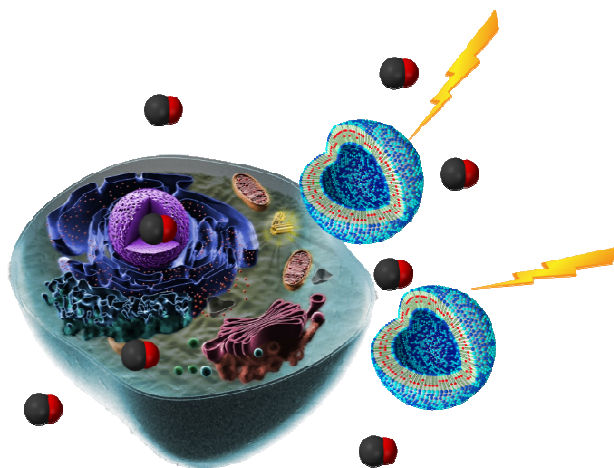


---

# **Metal·lotensioactius i fosfolípids: estudi d'agregats supramoleculars com a sistemes alliberadors de monòxid de carboni**

---

**Tesi Doctoral**



**Maribel Marín García**

2017

Universitat Autònoma de Barcelona

**UAB**



**PROGRAMA DE DOCTORAT:**

Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

**METAL·LOTENSIOACTIUS I FOSFOLÍPIDS: ESTUDI  
D'AGREGATS SUPRAMOLECULARS COM A SISTEMES  
ALLIBERADORS DE MONÒXID DE CARBONI**

Memòria presentada per MARIBEL MARÍN GARCÍA per a optar al títol de Doctora  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Maribel Marín García

La present Tesi Doctoral ha estat realitzada a la Unitat de Biofísica, en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Ramon Barnadas Rodríguez i el Dr. Joan Suades i Ortuño, els quals autoritzen la seva presentació.

Dr. Ramon Barnadas Rodríguez

Dr. Joan Suades i Ortuño





# Abstract

Carbon monoxide (CO) has long been considered as a toxic gas to human health because of its lethal nature, causing death by asphyxia. The toxicity of CO is attributed in part to its high affinity for hemoglobin (Hb), which is about 220 times higher than that of Hb for O<sub>2</sub>. Against this dogma is the fact that small amounts of CO are produced endogenously in the human body and the production of CO is associated with a variety of physiological roles, such as anti-inflammatory and anti-proliferation effects. In order to use CO as a therapeutic agent, substantial research efforts have been devoted to the development of CO releasing molecules (CORMs) as an alternative for a safety and controlled delivery of the gas. With this aim in mind, two families of molybdenum carbonyl metallosurfactants (MTS) have been synthesized in the present work by means of the coordination of the surfactant phosphines Ph<sub>2</sub>P(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>Na; n = 2, 6 and 10, to the fragments {Mo(CO)<sub>4</sub>} and {Mo(CO)<sub>5</sub>}. These MTS are used to obtain mixed systems with phospholipids, in particular soy phosphatidylcholine (SPC), in order to use them as CORMs. It should be mentioned that there are no precedents of this type of systems used for this purpose.

In aqueous solution, and depending on the SPC/MTS ratio, different types of supramolecular aggregates are formed (basically metallosomes and nanoaggregates), showing the peculiarity that the metal atom is located in a characteristic hydrophobic environment. These systems are able to deliver CO, which can be modulated photochemically using UVA or visible radiation. So, they can be classified as a new type of PhotoCORMs.

Metallosomes prepared in this work show the characteristic properties of liposomes. They are kinetically stable upon dilution, presenting a toxicity at least tenfold lower than that of the metallosurfactant aggregates without phospholipids, and the presence of the MTS allows them to deliver CO upon irradiation. Moreover, studies with synchrotron radiation have shown the incorporation of MTS to cells after incubation with metallosomes. All these properties make these systems suitable for the preparation of new metal based pharmaceuticals.



# Resum

El monòxid de carboni ha estat considerat tradicionalment com un potent tòxic de naturalesa letal principalment degut a la seva gran afinitat amb l'hemoglobina, unes 220 vegades major que l'afinitat de l'Hb per l'oxigen. Malgrat la merescuda reputació, al cos humà es produeixen constantment, de forma endògena, petites quantitats de CO que han estat associades a processos fisiològics antiinflamatoris, antiproliferatius, etc. Amb la finalitat d'aplicar terapèuticament aquestes propietats, el desenvolupament de molècules capaces d'alliberar monòxid de carboni (CORMs) de forma controlada ha esdevingut un camp molt estudiat. Seguint aquesta línia, en aquest treball es presenten dues famílies de metal·lotensioactius carbonílics de molibdè mitjançant la coordinació de les fosfines tensioactives  $\{\text{Ph}_2(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3, n= 2, 6 \text{ i } 10\}$  als fragments  $\{\text{Mo}(\text{CO})_4\}$  i  $\{\text{Mo}(\text{CO})_5\}$ , a partir dels quals s'obtenen sistemes mixtes amb fosfatidilcolina de soja (SPC) amb la finalitat de ser emprats com a CORMs. Cal destacar que no existeixen precedents de sistemes d'aquest tipus per ser emprats amb aquesta finalitat.

En solució aquosa i en funció de la proporció SPC/metal·lotensioactiu, es formen agregats supramoleculars de diferents tipus (bàsicament metal·losomes o nanoagregats), amb la peculiaritat que l'àtom metàl·lic queda disposat a la zona hidrofòbica de la membrana lipídica. Els sistemes són capaços d'alliberar CO, i aquest alliberament pot ser modulats fotoquímicament amb llum UVA i visible, de manera que es poden classificar com un nou tipus de PhotoCORMs.

Els metal·losomes preparats en aquest treball presenten certs avantatges típics dels liposomes, obtenint-se sistemes estables front la dilució, amb nivells de toxicitat molt inferiors als dels complexos purs, i degut a la presència dels metal·lotensioactius són capaços d'alliberar CO en ser irradiats. A més, mitjançant estudis amb llum sincrotró s'han detectat a l'interior de cèl·lules incubades amb ells. Les característiques referides fan d'aquests sistemes uns bons candidats per ser emprats farmacològicament.



## Abreviatures

A, Abs	Absorbància
cmc	Concentració micel·lar crítica
CORM	<i>Carbon monoxide releasing molecule</i> (Molècula alliberadora de monòxid de carboni).
Cryo-TEM	Microscòpia electrònica de transmissió criogènica
DesoxiMb	Mioglobina reduïda
DHPC	Dihexanoil fosfatidilcolina
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (dispersió dinàmica de la llum)
DMPC	Dimiristoil fosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DPX	Bromur de p-xilen-bis-piridini
$\epsilon$	Coefficient d'extinció molar
EtOH	Etanol
FL2	Compostos de la família L2 (L2, TL2 i PL2)
FL6	Compostos de la família L6 (L6, TL6 i PL6)
FL10	Compostos de la família L10 (L10, TL10 i PL10)
FRR	Flux relatiu entre fase orgànica i fase aquosa
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier)
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamel·lar de mida molt gran)
Hb	Hemoglobina
HbCO	Carboxihemoglobina

## *Introducció*

HO	Hemo oxigenasa
HPTS	Piranina (sal trisòdica de l'àcid 8-hidroxi-1,3,6-pireniltrisulfònic)
I	Intensitat
IR	Infraroig
L	Lligand
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamel·lar de mida gran)
M	Metall
M.W.	Massa molecular
Mb	Mioglobina
MbCO	Carboximioglobina
MeOH	Metanol
MLV	Multilamellar vesicle (sistema vesicular multilamel·lar)
MRI	Ressonància magnètica d'imatge
MTS	<i>Metallosurfactant</i> (metal·lotensioactiu)
MVV	<i>Multivesicular vesicle</i> (vesícula multivesicular)
OLV	<i>Oligolamellar vesicle</i> (vesícula oligolamel·lar)
PBS	Solució tampó de fosfat
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PhotoCORM	Molècula alliberadora de monòxid de carboni activada fotoquímicament
RMN	Ressonància magnètica nuclear
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia d'exclusió molecular)

SPC	Fosfatidilcolina de soja
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i> (vesícula unilamel·lar de mida petita)
$t_{1/2}$	Temps de vida mitjana
TFR	Flux total d'entrada
UCNPs	<i>Upconversion nanoparticles</i>
UPA	<i>Ultrafine particle analyser</i>
$\lambda$	Longitud d'ona
$\lambda_{exc}$	Longitud d'ona d'excitació
$\mu$ -FTIR	<i>Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier)





# Agraïments

Una tesi doctoral és un viatge intel·lectual apassionat ple d'incerteses i de nous descobriments, un procés dolç i amarg alhora que ens qüestiona constantment, és un repte i una aventura d'on se surt renovat, perquè ja no som la mateixa persona que el va començar. Aquest viatge comporta la vivència de tot un seguit d'experiències que, donada la complexitat de la ciència, en molts casos són decepcions, però que fa que els èxits aconseguits siguin molt més gratificants i que el conjunt valgui la pena. No obstant, el viatge no és en solitari, durant aquesta etapa es comparteix camí amb moltes persones i és a totes elles a qui van dedicades quatre línies.

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors de tesi, Ramon Barnadas i Joan Suades, que m'han guiat durant tot el viatge, agrair-vos especialment l'ajuda, la disponibilitat, els ànims, els consells, la confiança dipositada i sobretot el vostre optimisme que il·luminava el meu camí quan jo ja ho veia tot negre. Treballar amb vosaltres ha estat un plaer, no només per la gran quantitat de coses que he après, sinó també simplement perquè sou genials.

També voldria agrair a la Mercè Capdevila –que em va donar l'oportunitat fa cinc anys, d'entrar al seu grup de recerca–, i a l'Òscar Palacios –sempre al seu costat–, el fet de que gràcies a vosaltres em decidís a endinsar-me en aquest món.

Institucionalment, s'agraeix al MINECO-FEDER (Projecte BIO2012-39682-C02-02 a M.C.) el finançament rebut i al Departament de Bioquímica y Biología Molecular de la UAB la beca predoctoral (PIF) atorgada per realitzar aquest treball.

He d'agrair les aportacions i els suggeriments d'aquelles persones que van participar a la recerca per tota la col·laboració i facilitats que em van oferir: Mercedes Camacho, Núria Benseny, Ramon Pons, Mercedes Cócera, Pep Cladera i tots aquells professors de Química o Biofísica que en un moment donat em van fer un cop de mà. Gràcies a Elodia i a David per la vostra ajuda i disponibilitat.

No poden faltar els companys de travessa, alguns amb qui he coincidit molt i altres no tant com m'hagués agradat. Així doncs, a la Katia, Jordi, Quim, Selene, Àlex, Tzevatana, Aida, Josu, Albert, Neus, Bea, Guillem, Elena, Alberto, i tots aquells que han passat pel laboratori i han deixat un petit bon record, moltes gràcies per ser com

sou, no canvieu! En especial a Katia, per ajudar-me tant quan vaig començar i per ser tant *guay* sobretot sortint de festa; al trio Aida, Josu i Albert, per fer-me sentir deu anys més jove, fer-me gaudir de moments molt divertits, per les preguntes esbojarrades que ens feien voltar el cap a tots, i per un milió de coses més; a la Neus, companya de cafès, per ser sempre tant agradable i dolça amb mi; a la Bea, sempre tant atenta preocupant-se per mi i els meus peques, i al Jordi, a qui agraeixo l'ajuda al *lab* malgrat no ens posàvem d'acord per coincidir a un lloc o a l'altre, però sobretot gràcies per deixar que et donés la xapa entre pitis i cafès i en alguna que altra borratxera. Et considero un bon amic i t'aprecio moltíssim.

I would like to thank Dr Yvonne Perrie to allow me to work in her research group. I well-spent there a wonderful period of my thesis. And to all the members of the group: thank you Carla, Swapnil, Neil and Maryam because from the first day you made me feel part of a family. Especialmente Carla, porque me llevo una amiga y mil anécdotas recogidas en tan solo tres meses.

A la família i els amics, que sempre m'han fet costat. D'ells era el temps robat per fer aquest treball. En especial a la meva mare i la meva germana per fer-me suport; i a Jaume per escoltar-me, ajudar-me, per ser la millor persona que he conegut mai i per estimar-me tant.

No puc deixar d'estar agraïda al meu germà, perquè el seu record m'impulsa a llevar-me cada dia i viure com si fos l'últim.

Gràcies també a aquells que em van robar "5 minuts" fent aquest últim trajecte molt més planer i agradable.

I finalment, els més importants, als meus "monstruitos", Biel i Oriol, que heu fet aquest viatge lleugerament més complicat però que amb el vostre somriure en arribar a casa fèieu esvaïr totes les preocupacions i mals de cap. No oblideu mai que us estimo "fins al cel del sol.

# Index

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. TENSIOACTIUS	1
1.2. LIPOSOMES	2
1.2.1. Introducció als liposomes	2
1.2.2. Els fosfolípids, la unitat estructural dels liposomes	3
1.2.3. Classificació dels liposomes	5
1.2.4. Solubilització de liposomes amb tensioactius	6
1.3. METAL·LOTENSIOACTIUS	7
1.3.1. Introducció als metal·lotensioactius	7
1.3.2. Classificació dels MTS en funció del tipus de lligand	7
1.3.3. Classificació dels MTS en funció del tipus d'agregat	10
1.4. MOLÈCULES ALLIBERADORES DE MONÒXID DE CARBONI (CORMS; CARBON MONOXIDE RELEASING MOLECULES)	13
1.4.1. Introducció	13
1.4.2. Activitat biològica del monòxid de carboni	13
1.4.3. Molècules alliberadores de monòxid de carboni (CORMs)	15
1.4.4. PhotoCORMs	18
2. OBJECTIUS	23
3. MATERIALS I MÈTODES	25
3.1. MATERIALS	25
3.2. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPOSTOS	28
3.2.1. Manipulació dels productes	28
3.2.2. Anàlisi elemental	28
3.2.3. Espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)	29
3.2.4. Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	29
3.2.5. Microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier ( $\mu$ -FTIR: Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	30

3.3. MÈTODES DE PREPARACIÓ D'AGREGATS D'SPC, L·LIGANDS I MTS	32
3.3.1. Preparació d'agregats d'SPC, lligands i MTS per hidratació d'un film homogeni	32
3.3.2. Preparació d'agregats d'SPC, lligands i MTS de mida definida per extrusió mecànica	33
3.3.3. Preparació de liposomes o metal·losomes amb piranina encapsulada	33
3.3.4. Preparació de liposomes o metal·losomes mitjançant tècniques de microfluídica	34
3.3.5. Preparació de bicel·les DMPC/DHPC	35
3.4. MÈTODES DE CARACTERITZACIÓ D'AGREGATS	35
3.4.1. Purificació d'agregats per cromatografia d'exclusió molecular (SEC)	35
3.4.2. Quantificació de fosfolípids	36
3.4.3. Quantificació d'HPTS per fluorescència.	37
3.4.4. Determinació de la permeabilitat de vesícules	38
3.4.5. Determinació del volum encapsulat	38
3.4.6. Determinació de la concentració micel·lar crítica (cmc) per fluorescència	39
3.4.7. Espectroscòpia de dispersió dinàmica de la llum (DLS)	40
3.4.8. Determinació del potencial Z	40
3.4.9. Criomicroscòpia electrònica de transmissió (Cryo-TEM)	41
3.4.10. Solubilització de liposomes. Determinació del caràcter tensioactiu de lligands i MTS	43
3.4.11. Dispersió de raig X a angles petis (SAXS: Small angle X-ray scattering)	43
3.5. MÈTODES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ALLIBERAMENT DE CO	45
3.5.1. Determinació de l'alliberament de monòxid de carboni mitjançant l'assaig amb mioglobina	45
3.5.2. Determinació de l'alliberament de CO mitjançant FTIR	48
3.6. CULTIUS CEL·LULARS	50
3.6.1. Preparació dels cultius cel·lulars	50

3.6.2. Determinació de la toxicitat dels sistemes SPC/MTS en cultius cel·lulars (assaig amb XTT)	51
3.6.3. Preparació de cultius cel·lulars fixats per a estudis de microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier ( $\mu$ -FTIR)	52
4. RESULTATS	53
4.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPOSTOS	53
4.1.1. Lligands fosfina	54
4.1.1.1. Ruta sintètica per a la preparació de lligands	54
4.1.1.2. Precursors halosulfonats	56
4.1.1.2.1. Síntesi i caracterització del precursor halosulfonat L6	56
4.1.1.2.2. Síntesi i caracterització del precursor halosulfonat L10	58
4.1.1.3. Síntesi i caracterització dels lligands fosfina Ln	60
4.1.2. Complexos TLn (cis-[Mo(CO) <sub>4</sub> (Ln) <sub>2</sub> ], n= 2, 6 i 10)	66
4.1.2.1. Síntesi i caracterització de complexos TLn.	66
4.1.2. Complexos PLn ([Mo(CO) <sub>5</sub> Ln], n= 2, 6 i 10)	70
4.1.2.1. Síntesi i caracterització de complexos PLn.	70
4.2. CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA D'AGREGATS	77
4.2.1. Compostos de la família L2 (FL2)	77
4.2.1.1. Determinació de la cmc	77
4.2.1.2. Propietats tensioactives. Solubilització de liposomes	79
4.2.1.3. Determinació de la mida d'agregats mitjançant espectroscòpia de DLS	80
4.2.1.4. Visualització d'agregats mitjançant criomicroscòpia electrònica de transmissió (cryo-TEM)	84
4.2.1.5. Permeabilitat dels agregats mixtes SPC/MTS	89
4.2.1.6. Volum encapsulat dels agregats mixtes SPC/MTS	91
4.2.1.7. Potencial Z	92
4.2.1.8. SAXS	93
4.2.1.9. Alliberament de CO	95
4.2.1.10. Toxicitat	103
4.2.1.11. Microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier ( $\mu$ -FTIR: Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	104

4.2.2. Compostos de la família L6 (FL6)	111
4.2.2.1. Determinació de la cmc	111
4.2.2.2. Propietats tensioactives. Solubilització de liposomes	112
4.2.2.3. Determinació de la mida d'agregats mitjançant espectroscòpia de DLS	113
4.2.2.4. Visualització d'agregats mitjançant criomicroscòpia electrònica de transmissió (cryo-TEM)	116
4.2.2.5. Permeabilitat dels agregats mixtes SPC/MTS	119
4.2.2.6. Volum encapsulat dels agregats mixtes SPC/MTS	121
4.2.2.7. Potencial Z	122
4.2.2.8. Alliberament de CO	123
4.2.2.9. Toxicitat	128
4.2.2.10. Preparació de sistemes mixtes SPC/MTS mitjançant tècniques de microfluídica	128
4.2.3. Compostos de la família L10 (FL10)	137
4.2.3.1. Determinació de la cmc	137
4.2.3.2. Propietats tensioactives. Solubilització de liposomes	139
4.2.3.3. Determinació de la mida d'agregats mitjançant espectroscòpia de DLS	140
4.2.3.4. Alliberament de CO	142
5. DISCUSSIÓ	145
5.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DELS TENSIOACTIUS	145
5.2. PROPIETATS DELS AGREGATS MIXTES D'SPC, L·LIGANDS I MTS	151
5.3. ALLIBERAMENT DE CO	159
5.4. TOXICITAT	161
5.5. $\mu$ -FTIR EN CULTIUS CEL·LULARS	162
5.6. PREPARACIÓ DE SISTEMES MIXTES SPC/MTS MITJANÇANT TÈCNiques DE MICROFLUÍDICA	163
6. CONCLUSIONS	165
6. CONCLUSSIONS	169
ANNEX . Experimental. Síntesi de compostos	173
A.1. Precursors halosulfonats	173

A.1.1. Síntesi del precursor L6 (Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> SO <sub>3</sub> Na).	173
A.1.2. Síntesi del precursor L10 (Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> SO <sub>3</sub> Na).	173
A.2. Lligands fosfina	174
A.2.1. Síntesi dels lligands Ph <sub>2</sub> P(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> Na (n = 2, 6 i 10)	174
A.3. Complexos de molibdè	177
A.3.1. Precursor metàl·lic cis-[Mo(CO) <sub>4</sub> (pip) <sub>2</sub> ].	177
A.3.1.1 Síntesi del precursor metàl·lic cis-[Mo(CO) <sub>4</sub> (pip) <sub>2</sub> ].	177
A.3.2. Complexos TLn (cis-[Mo(CO) <sub>4</sub> (Ln) <sub>2</sub> ]) (n = 2, 6 i 10).	177
A.3.2.1. Síntesi de complexos TLn (cis-[Mo(CO) <sub>4</sub> (Ln) <sub>2</sub> ]) (n = 2, 6 i 10).	177
A.3.3. Complexos PLn ([Mo(CO) <sub>5</sub> Ln]) (n = 2, 6 i 10).	179
A.3.3.1. Síntesi de complexos PLn ([Mo(CO) <sub>5</sub> Ln]) (n = 2, 6 i 10).	179
BIBLIOGRAFIA	181

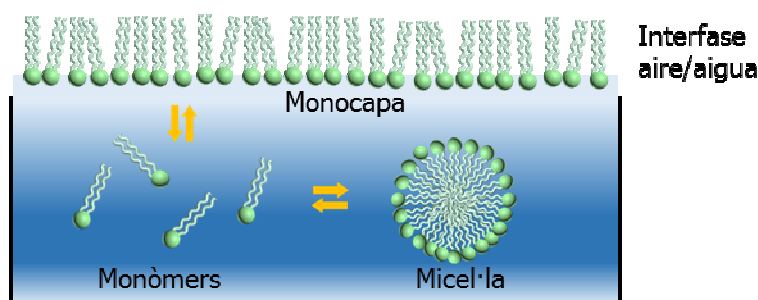




# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. TENSIOACTIUS

Els tensioactius són molècules amfifíliques amb una estructura molecular característica que consisteix en una part hidrofòbica (generalment una o dues cadenes hidrocarbonades de longitud variable) i en una part hidrofílica (grups iònics o no iònics fortament polars). En solució, degut al fet d'estar formats per dues parts amb afinitats oposades per un solvent determinat, aquests compostos presenten dues propietats importants. Per una banda, s'adsorbeixen a les interfases polar-apolar, disminuint la tensió superficial. Per exemple, quan es dispersen en medi aquós tenen tendència a distribuir-se de manera que la seva concentració a la interfície aigua/aire sigui més gran que al si de la solució, orientant els caps polars cap a la fase aquosa i allunyant-ne els grups hidrofòbics. Per altra banda, per tal de minimitzar el contacte no favorable de les cadenes hidrofòbiques amb l'entorn aquós, a partir d'un valor definit de concentració les molècules s'agreguen espontàniament formant agregats supramoleculars que poden presentar forma i mida diverses, la més simple de les quals és la micel·la (Figura 1), estructura on les cadenes hidrofòbiques es disposen cap a l'interior de l'agregat quedant els caps polars en contacte amb l'entorn aquós. La micel·la així formada pot presentar una gran diversitat morfològica: esferes, el·lipsoides o cilindres, entre d'altres.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Representació esquemàtica del comportament d'un tensioactiu convencional en solució. Distribució de les molècules a la interfase aire/aigua i formació d'agregats.

La concentració a partir de la qual comencen a aparèixer els fenòmens d'agregació rep el nom de concentració micel·lar crítica (cmc), i és a partir d'aquest valor que algunes propietats tals com la tensió superficial, conductivitat elèctrica, i la dispersió, absorció o emissió de la llum experimenten un canvi bruscat de tendència.

# Introducció

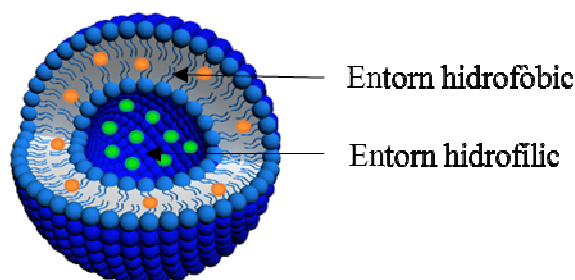
A la natura podem trobar diversos tensioactius que tenen funcions rellevants, com ara les sals biliars, implicades en processos d'absorció dels aliments durant la digestió intestinal, o els fosfolípids, que a més de tenir un paper fonamental a les membranes biològiques des del punt de vista estructural, també intervenen modificant la tensió superficial en altres sistemes, com ara les lipoproteïnes.

## 1.2. LIPOSOMES

### 1.2.1. Introducció als liposomes

Els liposomes són vesícules lipídiques que han despertat un gran interès d'ençà que van ser descoberts a principis dels anys 1960, per Alec D. Bangham,<sup>2, 3</sup> pel que han estat estudiats extensament i continuen constituint un ampli camp de recerca. Degut a la naturalesa amfifílica dels seus constituents, lípids naturals o sintètics, els liposomes estan formats per una o varies bicapes lipídiques concèntriques que envolten una cavitat hidrofílica o compartiment aquós. Aquesta organització particular, que ofereix entorns hidrofílic i hidrofòbic, juntament amb la seva naturalesa biocompatible, biodegradable i no-immunogènica, els fa molt interessants al món de la nanobiotecnologia.

El potencial dels liposomes com a sistemes transportadors va ser reconegut durant els anys 1970<sup>4, 5</sup> tant pel que fa a la capacitat d'encapsular substàncies hidrofíliques a l'interior del compartiment aquós, com lipofíliques, atrapades entre les bicapes lipídiques (Figura 2).<sup>6</sup>



**Figura 2.** Il·lustració esquemàtica d'un liposoma que encapsula tant molècules hidrofíliques (verd) com molècules hidrofòbiques (taronja).

Actualment, els liposomes clínicament més utilitzats encapsulen un agent terapèutic hidrofílic al compartiment aquós, envoltat de la bicapa lipídica que pot contenir a la

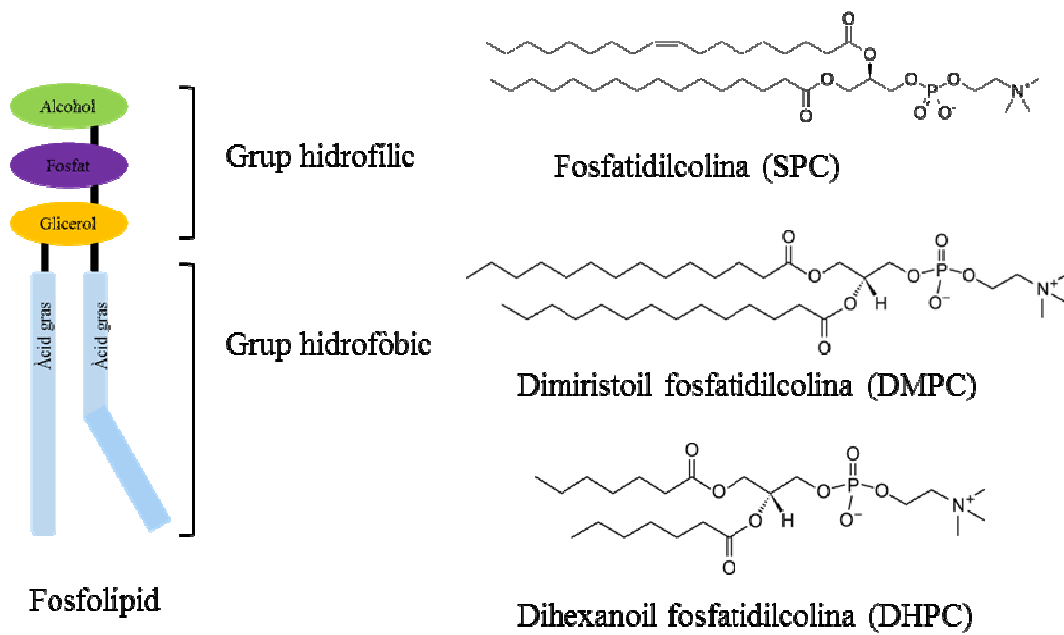
seva superfície polímers o lligands específics per a ser reconeguts (com per exemple, anticossos).<sup>7</sup> També s'han descrit altres sistemes més sofisticats, com ara liposomes que responen a estímuls externs, com el pH<sup>8</sup> o liposomes multicompartimentals de mida nanomètrica per alliberament combinatori de fàrmacs.<sup>9</sup>

### 1.2.2. Els fosfolípids, la unitat estructural dels liposomes

La unitat estructural dels liposomes són els lípid amfifílics, molècules que es caracteritzen bàsicament per la seva baixa solubilitat en aigua degut, principalment, a l'esquelet hidrocarbonat que presenten a la seva estructura. En la preparació de vesícules lipídiques, els fosfolípids són els més àmpliament utilitzats degut al seu baix cost, la facilitat per obtenir-los comercialment en grans quantitats, i el fet que les tècniques de preparació estiguin ben establertes i caracteritzades.

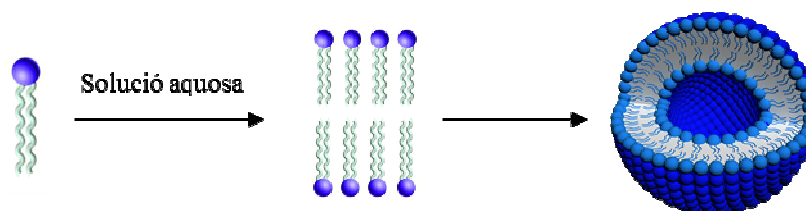
Els fosfolípids són molècules amfifíliques, és a dir, contenen una part hidrofòbica i una part hidrofílica. En general, estan constituïts per quatre components: àcids grassos, un esquelet de glicerol, un grup fosfat i un alcohol (colina, etanolamina, glicerol, inositol, serina, etc). A la Figura 3 es mostra una representació esquemàtica d'un fosfolípid i l'estructura dels que s'han utilitzat en aquesta tesi: fosfatidilcolina de soja (SPC), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) i dihexanoil fosfatidilcolina (DHPC). L'SPC conté majoritàriament àcid palmític o àcid esteàric a la posició C-1 del glicerol i principalment els àcids grassos insaturats de 18 carbonis (oleic, linoleic o linolènic) en la posició C-2.

## Introducció



**Figura 3.** Representació esquemàtica d'un fosfolípid i estructura de la fosfatidilcolina (SPC), en aquest cas amb els àcids grassos palmític i oleic; dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) i dihexanoil fosfatidilcolina (DHPC).

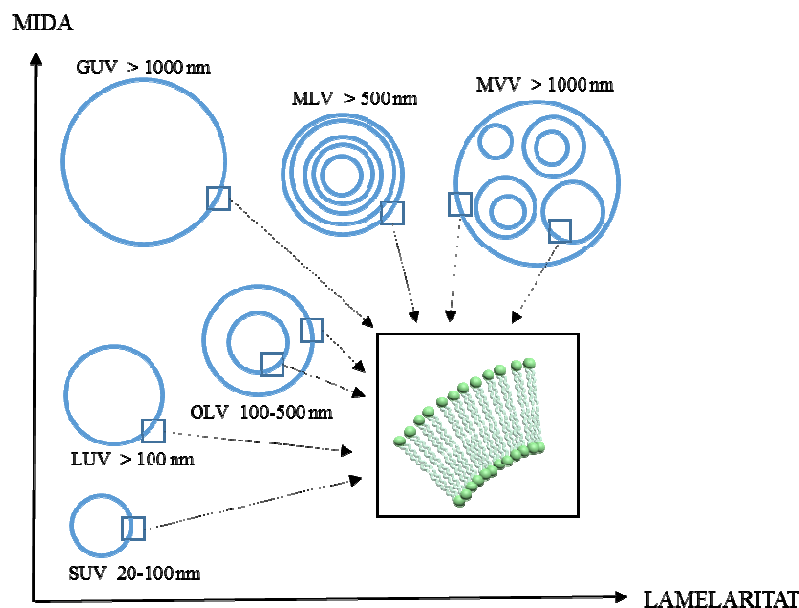
Quan els fosfolípids es troben dispersos en solució aquosa, degut a la seva naturalesa amfifílica, tenen una gran tendència a formar membranes<sup>10</sup> i s'organitzen minimitzant el contacte de les cues hidrofòbiques amb el medi aquós, disposant els caps polars en aquest entorn. D'altra banda, s'estableixen interaccions entre les cues hidrofòbiques de molècules veïnes. Aquest efecte dual afavoreix la formació de bicapes lipídiques, on les cues hidrofòbiques s'ordenen constituint una barrera impermeable a determinades substàncies. Aquestes interaccions hidrofòbiques, a més, promouen l'aparició de forces de van der Waals entre les cues apolars. Finalment, també s'estableixen ponts d'hidrogen i interaccions polars entre les molècules d'aigua de l'entorn i els caps polars que estableixen aquesta organització (Figura 4).



**Figura 4.** Organització de fosfolípids que dona lloc a un liposoma.

## 1.2.3. Classificació dels liposomes

Tenint en compte els paràmetres estructurals, generalment els liposomes es classifiquen en funció de la seva mida i la seva lamel·laritat, és a dir, el nombre de bicapes lipídiques (Figura 5).<sup>11</sup> Els unilamel·lars, amb una única bicapa lipídica, són dels més emprats al món de la recerca degut a les seves propietats. Es classifiquen en tres tipus en funció de la seva mida: vesícules de mida inferior als 100 nm (SUV, *small unilamellar vesicles*); vesícules unilamel·lars grans (LUV, *large unilamellar vesicles*), entre 100 nm i 1 µm; o vesícules unilamel·lars gegants (GUV, *giant unilamellar vesicles*), de mida superior a 1 µm. Les LUVs de mida inferior a 200 nm són les més interessants en el món farmacèutic, mentre que les GUVs són més emprades com a models de bicapa per tal d'estudiar propietats de les membranes cel·lulars. Quan hi ha més d'una bicapa lipídica podem distingir entre vesícules oligolamel·lars (OLV, *oligolamellar vesicles*); vesícules multilamel·lars (MLV, *multilamellar vesicles*) i vesícules multivesiculars (MVV, *multivesicular vesicles*).<sup>12</sup> Aquest grup presenta propietats diferents al de les vesícules unilamel·lars.

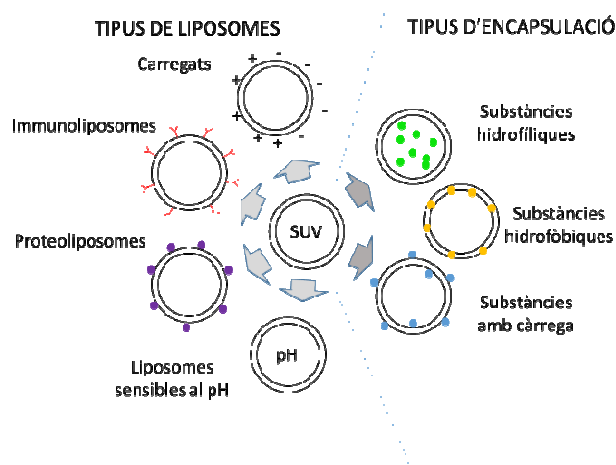


**Figura 5.** Classificació dels liposomes en funció de la mida i la lamel·laritat.

L'ús de liposomes com a transportadors presenta certs avantatges, com ara la millora en la biodistribució, reducció de la toxicitat, més selectivitat o la possibilitat d'un alliberament lent i sostingut del fàrmac durant la seva circulació al cos.

## Introducció

Finalment, les propietats fisicoquímiques dels liposomes poden ser modificades canviant determinats paràmetres. Alguns d'ells són: el tipus de lípids; la proporció i composició de lípids en la formulació; la mida del liposoma; la càrrega de la superfície de la vesícula (positiva, negativa o neutra); la funcionalització de la membrana; la sensibilitat a canvis de pH o temperatura; o la fluïdesa de la membrana lipídica (bicapes rígides o fluïdes) (Figura 6).



**Figura 6.** Tipus de liposomes i vies d'encapsulació que ofereixen.

### 1.2.4. Solubilització de liposomes amb tensioactius

Els liposomes poden ser solubilitzats (destruïts) mitjançant l'addició de tensioactius. La hipòtesi fins ara acceptada que descriu el procés comprèn tres etapes per a l'estat d'equilibri d'aquest fenomen, que depenen de la concentració de tensioactiu.<sup>13, 14</sup> A baixes concentracions, s'estableix un equilibri entre les molècules de tensioactiu que estan com a monòmers en el medi aquós i les que interaccionen, sense trencar-les, amb les membranes lipídiques. A mesura que la concentració total de tensioactiu s'incrementa també ho fa la quantitat del que interacciona amb la membrana, fins arribar a la seva saturació. A partir d'aquesta concentració crítica es formen les primeres micel·les mixtes al mateix temps que la membrana dels liposomes comença a solubilitzar-se. Posteriorment, un augment progressiu de tensioactiu condueix a la desaparició total dels liposomes havent-hi només micel·les mixtes en solució. Aquest procés es pot estudiar mitjançant diverses tècniques essent la turbidimetria la més

emprada, tècnica que consisteix en enregistrar l'absorbància de la mostra a mesura que augmenta la concentració de tensioactiu. Com que la dispersió de la llum causada per les vesícules és molt més gran que la de les micel·les, la solubilització es pot enregistrar de manera eficient mitjançant aquesta metodologia. Una altra tècnica de gran utilitat és la determinació de la distribució de diàmetres mitjançant *Dynamic Light Scattering* (DLS).

### 1.3. METAL·LOTENSIOACTIUS

#### 1.3.1. Introducció als metal·lotensioactius

Els metal·lotensioactius (MTS, de l'anglès *metallo surfactants*) són molècules tensioactives que contenen un àtom metàl·lic enllaçat a la seva estructura. El complex resultant posseeix tant les propietats del metall com el comportament amfifílic del tensioactiu, permetent unificar la química organometàl·lica amb les propietats típiques d'agregats supramoleculars. Aquest tipus de compostos, inicialment preparats amb la idea de concentrar metalls a les interfases per millorar processos catalítics,<sup>15, 16</sup> han estat el focus d'interès als últims anys en àmbits molt diversos de recerca, amb aplicacions en la ressonància magnètica d'imatge (MRI),<sup>17, 18</sup> medicacions antiparasitàries,<sup>19</sup> materials mesoporosos,<sup>20</sup> metal·lomesògens,<sup>21, 22</sup> components optoelectrònics,<sup>23, 24, 25</sup> agents solvatocròmics,<sup>26, 27</sup> catàlisi homogènia,<sup>28, 29, 30, 31</sup> materials tous,<sup>32</sup> nanopartícules,<sup>33</sup> agents antimicrobians<sup>34</sup> i la medicina.<sup>35, 36</sup>

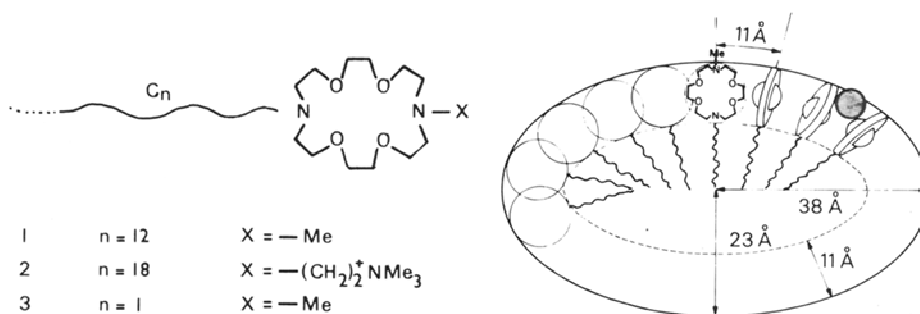
#### 1.3.2. Classificació dels MTS en funció del tipus de lligand

Gran part de la bibliografia sobre els metal·lotensioactius inclou MTS constituïts per lligands no tensioactius on el cap polar inclou el centre metàl·lic, és a dir, el lligand per si sol no és tensioactiu però adquireix aquesta propietat en complexar-se al metall.<sup>37, 38</sup> En alguna publicació, fins i tot, el terme MTS és relacionat amb un tensioactiu on l'àtom metàl·lic forma part del cap polar.<sup>38, 39</sup>

Entre els MTS constituïts per lligands no tensioactius trobem complexos formats a partir de lligands amina, diamina, tetraamina i èters corona que provenen de lligands tipus "annelides",<sup>40</sup> que consisteixen en un cap polar macrocíclic capaç d'incloure cations al seu interior (Figura 7).

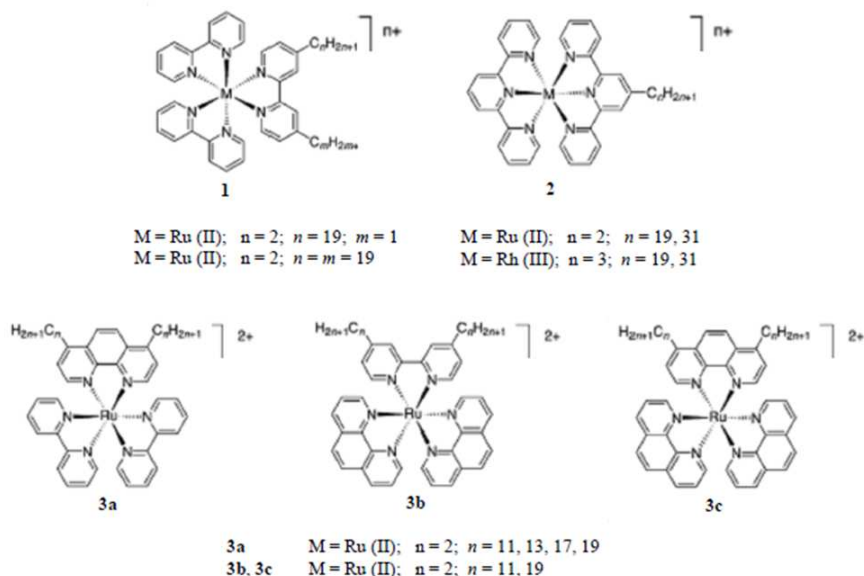


## Introducció



**Figura 7.** Estructura dels lligands tipus annelida sintetitzats per Le Moigne i Simon<sup>40</sup> i representació esquemàtica d'una micel·la formada a partir del lligand annelida 1.

Altres MTS dins aquest grup són els formats per lligands biperidina,<sup>41, 42</sup> fenantrolina<sup>20</sup> i terpiridina,<sup>43</sup> àmpliament utilitzats com a metal·lomesògens en la formació de cristalls líquids (Figura 8).

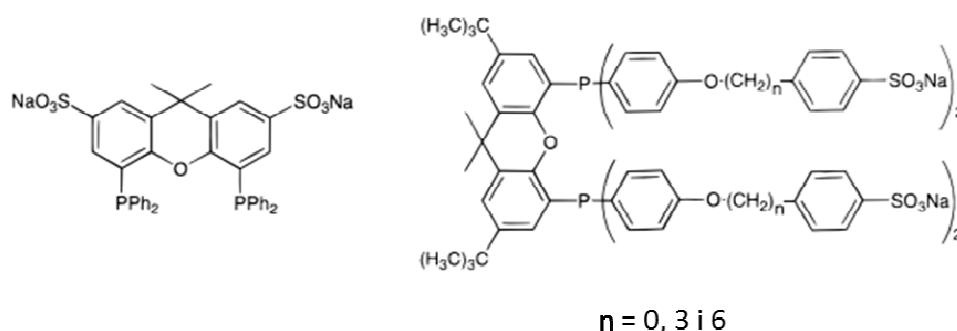


**Figura 8.** Estructura de metal·lotensioactius constituïts per lligands no tensioactius com ara biperidines, terpiridines i fenantrolines inclosos als treballs de (1) Bowers, *et al.*,<sup>41</sup> (2) Holbrey, *et al.*,<sup>43</sup> i (3) Yam, *et al.*<sup>20</sup>

D'altra banda, trobem MTS constituïts per lligands tensioactius on el metall no és qui aporta la part polar al complex sinó un lligand amfifílic unit a ell i que proporciona les propietats al conjunt.<sup>15</sup> Aquest tipus de lligands són molècules tensioactives, amb cap polar i zona hidrofòbica, que posseeixen com a mínim un àtom donador capaç de formar enllaços amb el centre metàl·lic.

Les fosfines tensioactives constitueixen un important bloc dins aquest tipus de MTS donada la seva capacitat per formar enllaços molt estables amb els metalls. Alguns

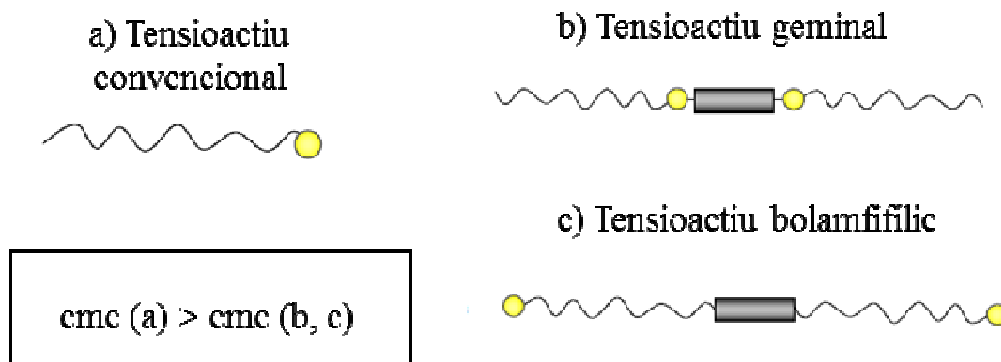
agregats formats per fosfines sulfonades tensioactives, per exemple, han demostrat augmentar la velocitat en processos d'hydroformilació bifàsica catalitzada per rodi de substrats poc solubles amb aigua, ja que aquests agregats ajuden a solubilitzar els substrats i apropar-los als centres catalítics (Figura 9).<sup>44, 45</sup> De fet, els MTS objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral són complexos organometàl·lics carbonílics on el metall, coordinat a fosfines tensioactives, queda localitzat en un entorn hidrofòbic.<sup>46</sup>



**Figura 9.** Fosfines sulfonades tensioactives estudiades al treball de Schreuder Goedheijt *et al.*<sup>45</sup>

Un aspecte interessant dels MTS formats per lligands tensioactius és que ofereixen la possibilitat de comparar les seves propietats d'agregació amb les dels seus lligands precursors. Amb aquesta finalitat, el nostre grup de recerca va publicar un treball l'any 2002 on es comparen els fenòmens d'agregació d'una sèrie de fosfines sulfonades i dels MTS obtinguts per la seva coordinació a Pd (II).<sup>47</sup> Les cmc corresponents a lligands i complexos es van determinar mitjançant tensiometria, posant de manifest que els complexos organometàl·lics tensioactius mostren un valor de cmc significativament inferior a la dels lligands que els componen. Aquest comportament és típic de tensioactius geminals i bolamfíflics (Figura 10),<sup>48, 49</sup> que són agrupacions de dos tensioactius convencionals units per un grup rígid a través dels seus caps polars i que presenten un valor de cmc inferior al del tensioactiu convencional lliure. Els lligands fosfina anteriors van ser el punt de partida per a la síntesi de MTS de Rh (I) per ser emprats com a catalitzadors en reaccions d'hydroformilació en medis bifàsics.<sup>50</sup>

## Introducció



**Figura 10.** Representació esquemàtica de a) un tensioactiu convencional, b) un tensioactiu geminal i c) un tensioactiu bolamfílic.

L'efecte de la disminució de la cmc per coordinació al centre metàl·lic s'observa també als treballs de Santhakumar *et al.*,<sup>51</sup> on es sintetitzen MTS de cobalt (III) del tipus *cis*-[Co(en)<sub>2</sub>(A)X]<sup>2+</sup> and *cis-α*-[Co(trien)(A)X]<sup>2+</sup> (A: dodecil o cetilamina, X = Cl, Br, NO<sub>2</sub>) i es determina la cmc mitjançant mesures de conductància. Els resultats mostren valors de cmc per als MTS significativament inferiors que les dels corresponents lligands, de manera que els complexos tenen més tendència a formar agregats supramoleculars, indicant que la coordinació del metall millora les propietats tensioactives. A mode d'exemple el complex *cis*-[Co(en)<sub>2</sub>(C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NH<sub>2</sub>)Cl](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> presenta un valor de cmc de 4,6 mM, molt inferior al del tensioactiu lliure, clorur de dodecilamoni (C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>ClN) on la seva cmc és 15 mM.

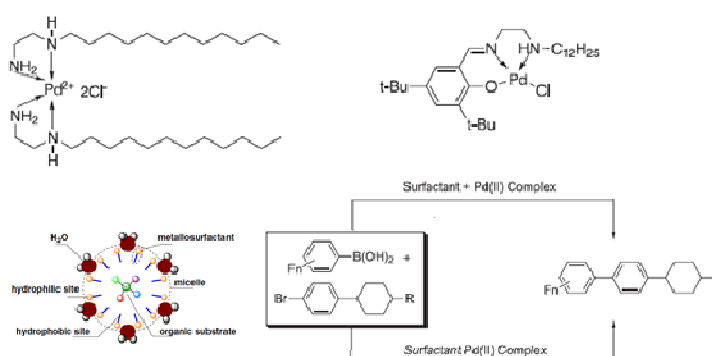
### 1.3.3. Classificació dels MTS en funció del tipus d'agregat

L'estructura molecular d'un MTS determina moltes de les propietats de les dispersions aquoses i el tipus d'agregats que forma. Com passa amb els tensioactius convencionals, en solució aquosa els tensioactius metàl·lics s'orienten i agreguen minimitzant l'exposició de la part hidrofòbica amb l'aigua. A baixes concentracions els compostos formen dissolucions homogènies de molècules individuals mentre que a concentracions per sobre de la cmc les molècules s'ordenen espontàniament donant lloc a agregats supramoleculars, de manera que la part hidrofòbica queda protegida de la part aquosa mentre que la part hidrofílica està en contacte amb ella.

Així doncs, l'agregació de MTS en solució aquosa pot portar a la formació d'estructures simples com ara nanoagregats de tipus micel·lar, definits a la bibliografia com a

metal·lomichel·les,<sup>51</sup> o estructures lleugerament més complexes, tipus vesiculars, que reben el nom de metal·losomes.<sup>52</sup>

Les metal·lomichel·les presenten un especial interès com a sistemes catalítics,<sup>53, 54</sup> moltes de les quals contenen lligands imidazol, piridina o 1,10-fenantrolina.<sup>55</sup> En el camp de catàlisi s'inclouen els treballs de Liu *et al.*,<sup>56</sup> on proposen l'ús de metal·lomichel·les formades a partir de complexos de Pd (II) com a catalitzadors de reaccions de Suzuki–Miyaura en la formació d'enllaços C<sub>Aryl</sub>-C<sub>Aryl</sub> en reaccions orgàniques (Figura 11). Els seus resultats mostren que el sistema metal·lomichel·lar amb el complex de Pd (II) resulta més eficient que emprar el metall i el tensioactiu per separat.



**Figura 11.** Metal·lotensioactius de Pd (II), representació d'una metal·lomichel·la amb aquests complexos i esquema de la reacció de Suzuki–Miyaura, per als treballs de Liu, *et al.*<sup>56</sup>

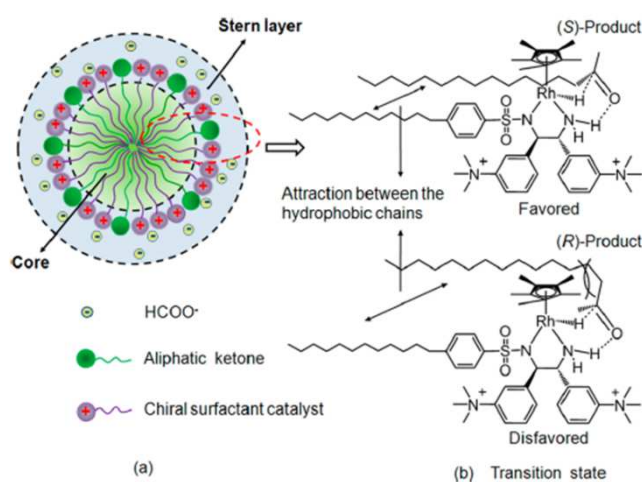
En aquest mateix sentit, Li *et al.* proposa l'ús de metal·lomichel·les mixtes de cetones alifàtiques i complexos de Rh com a sistemes catalitzadors per a la reducció asimètrica de les cetones en aigua (Figura 12).<sup>57</sup>

A banda d'aquest àmbit de recerca, es troben treballs on s'utilitzen metal·lomichel·les amb altres finalitats, com ara els estudis realitzats per Morsy *et al.*,<sup>58, 59</sup> on es preparen metal·lomichel·les amb activitats biològiques. En aquests treballs s'estudien, per exemple, metal·lotensioactius de germani i titani, alguns dels quals presenten elevada citotoxicitat en cèl·lules tumorals i baixa toxicitat en limfòcits normals humans, de manera que podrien ser considerats com a agents anticancerígens.

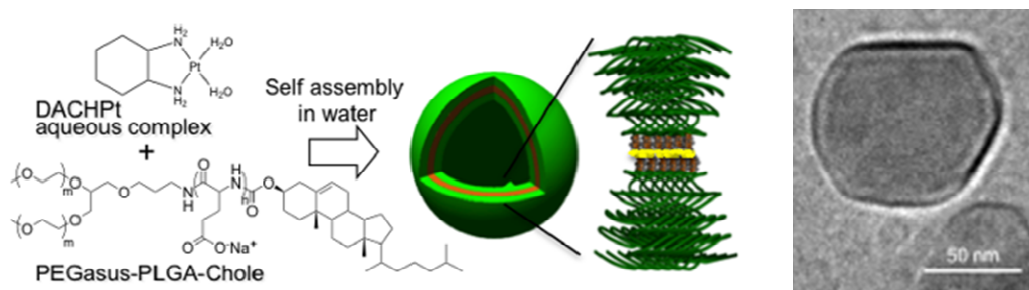
D'altra banda, els metallosomes presenten una avantatge respecte les metal·lomichel·les donat que poden incorporar substàncies hidrofíliques al seu interior. Osada *et al.*<sup>60</sup> proporcionen un bon exemple d'aquest tipus, on es demostra el potencial dels

## Introducció

metallosomes com a sistemes multifuncionals transportadors de fàrmacs. Al seu treball utilitzen metallosomes polimèrics de mida ben definida, al voltant dels 100 nm, constituïts per MTS obtinguts per reacció d'un agent anticancerigen, (1,2-diaminociclohexà)platí (II) (DACHPt) amb un bloc copolimèric format per  $\omega$ -colesterol-poli(L-àcid glutàmic) amb dues cues de poli(etilenglicol) (PEGasus-PLGA-Chole) (Figura 13). Aquests metallosomes encapsulen al seu interior una sonda fluorescent soluble en aigua i l'alliberen selectivament en teixits tumorals de ratolins. Els resultats mostren una apreciable activitat antitumoral deguda al complex de Pt que forma part de la membrana del metal·losoma, alhora que es pot fer un seguiment de la fluorescència al tumor gràcies al fluoròfor encapsulat.



**Figura 12.** Mecanisme proposat per a la reducció asimètrica de cetones alifàtiques en la metal·lomícela formada. (a) Representació esquemàtica de la metal·lomícela i (b) estats de transició probables de la reacció. Estudis presentats als treballs de Li, *et al.*<sup>57</sup>



**Figura 13.** Representació esquemàtica de la formació de metal·losomes per complexació de l'agent anticancerígen DACHPt amb PEGasus-PLGA-Chole i imatge *cryo*-TEM de l'agregat presentat al treball de Osada *et al.*<sup>60</sup>

### **1.4. MOLÈCULES ALLIBERADORES DE MONÒXID DE CARBONI (CORMS; *CARBON MONOXIDE RELEASING MOLECULES*)**

#### **1.4.1. Introducció**

Nombrosos estudis realitzats als últims anys posen de manifest el potencial del monòxid de carboni, CO, com a agent terapèutic.<sup>61, 62, 63</sup> El CO es troba involucrat en la modulació de processos biològics<sup>64</sup> com a regulador de senyalització de diverses vies metabòliques, fonamentals per pràcticament tots els organismes vius.

Entre els aspectes beneficiosos del CO destaca el seu paper en processos antiinflamatoris,<sup>65</sup> com a vasodilatador,<sup>66</sup> en proliferació cel·lular,<sup>67</sup> en la regulació de neurotransmissió,<sup>68</sup> biogènesis mitocondrial,<sup>69</sup> autofàgia,<sup>70</sup> etc., així com en algunes aplicacions terapèutiques, com ara reduint el rebuig en transplantaments d'òrgans.<sup>71, 72</sup>

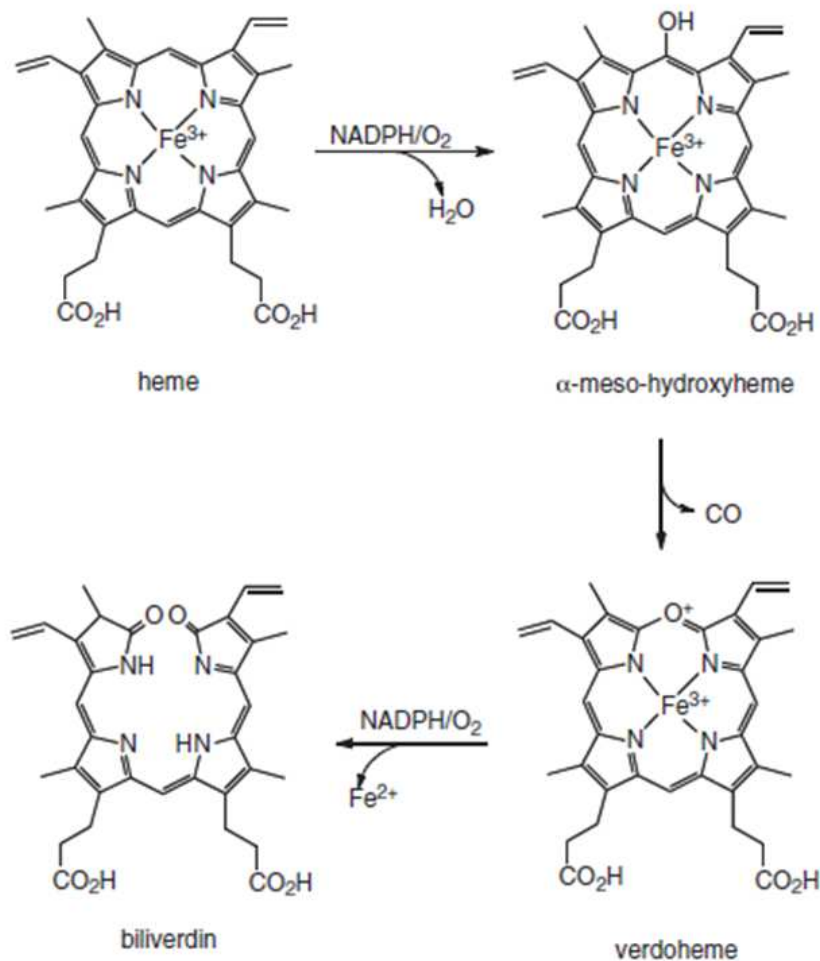
#### **1.4.2. Activitat biològica del monòxid de carboni**

El monòxid de carboni ha estat considerat tradicionalment com un potent tòxic de naturalesa letal. La seva toxicitat s'atribueix bàsicament a la gran afinitat que té amb hemoglobina (Hb), unes 220 vegades major que l'afinitat de l'Hb per l'oxigen, amb la subseqüent formació de carboxihemoglobina (HbCO), que redueix la disponibilitat d'O<sub>2</sub> als teixits.<sup>73</sup> Amb la meitat del llocs d'unió del tetràmer ocupats per CO, l'Hb encara és capaç de coordinar O<sub>2</sub> raonablement bé, però el seu alliberament als teixits es veu reduït notablement. Petits nivells de CO, inferiors al 10 % de l'Hb coordinada a CO, no presenten una toxicitat aguda en humans. En sobrepassar aquests nivells es comença a experimentar mal de cap, marejos, nàusees i nivells iguals o superiors al 50 % de l'Hb coordinada a CO acostumen a ser letals.<sup>74</sup>

No obstant, malgrat la merescuda reputació, petites quantitats de CO són produïdes contínuament de forma endògena en mamífers, amb una velocitat de producció de 20 µmol/h al cos humà.<sup>75</sup> La seva principal font biològica (>86%) és deguda al catabolisme del grup hemo per l'hemo oxigenasa (HO), tot i que també és produït en menor quantitat en processos de fotooxidació, peroxidació lipídica i metabolisme de xenobiòtics.<sup>76</sup>

## Introducció

En el procés de degradació del grup hemo per part de l'HO, aquest és convertit a biliverdina, CO i  $\text{Fe}^{2+}$ , alhora que es consumeixen dos equivalents de NADPH i tres equivalents d'oxigen molecular (Figura 14).<sup>77, 78</sup>



**Figura 14.** Catabolisme del grup hemo per part de HO, produint biliverdina, ferro (II) i CO com a productes.<sup>77</sup>

Al cos humà han estat identificades tres isoformes d'hemo oxigenasa: HO-1, un enzim induïble que es genera sota condicions d'estrès; HO-2, enzim constitutiu present en òrgans i teixits com ara el cervell, fetge i endoteli, la funció del qual està associada amb processos de neurotransmissió i to vascular; i HO-3, identificada i trobada en cervell, cor, ronyons, fetge, testicles i melsa de rates, amb funcions encara desconegudes i que no participa en la degradació del grup hemo.<sup>62, 79</sup> Alguns estudis posen de manifest que les deficiències en la producció endògena de CO es troben relacionades amb determinats estats patològics, com ara la septicèmia, diabetis, colitis i inflamació vascular.<sup>63, 80</sup>

Han estat observats *in vivo* un gran nombre de papers biològics beneficiosos pel CO, ja sigui com a forma endògena o administrat farmacològicament.<sup>81, 82</sup> Aquests inclouen efectes antiinflamatoris, vasodilatatoris o antiapoptòtics. No obstant, malgrat els esforços, el mecanisme químic pel qual CO regula tots aquests aspectes encara està lluny de ser perfectament entès.

Amb la finalitat d'entendre les propietats bioquímiques de CO i de cercar nous compostos amb propietats terapèutiques en aquest àmbit, el desenvolupament de molècules capaces d'alliberar monòxid de carboni de forma controlada ha esdevingut un camp molt estudiat.

### 1.4.3. Molècules alliberadores de monòxid de carboni (CORMs)

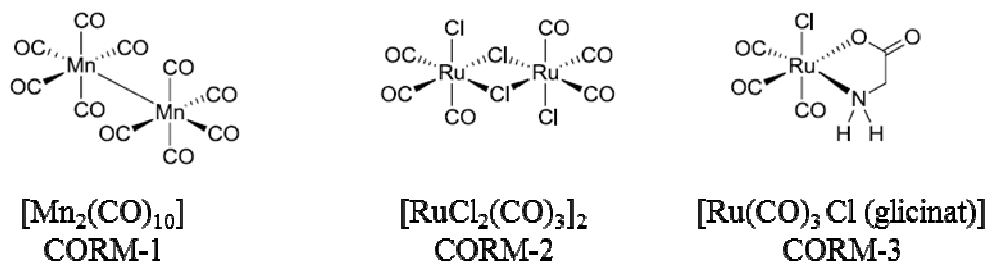
D'ençà el descobriment del CO com a molècula important en processos de senyalització cel·lular, han estat invertits molt esforços en utilitzar les seves propietats amb finalitats terapèutiques. Els primers treballs es van centrar en l'administració directa de CO gas. Avui dia, existeixen instruments comercialment disponibles que proveeixen CO de forma exògena per inhalació per aplicacions clíniques. No obstant, aquesta metodologia presenta certs desavantatges: es requereix un equip especialitzat i molt controlat per a aquest mètode d'administració; el CO<sub>(g)</sub> aplicat no es transporta eficientment als teixits degut a la seva gran afinitat per l'Hb, que l'allibera als pulmons; i finalment, és indispensable un control exhaustiu sobre les dosis d'aplicació per tal d'evitar problemes de toxicitat per sobredosi.<sup>74</sup> Així doncs, per abordar aquest inconvenient, han estat desenvolupats sistemes alternatius per alliberar monòxid de carboni d'una forma més específica.

Inicialment, Motterlini *et al.*<sup>83</sup> proposen el 2002 l'ús de compostos carbonílics metàl·lics com a molècules alliberadores de monòxid de carboni. Es van estudiar els compostos [Fe(CO)<sub>5</sub>] i [Mn<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub>] (anomenat CORM-1), que en ser irradiats alliberen CO amb uns temps de vida mitjana (t<sub>1/2</sub>) molt curts (inferiors a 1 min). No obstant, aquests compostos són poc solubles en aigua i, en general, presenten elevada toxicitat. Altres compostos, com ara el [Ru(Cl)<sub>2</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (CORM-2) o [Ru(Cl)(glicinat)(CO)<sub>3</sub>] (CORM-3) més solubles en aigua i menys tòxics, emergeixen com a substàncies més prometedores.<sup>63, 83</sup> En aquests casos, al igual que en la majoria de complexos metal·locarbonílics inicialment estudiats com a CORMS, l'alliberament és promogut



## Introducció

per intercanvi de lligands, molècules de solvent o presents al medi. El complex CORM-3, per exemple, presenta una gran dependència del medi: mentre que en aigua desionitzada a 37 °C té un temps de vida mitjana de 96 h, en plasma humà aquest temps es redueix a 3,6 min.<sup>84</sup> A la figura 15 es mostra l'estructura d'aquests CORMs i a la Taula 1 les seves característiques principals.



**Figura 15.** Estructura d'alguns dels complexos presentats com a CORMs per Motterlini *et al.*<sup>63, 84</sup>

	Dissolvent	$t_{1/2}$	Any de publicació
<b>CORM-1</b>	DMSO	< 1 min	2002 <sup>(83)</sup>
	EtOH		
<b>CORM-2</b>	DMSO	~ 1 min	2002 <sup>(83)</sup>
	EtOH		
<b>CORM-3</b>	Aigua	~ 96 h	2004 <sup>(85)</sup>
	Plasma humà	~ 4 min	

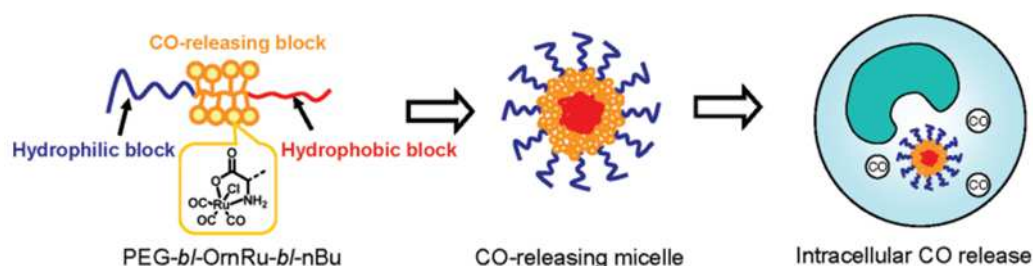
**Taula 1.** Dades de solubilitat,  $t_{1/2}$  i any de publicació d'alguns CORMs presentats als treballs de Motterlini *et al.*<sup>63, 84</sup> Els  $t_{1/2}$  són en PBS, a pH 7,4 i 37 °C.

Gran part de la recerca de CORMs es basa en l'ús de carbonils metàl·lics, no obstant han estat descrits altres tipus de compostos amb la mateixa finalitat. El grup d'R. Alberto presenta als seus treballs una família de boranocarbonats per ser emprats com a CORMs.<sup>82, 86, 87</sup> Addicionalment, s'han presentat recentment dos sistemes orgànics, basats en 1,2-dicetones cícliques insaturades i àcid xantè-9-carboxílic, com els primers CORMs purament orgànics viables.<sup>88, 89</sup> Tot i això, els CORMs basats en complexos amb grups carbonils units a metalls de transició ofereixen molta més flexibilitat en

termes de disseny molecular, fet pel qual són els compostos més àmpliament utilitzats en aquest camp.

Tenint en compte que en processos *in vivo* els CORMs es trobaran amb una elevada concentració de biomacromolècules com a potencials lligands, la capacitat d'alliberament de CO a un centre diana determinat promoguda per l'intercanvi convencional de lligands, dependrà del balanç entre el temps de vida mitjana del CORM al medi i del temps necessari per arribar al lloc específic al cos.

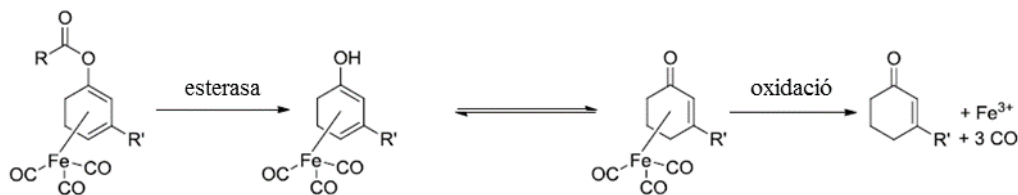
El 2010 Hasegawa *et al.*<sup>90</sup> proposen un mètode per modular la velocitat d'alliberament de CO del complex CORM-3. En aquest treball es coordina el CORM a uns blocs polimèrics posicionant-lo entre una regió hidrofòbica i una regió hidrofílica, de manera que en solució s'obté un sistema micel·lar capaç d'alliberar CO amb una cinètica d'alliberament més lenta que el complex lliure, permetent que el gas arribi a la seva diana (Figura 16).



**Figura 16.** Representació esquemàtica de la formació de micelles alliberadores de CO, i alliberament de CO al lloc d'interès presentat als treballs de Hasegawa *et al.*<sup>90</sup>

Com ja ha estat dit, el mecanisme més comú per l'alliberament de CO en CORMs basats en carbonils metàl·lics és el bescanvi de lligands per interacció amb el solvent o molècules presents al medi. Per tant, en aquest darrer cas, l'alliberament comença en el moment en que el compost és incorporat al medi, de manera que el fet que arribi encara actiu al lloc d'interès dependrà del temps de vida mitjana del compost en el sistema circulatori. Els treballs més recents es basen en la cerca de CORMs que siguin prou estables com per arribar al lloc desitjat al cos, per alliberar posteriorment el CO a partir d'un mecanisme d'iniciació determinat.<sup>91</sup> Un exemple d'aquest tipus de compostos, són els introduïts en l'última dècada pel grup de Schmalz, amb CORMs promoguts per activació enzimàtica (ET-CORMs: *enzyme-triggered CORMs*) (Figura 17).<sup>92, 93, 94</sup>

## Introducció



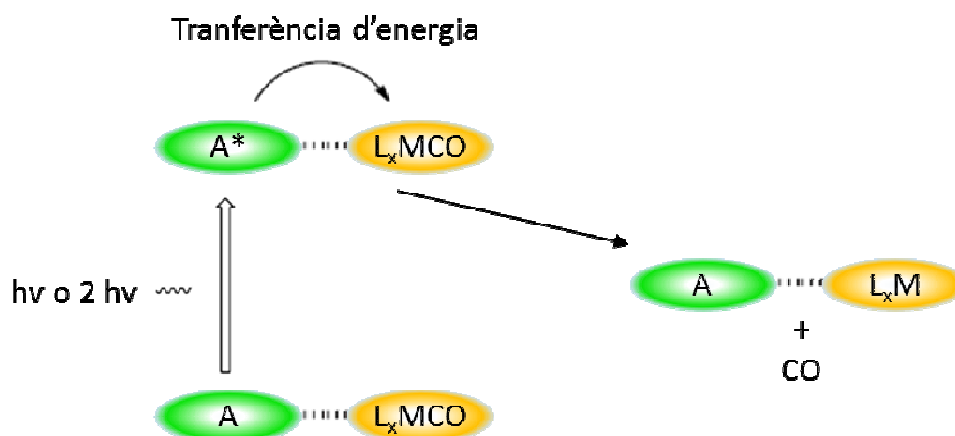
**Figura 17.** Alliberament de CO promogut de forma enzimàtica als treballs del grup de Schmalz.<sup>94</sup>

En relació als estímuls externs, potser el més atractiu de tots és la llum. En cas de ser sensibles a la radiació, una font de llum focalitzada o de llum polsada podria permetre un control molt precís de l'activitat biològica de les molècules alliberadores de monòxid de carboni (PhotoCORMs).

### 1.4.4. PhotoCORMs

Els PhotoCORMs són molècules estables en solució aquosa, en medi biològic i en la foscor, però que en ser irradiades amb una longitud d'ona apropiada alliberen monòxid de carboni.<sup>95, 96</sup> Utilitzant llum com a desencadenant del despreniment de CO no només s'aconsegueix un control local i temporal de l'alliberament del gas, sinó que també és possible controlar la quantitat de CO alliberada, que dependrà de la dosi de llum aplicada.

Aquests compostos, en ser irradiats alliberen un lligand CO de l'esfera de coordinació del complex metàl·lic generant una vacant. El CO alliberat és transferit al medi i, idealment, al lloc desitjat on es vol produir l'efecte farmacològic. D'altra banda, la posició vacant a l'esfera de coordinació del metall generalment és ocupada per una molècula de solvent.<sup>95</sup> El disseny racional d'un PhotoCORM és un procés important per tal d'obtenir un alliberament eficient. Així doncs, idealment el complex hauria de tenir lligands fotoactius. En ser irradiat, hi hauria una transferència d'energia del lligand fotoactiu al metall de transició que debilitaria l'enllaç del metall amb el lligand carbonílic, fet que permetria l'alliberament de CO (Figura 18).<sup>96</sup>



**Figura 18.** Mecanisme d'alliberament de CO promogut fotoquímicament a partir d'un PhotoCORM, on A és un lligand fotoactiu i L<sub>x</sub>MCO correspon a un centre metàl·lic (M) coordinat, com a mínim a un grup carbonil (CO) i L<sub>x</sub> lligands de qualsevol tipus.

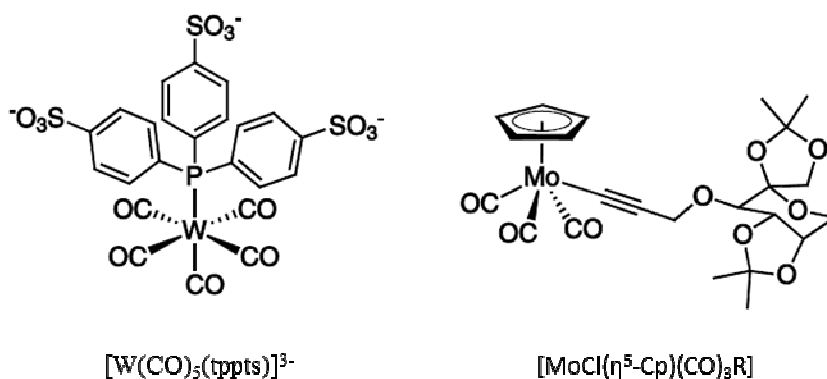
Un PhotoCORM òptim per aplicacions biològiques hauria de ser capaç d'alliberar CO en ser irradiat dins l'anomenada “finestra terapèutica”, entre 620 i 850 nm, rang en el que la penetració de llum als teixits humans és màxima sense causar danys.<sup>97, 98</sup> No obstant, tot i que aquest rang seria l'ideal, també resulta interessant l'ús d'altres longituds d'ona, com ara la llum blava en tractaments més superficials. El desenvolupament de noves fonts de llum més apropiades també és un camp en estudi.<sup>99</sup>

Motterlini va ser el primer en aplicar el concepte de fotoactivació en CORMs, mostrant al seu treball, mitjançant un assaig amb mioglobina (assaig que es descriu més endavant a l'apartat 3.5.1. d'aquesta tesi doctoral), que els compostos [Fe(CO)<sub>5</sub>] i [Mn<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub>] eren capaços d'alliberar CO en ser irradiats. Al mateix temps, també demostrava algunes propietats biològiques de [Mn<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub>], atenuant-se la vasoconstricció coronària en cors de rata aïllats.<sup>83</sup> Ara bé, donada l'elevada toxicitat del [Fe(CO)<sub>5</sub>] i la baixa solubilitat dels dos compostos en solució aquosa, els estudis amb aquests complexos no van anar gaire més lluny.

Al 2010 Ford va introduir per primera vegada el terme PhotoCORM en una publicació.<sup>100</sup> En aquest treball utilitza el compost [W(CO)<sub>5</sub>(tppts)]Na<sub>3</sub>, soluble en aigua i estable en solució aquosa a la foscor (Figura 19 esquerra). En ser irradiat a 313 nm forma [W(CO)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)(tppts)]<sup>3-</sup> amb l'alliberament d'un lligand de CO. A partir d'aquest moment han estat sintetitzats, descrits i estudiats un gran nombre de PhotoCORMs. El

## Introducció

2011, al grup de Lynam es van preparar una sèrie de complexos de molibdè de fórmula  $[\text{MoCl}(\eta^5\text{-Cp})(\text{CO})_3\text{R}]$  amb diferents grups alquínils per R,<sup>101</sup> d'entre els quals va ser investigat el complex alquínil- $\beta$ -D-fructopiranosà (Figura 19 dreta). Sota les condicions de l'assaig amb mioglobina, aquest complex alliberava només 0,04 equivalent de CO en 2 hores, mentre que en ser irradiat a 325 nm s'originava a un alliberament de 2,2 equivalents de CO amb una vida mitjana de 13 min.

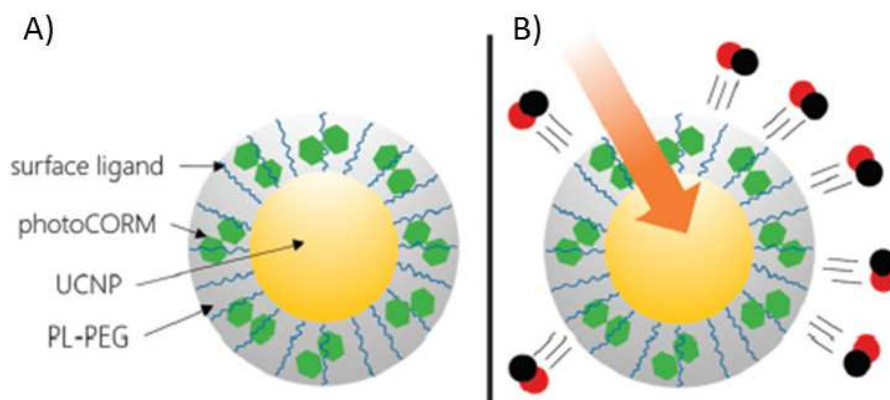


**Figura 19.** PhotoCORMs dels metalls del grup 6 estudiats als treballs de Ford<sup>100</sup> (a l'esquerra) i Lynam<sup>101</sup> (a la dreta).

Els complexos de manganès tricarbonílics també són bons exemples de PhotoCORMs. El complex  $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{tpm})]^+$  (tpm: tris(1-pirazolil)metà),<sup>102</sup> dissolt prèviament en DMSO, és soluble en solució aquosa tamponada (1% DMSO) i és estable en la foscor, mentre que en ser irradiat a 365 nm allibera dos equivalents de CO. A concentracions per sobre de 100  $\mu\text{M}$  de complex i en la foscor, no provocava cap efecte sobre la viabilitat de cèl·lules de càncer de colon HT29. No obstant, la viabilitat es reduïa molt si les cèl·lules s'incubaven amb el complex durant 24 h, s'irradiaven 10 min a 365 nm, i s'incubaven 24 h més.<sup>103</sup> A més, per tal d'augmentar-ne l'especificitat, el complex es va acoblar a pèptids.<sup>104</sup>

L'any 2005 el grup de Ford publica un treball amb una innovadora estratègia que permet l'alliberament de CO del sistema estudiat en ser irradiat amb llum de l'infraroig proper (NIR).<sup>105</sup> El sistema consisteix en un nanotransportador compost per nanopartícules que absorbeixen NIR i posteriorment emeten llum visible (UCNPs: *upconversion nanoparticles*), un PhotoCORM ( $\text{trans-}[\text{Mn}(\text{bpy})(\text{PPh}_3)_2(\text{CO})_2]^+$ ), i un polímer biocompatible que imparteix solubilitat en medi aquós al sistema (Figura 20). El sistema s'irradia a 980 nm, les UCNPs absorbeixen aquesta radiació, i emeten llum

visible que seguidament el PhotoCORM aprofita per alliberar CO. Per tal que això sigui possible les UCNPs han d'estar molt properes al complex PhotoCORM, fet que s'aconsegueix gràcies a l'estat d'agregació que proporciona el polímer biocompatible.



**Figura 20.** A) Representació del nanotransportador PhotoCORM presentat a la publicació del grup de Ford.<sup>105</sup> B) Sota irradiació a 980 nm (fletxa vermella), l'energia és absorbida per les UCNPs. Aquestes emeten en el rang visible, radiació que és re-absorbida pel photoCORM, que allibera CO.

Un altre exemple de PhotoCORM innovador és un compost de reni (I),  $[\text{Re}(\text{bpy})(\text{CO})_3(\text{PR}_3)]$ , on R és  $\text{CH}_2\text{OH}$ , que en ser irradiat a 405 nm allibera un dels tres grups carbonils que conté la molècula, concretament el que es troba en posició trans respecte el grup fosfà.<sup>106</sup> El que fa interessant a aquest compost és el fet que tant el complex de partida com el subproducte després de l'alliberament de CO són luminescents, pel que poden ser detectats a l'interior de les cèl·lules per microscòpia confocal de fluorescència.

Westerhausen i el seu grup de treball presenten al 2011 el primer PhotoCORM activat amb llum visible, el complex dicarbonilbis(cisteamina)ferro(II), conegut com CORM-S1 (Figura 21), que és soluble en medi aquós.<sup>107, 108</sup> Aquest complex, en ser irradiat a 470 nm allibera CO de forma constant durant alguns minuts, mentre que l'exposició a una font d'ampli rang de llum visible porta a un ràpid i complet alliberament de CO en medi fisiològic. Més recentment, el mateix grup publica un treball on el dímer  $[\{(\text{OC})_3\text{Mn}\}_2(\mu\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3)_3]$ , un complex molt soluble en aigua, es capaç d'alliberar CO en ser irradiat a 365 nm i a 470 nm. Malgrat que el procés amb llum ultraviolada és més ràpid, en tots dos casos s'aconsegueix alliberar els 6 CO.<sup>109</sup>

Així doncs, en els últims 10 anys els estudis en la química dels PhotoCORMs han estat perseguint dos objectius principals: 1) la modificació de lligands de l'esfera de

## Introducció

coordinació primària de CORMs basats en carbonils metàl·lics per tal d'obtenir sensibilitat a una longitud d'ona determinada en termes de fotoactivació i, 2) l'ús de materials com a matrius per millorar algunes de les seves propietats, com per exemple la solubilitat en solució aquosa o la seva encapsulació per tal d'evitar problemes de toxicitat de subproductes produïts durant el procés d'alliberament del CO, entre altres.

En definitiva, la gran quantitat d'opcions per tal de modificar PhotoCORMs ajudarà a la comunitat científica a evolucionar i poder fer la transició entre el laboratori i el món farmacèutic.

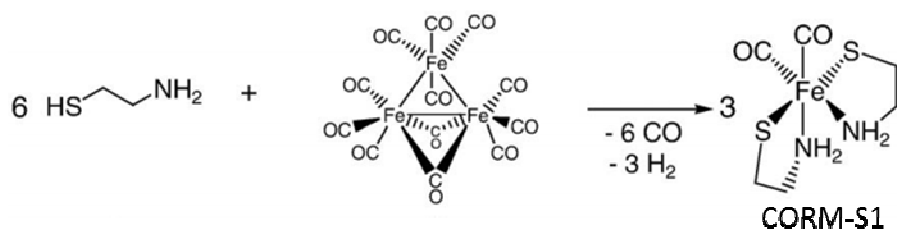


Figura 21. Síntesi del complex CORM-S1 presentat al treball de Westerhausen i el seu grup.<sup>107</sup>

## 2. OBJECTIUS

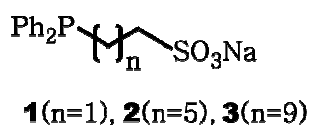
Els objectius generals d'aquest treball són:

1.- La preparació d'una sèrie de fosfines sulfonades tensioactives amb diferents longituds de la cadena alquíl·lica, per a la seva posterior coordinació al centre metàl·lic dels fragments  $\{\text{Mo}(\text{CO})_4\}$  i  $\{\text{Mo}(\text{CO})_5\}$ . La preparació d'aquests compostos ens permetrà disposar de dues famílies de tensioactius metàl·lics carbonílics de molibdè, amb propietats amfifíliques.

2.- L'obtenció i caracterització de sistemes mixtes formats per les molècules sintetitzades i fosfolípids, amb possible aplicació com a molècules alliberadores de monòxid de carboni.

Consegüentment, els objectius específics que dels anteriors es deriven són:

1. La preparació d'una família de fosfines sulfonades tensioactives amb diferent longitud de la cadena alquíl·lica que separa el grup difenilfosfino del sulfonat.



**Figura 22.** Representació esquemàtica de les fosfines  $L_n$  ( $n=1,5,9$ ).

2. La preparació de dues famílies de tensioactius metàl·lics carbonílics de molibdè d'estructura *cis*- $[\text{Mo}(\text{CO})_4(L_n)_2]$  i  $[\text{Mo}(\text{CO})_5(L_n)]$  a partir de la coordinació de les fosfines anteriors al centre metàl·lic dels fragments  $\{\text{Mo}(\text{CO})_4\}$  i  $\{\text{Mo}(\text{CO})_5\}$ . La síntesis d'aquests compostos permetrà:

- Estudiar les propietats d'agregació dels complexos en solució aquosa.
- Valorar l'efecte de la longitud de la cadena hidrocarbonada en les propietats dels complexos de cada família.
- Avaluar la capacitat dels compostos per a ser emprats com a molècules alliberadores de monòxid de carboni.



## *Objectius*

3. L'obtenció de sistemes mixtes formats pels diferents tensioactius sintetitzats i fosfolípids, en concret fosfatidilcolina, amb l'objectiu d'obtenir nous agregats supramoleculars biocompatibles, i que alliberin CO per aplicacions biomèdiques. L'estudi d'aquests agregats es planteja amb els següents apartats:
  - Determinar la mida, morfologia, i estabilitat dels agregats formats en diferents proporcions SPC/tensioactiu.
  - Determinar la capacitat dels sistemes mixtes per a ser emprats com a molècules alliberadores de CO en presència i absència de llum.
4. Estudiar l'efecte en cultius cel·lulars tant de complexos purs com de sistemes mixtes SPC/MTS. En concret es pretén:
  - Determinar la toxicitat dels diferents compostos.
  - Analitzar la interacció dels sistemes vehiculars (MTS purs, en agregats vesiculars o nanoagregats) amb les cèl·lules.

## 3. MATERIALS I MÈTODES

### 3.1. MATERIALS

- Fosfolípids

**Epikuron 200**: fosfolípids de soja ( $C_{44}H_{86}NO_8P$ ) amb un contingut mínim de fosfatidilcolina del 95%. CAS [8002-43-5]. *Degussa Chemicals*. M.W. = 788,13 g/mol. **DMPC**: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina ( $C_{36}H_{72}NO_8P$ ). CAS [18194-24-6]. *Lipoid*. M.W. = 677,93 g/mol. **DHPC**: 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina ( $C_{22}H_{44}NO_8P$ ). CAS [39036-04-9]. *Avanti Polar Lipids, Inc.* M.W. = 453,51 g/mol.

- Reactius per a la quantificació de fosfolípids

**FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O**: clorur de ferro (III) hexahidratat ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ). CAS [10025-77-1]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 99\%$ . M.W. = 270,30 g/mol. **NH<sub>4</sub>SCN**: tiocianat amònic ( $CH_4N_2S$ ). CAS [1762-95-4]. *Merck Millipore*,  $\geq 99\%$ . M.W. = 76,12 g/mol.

- Sondes i quenchers

**HPTS (piranina)**: sonda fluorescent. Sal trisòdica de l'àcid 8-hidroxi-1,3,6-pireniltrisulfònic ( $C_{16}H_7Na_3O_{10}S_3$ ). CAS [6358-69-6]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 97\%$ . M.W. = 524,39 g/mol. **DPX**: *quencher* per la piranina. Bromur de p-xilen-bispiridini ( $C_{18}H_{18}Br_2N_2$ ). CAS [14208-10-7]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 95\%$ . M.W. = 422,16 g/mol.

- Gels d'exclusió molecular

Sephadex G-25 (medium): gel de filtració per cromatografia en columna. CAS [9041-35-4]. *GE Healthcare Life Sciences*. Distribució de la mida de partícules entre 50 i 150  $\mu m \geq 90\%$  (en sec). Sephadex G-75 (superfine): gel de filtració per cromatografia en columna. CAS [37224-29-6]. Distribució de la mida de partícules entre 20 i 50  $\mu m \geq 80\%$  (en sec).

- Reactius per a la síntesi de precursors halosulfonats

**Br(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Cl**: 1-bromo-6-clorohexà ( $C_6H_{12}BrCl$ ). CAS [6294-17-3]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 95\%$ . M.W. = 199,52 g/mol,  $\rho = 1,34$  g/ml a 25°C. **Cl(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>Cl**:

## Materials i mètodes

1,10-diclorodecà ( $C_{10}H_{20}Cl_2$ ). CAS [2162-98-3]. *Sigma-Aldrich*, 99%. M.W. = 211,17 g/mol,  $\rho = 0,99$  g/ml a 25°C. **Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>**: sulfít sòdic anhidre ( $Na_2O_3S$ ). CAS [7757-83-7]. *Fluka*, > 99,5%. M.W. = 126,04 g/mol.

- Reactius per a la síntesi de fosfines sulfonades

**Br(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na**: 2-bromoetansulfonat de sodi ( $C_2H_4BrNaO_3S$ ). CAS [4263-52-9]. *Acros Organics*, 98%. M.W. = 211,01 g/mol. Na: sodi metàl·lic (Na). CAS [7440-23-5]. *Fluka*. M.W. = 22,99 g/mol. **PPh<sub>3</sub>**: trifenilfosfina ( $C_{18}H_{15}P$ ). CAS [603-35-0]. *Sigma-Aldrich*, 99%. M.W. = 262,29 g/mol. **NH<sub>4</sub>Br**: bromur d'amoni ( $H_4BrN$ ). CAS [12124-97-9]. *Fluka*, 99,5%. M.W. = 97,96 g/mol. **NH<sub>4</sub>Cl**: clorur d'amoni ( $H_4ClN$ ). CAS [12125-02-9]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 99,5\%$ . M.W. = 53,49 g/mol. **CH<sub>3</sub>C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>**: 2,2-dimetoxipropà ( $C_5H_{12}O_2$ ). CAS [77-76-9]. *Fluka*, 98%. M.W. = 104,15 g/mol,  $\rho = 0,85$  g/ml a 25°C. **CO<sub>2(s)</sub>**: neu carbònica ( $CO_2$ ). *BDPfrio*.

- Reactius per a la síntesi de complexos de molibdè

**Mo(CO)<sub>6</sub>**: hexacarbonil de molibdè ( $C_6MoO_6$ ). CAS [13939-06-5]. *Sigma-Aldrich*, 98%. M.W. = 264,00 g/mol. **C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NH**: piperidina ( $C_5H_{11}N$ ). CAS [110-89-4]. *Alfa-Aesar*, 99%. M.W. = 85,15 g/mol,  $\rho = 0,86$  g/ml a 25°C. **(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NO·2H<sub>2</sub>O**: òxid de trimetilamina dihidratat ( $C_3H_9NO·2H_2O$ ). CAS [62637-93-8]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 99\%$ . M.W. = 111,14 g/mol. **CaH<sub>2</sub>**: hidrur de calci ( $H_2Ca$ ). CAS [232-189-2]. *Sigma-Aldrich*, 95%. M.W. = 42,09 g/mol. **(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>CO**: benzofenona ( $C_{13}H_{10}O$ ). CAS [119-61-9]. *Sigma-Aldrich*, 99%. M.W. = 182,22 g/mol.

- Reactius per a l'assaig d'alliberament de monòxid de carboni

**Mioglobina**: CAS [100684-32-0]. *Sigma-Aldrich*,  $\geq 90\%$ . M.W. = 16.951,5 kDa.

- Dissolvents

**EtOH**: etanol absolut ( $C_2H_6O$ ). CAS [7732-18-5]. *Fisher Chemical*, 99,5% (qualitat per a anàlisi). M.W. = 46,07 g/mol. **MeOH**: metanol ( $CH_4O$ ). CAS [67-56-1]. *Carlo Erba réactifs-SDS*, 99,85% (qualitat per a anàlisi); *Sigma-Aldrich*,

99,9% (qualitat per a HPLC). M.W. = 32,04 g/mol. **NH<sub>3</sub>**: Amoníac (H<sub>3</sub>N) 3,8. CAS [7664-41-7]. *Linde*, ≥ 99,98%. M.W. = 17,03 g/mol. **CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>**: acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O). CAS [67-64-1]. *Fisher Chemical*, 99,5% (qualitat per a síntesi). **THF**: tetrahidrofurà (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O). CAS [109-99-9]. *Fisher Chemical*, ≥ 99,5% (qualitat per a HPLC). M.W. = 72,11 g/mol. **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>**: èter dietílic (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O). CAS [60-29-7]. *Fisher Chemical*, ≥ 99% (qualitat per a HPLC). M.W. = 74,12 g/mol. **CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>**: n-heptà (C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>). CAS [142-82-5]. *Sigma-Aldrich*, 99% (qualitat per a HPLC). M.W. = 100,2 g/mol. **CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**: diclorometà (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). CAS [75-09-2]. *Carlo Erba réactifs-SDS*, 99,95% (qualitat per a síntesi). M.W. = 84,93 g/mol. **CH<sub>3</sub>CN**: acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N). CAS [75-05-8]. *Carlo Erba réactifs-SDS*, 99,9% (qualitat per a HPLC). M.W. = 41,05 g/mol. **CHCl<sub>3</sub>**: cloroform (CHCl<sub>3</sub>). CAS [67-66-3]. *Acros Organics*, ≥ 99% (qualitat per a HPLC). M.W. = 119,38 g/mol. **Èter de petroli (40-60°C)**: mescla d'hidrocarburs saturats. CAS [64742-49-0]. *Fisher Chemical*, (qualitat per a anàlisi). **(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH**: isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O). CAS [67-63-0]. *Fisher Chemical*, extra pure (qualitat per a síntesi). M.W. = 60,1 g/mol. **Metanol-d<sup>4</sup>**: metanol deuterat (CD<sub>4</sub>O). CAS [811-98-3]. *Euriso-top*, 99,8% D. M.W. = 36,07 g/mol. **D<sub>2</sub>O**: aigua deuterada (D<sub>2</sub>O). CAS [7789-20-0]. *Sigma Aldrich*, 99,9% D. M.W. = 20,03 g/mol.

- Solucions i buffers

**PBS**: *buffer* fosfat pH= 7,4. Es prepara una solució 10x amb 40g NaCl, 1g KCl, 8,9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dissolts en 0.5 l d'H<sub>2</sub>O destil·lada. A partir d'aquesta s'obté la solució desitjada fent una dilució 1:10 i ajustant el pH a 7,4. **NaCl**: clorur de sodi (ClNa). CAS [7647-14-5]. *Sigma-Aldrich*, ≥ 99,8%. M.W. = 58,44 g/mol. **KCl**: clorur de potassi (ClK). CAS [7447-40-7]. *Fisher Chemical*, ≥ 99%. M.W. = 74,54 g/mol. **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O**: hidrogenfosfat de sodi dihidratat (HNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P). CAS [10028-24-7]. *Sigma-Aldrich*, ≥ 98,5%. M.W. = 177,99 g/mol. **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: dihidrogenfosfat de potassi (H<sub>2</sub>KO<sub>4</sub>P). CAS [7778-77-0]. *Fisher Chemical*, ≥ 99%. M.W. = 136,09 g/mol.

## **3.2. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPOSTOS**

### **3.2.1. Manipulació dels productes**

Pràcticament totes les reaccions químiques en aquest treball requereixen treballar sota atmosfera inert de nitrogen, i es duen a terme mitjançant tècniques Schlenck. Donat que és necessari evitar la presència d'aigua, els dissolvents emprats són assecats prèviament a la seva utilització. El mètode emprat per aquest procés es detalla a continuació:

Tetrahidrofurà i èter dietílic: es mantenen a reflux amb Na metàl·lic i benzofenona com a indicador, deixant refluir com a mínim 24 h un cop preparat el sistema. El dissolvent es destil·la de la mescla just uns moments abans de fer-lo servir i es reserva en un Schlenck tancat sota atmosfera de nitrogen.

Metanol: s'utilitza metanol amb qualitat per a HPLC amb un contingut d'aigua pràcticament nul i s'acaba d'assecar conservant-lo amb tamís molecular de 3 Å, que prèviament ha estat activat durant 24 h a l'estufa a 100 °C.

Diclormetà: es manté a reflux amb  $\text{CaH}_2$  anhidre i es destil·la de la mescla en el moment d'utilitzar-lo.

### **3.2.2. Anàlisi elemental**

Les anàlisis elementals de C, H, N i S, necessàries per determinar el grau de puresa dels compostos sintetitzats, es duen a terme al Servei d'Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona amb una analitzador *Flash EA 2000 CHNS, Thermo Fisher Scientific*.

La tècnica consisteix en la combustió de la mostra en presència d' $\text{O}_2$  a elevada temperatura i el posterior anàlisi quantitatiu dels gasos produïts per cromatografia de gasos. Donat que la quantificació del S present en aquest tipus de compostos presenta certes dificultats es fa servir catalitzador de  $\text{V}_2\text{O}_5$  per tal d'optimitzar el procés.

### **3.2.3. Espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)**

L'espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) estudia el comportament de certs nuclis atòmics (aquells que posseeixen spin nuclear diferent de zero) en presència d'un camp magnètic extern. El camp magnètic aplicat produeix un desdoblament dels nivells degenerats d'energia del spin nuclear, de manera que poden induir-se transicions entre ells com a conseqüència de l'absorció d'una radiació electromagnètica adequada. La disposició dels nivells d'energia és una propietat tant dels nuclis d'una molècula com del seu entorn electrònic i de les interaccions entre ambdós. Així, doncs, la intensitat, forma i posició dels senyals a l'espectre d'un nucli determinat es troben íntimament relacionades amb la seva estructura molecular, per lo que un anàlisi detallat de l'espectre proporciona valuosa informació sobre l'estructura del compost que l'origina. Resultant, aquesta tècnica de les més eficients per l'estudi de l'estructura de molècules.

Els espectres de RMN s'han enregistrat al servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els instruments utilitzats per enregistrar els espectres de  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  han estat *Bruker DPX-250*, *Bruker DPX-360*, i *Bruker AV400 HRMAS*, tots de tipus RMN-FT.

### **3.2.4. Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)**

L'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (FTIR) es basa en la interacció de radiació infraroja amb la mostra. La porció infraroja de l'espectre electromagnètic es divideix en tres regions: infraroig llunyà, entre  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ , que posseeix baixa energia i pot ser emprat per espectroscòpia rotacional; infraroig mitjà, entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , emprada per estudiar les vibracions fonamentals i l'estructura rotacional vibracional i per tant, la més interessant per a la anàlisi de compostos orgànics; i l'infraroig proper, entre  $14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ .

Les molècules poden vibrar de modes concrets (modes normals vibracionals) que es corresponen a diferents nivells d'energia. Per tal que un mode vibracional en una molècula sigui actiu (absorbeixi) a l'infraroig (IR) ha d'estar associat a canvis en el seu dipol permanent. La freqüència de vibració depèn de la naturalesa química dels àtoms

## *Materials i mètodes*

implicats en la vibració, de la força de l'enllaç i del tipus de vibració. Així, doncs, l'espectroscòpia d'IR aporta informació relacionada amb les vibracions característiques del conjunt d'àtoms presents a la mostra. Tenint en compte que cada grup funcional té una o diverses absorcions característiques a longituds d'ona determinades, l'espectre IR d'una mostra resulta molt útil per a la determinació de l'estructura de les substàncies que la componen.

Els espectres IR per a la caracterització de productes s'han enregistrat a la Unitat de Biofísica de la Universitat Autònoma de Barcelona, en un espectrofotòmetre *Varian 7000e FT-IR*, i al Laboratori de Luminescència i Espectroscòpia Biomolecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, utilitzant un espectrofotòmetre *Varian 600-IR FT-IR*. Aquest últim instrument va ser emprat també pels assajos d'alliberament de monòxid de carboni, tal i com es descriu més endavant a l'apartat 3.5.2.

### **3.2.5. Microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier ( $\mu$ -FTIR: Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy)**

Als últims anys la tècnica de  $\mu$ -FTIR ha esdevingut una eina important per a la caracterització de mostres amb dificultats per ser analitzades mitjançant tècniques FTIR convencionals. Aquesta moderna tècnica permet registrar senyals IR amb una elevada resolució espacial (la mida del feix pot arribar a ser 5  $\mu\text{m}$ ), posseeix un gran potencial per a la caracterització de mostres complexes, i permet un anàlisi *in situ* no destructiu de la mostra.

L'acoblament d'un microscopi amb un espectròmetre FTIR obre la possibilitat d'inspeccionar i detectar grups funcionals d'un determinat compost en una regió 2D de la mostra, és a dir, és possible registrar-hi espectres a diferents punts concrets obtenint un mapa de distribució dels grups funcionals del compost d'interès. El temps d'adquisició depèn dels paràmetres experimentals (resolució i nombre d'*scans* necessaris). La mida del feix d'un  $\mu$ -FTIR generalment es troba entre 20 i 100  $\mu\text{m}$  quan s'utilitza una font de llum IR convencional, i es redueix a 3-5  $\mu\text{m}$  si es fa servir radiació de sincrotró.<sup>110</sup>

La metodologia descrita ha estat aplicada en aquest treball per a estudiar l'efecte del tractament de cultius cel·lulars de fibroblasts amb sistemes mixtes SPC/MTS

(concretament els complexos de la família L2), utilitzant com a controls cultius cel·lulars no tractats i com a blanc cultius tractats amb liposomes. D'una banda, es pretén detectar canvis a l'estructura cel·lular mitjançant l'anàlisi PCA (*Principal Component Analysis*) de les regions importants del cos cel·lular. I, per un altre costat, es vol detectar la presència dels complexos a l'interior de les cèl·lules a través de les bandes d'absorció dels grups carbonils dels compostos, les quals apareixen en una regió ben separada de les bandes corresponents a cos cel·lular.

Els espectres han estat enregistrats utilitzant llum de sincrotró com a font de radiació (ALBA synchrotron, MIRAS beamline, Spain), amb la col·laboració de la Dra. Núria Benseny-Cases. Les mostres, preparades sobre finestres de CaF<sub>2</sub>, descrites a l'apartat 3.6.3., s'introdueixen en un microscopi Hyperion 3000 equipat amb un objectiu 36x acoblat a un espectròmetre Vertex 80 (Bruker). Els espectres s'adquireixen amb una resolució de 4 cm<sup>-1</sup>, acumulant-se 256 scans amb una finestra òptica de 8x8 µm. Per cada mostra analitzada cal registrar un mínim de 30 espectres perquè la relació senyal/soroll permeti realitzar l'anàlisi estadística de les dades. Els espectres es tracten mitjançant el programa *The Unscrambler* després d'haver-hi aplicat un filtre que elimina els espectres molt sorollosos o els que tenen una línia base deficient. Posteriorment s'obté la segona derivada de tots ells amb la finalitat de millorar la resolució de les diferents bandes fent servir un algoritme Savitsky-Golay amb 15 punts de filtre i un polinomi d'ordre dos. Finalment, els espectres derivats es normalitzen per regions, fet que permet comparar amb més facilitat els espectres entre si i establir diferències en funció dels grups de mostres. L'anàlisi estadístic es basa en el càlcul de la co-variança entre els diferents espectres, permetent així l'estudi de les diferències entre les diferents mostres. Per a cada regió, els components principals (PC de *Principal Components* de l'anglès) defineixen els conjunts de números d'ona (bandes d'absorció a l'IR) que varien més en tots els espectres. La representació dels espectres doncs, es pot fer en un nou sistema de coordenades on PC1 i PC2 en seran els eixos i cada espectre representarà un punt. Aquest gràfic de punts (*Score*) permet representar els centenars d'espectres adquirits en funció de les seves diferències.



### **3.3. MÈTODES DE PREPARACIÓ D'AGREGATS D'SPC, LLIGANDS I MTS**

#### **3.3.1. Preparació d'agregats d'SPC, lligands i MTS per hidratació d'un film homogeni**

El mètode més simple de preparació d'agregats d'SPC, lligands, MTS, o sistemes mixtes SPC/ligand i SPC/MTS és per hidratació d'un film homogeni d'aquests compostos o mescla de compostos amb agitació mecànica.

Per a l'obtenció de liposomes, es dissolen els fosfolípids en un solvent orgànic adequat, per exemple cloroform o una mescla de dissolvents, com ara cloroform/metanol (habitualment 2:1 v/v). Tot seguit, la solució homogènia de fosfolípids s'evapora al buit fins a sequedat obtenint-se una pel·lícula fina a l'interior d'un baló o tub esmerilat. Per tal d'assegurar que no hi ha solvent residual es fa passar, durant aproximadament 10 min, un flux de  $N_{2(g)}$  sobre la mostra o, alternativament, es deixa la mostra en un dessecador connectat a una bomba de buit durant un parell d'hores. Un cop preparat el film, s'afegeix la solució aquosa i s'agita mecànicament, inicialment un parell de minuts amb l'ajut d'un vòrtex, i després amb una agitació més suau durant un mínim de trenta minuts per tal d'assegurar una correcta hidratació i formació de les vesícules. Mitjançant aquest sistema s'obté una distribució de vesícules MLVs de diferents mides. Aquest tipus de liposomes poden ser el punt de partida per tal d'obtenir agregats de mida determinada mitjançant altres tècniques complementàries.

Els agregats de MTS (i dels seus lligands precursors) s'obtenen pel mateix procediment descrit per als liposomes però utilitzant metanol com a dissolvent orgànic en la preparació del film, facilitant d'aquesta manera la solubilització dels compostos.

Pel que fa als sistemes mixtes SPC/ligands i SPC/MTS cal tenir en compte que si el que es vol incorporar als liposomes és un compost liposoluble, llavors aquest s'afegeix al solvent orgànic amb els fosfolípids abans de la preparació del film. Així doncs, es prepara una dissolució, amb les proporcions desitjades de fosfolípid i lligand o MTS, en una mescla cloroform:metanol (1:2 v/v) donat que tant els lligands com els MTS són pràcticament insolubles en cloroform i es segueix el procediment descrit per a l'obtenció de liposomes. Els lligands fosfina i els MTS que se'n deriven d'aquests són molècules amfifíliques que formen agregats per si sols, per tant, és d'esperar que a partir

d'una pel·lícula fina homogènia d'SPC i lligands o MTS, els tensioactius s'incorporin a la membrana lipídica formant agregats mixtes.

Els films així obtinguts no tenen perquè ser utilitzats immediatament, es poden conservar congelats a -20°C durant llargs períodes de temps (> 6 mesos).

Aquest mètode també permet encapsular substàncies hidrofíliques a l'interior dels liposomes simplement afegint la substància en qüestió a la solució aquosa emprada per a la hidratació del film de fosfolípids. D'aquesta manera es varen obtenir els liposomes o agregats mixtes amb piranina encapsulada, procediment descrit a l'apartat 3.3.3.

### **3.3.2. Preparació d'agregats d'SPC, lligands i MTS de mida definida per extrusió mecànica**

Sovint és convenient obtenir agregats de mida ben definida i reproduïble. Per tal d'aconseguir aquest objectiu una tècnica d'especial interès és l'extrusió mecànica de sistemes d'MLVs<sup>111</sup> mitjançant membranes de policarbonat, hidrofíliques, i amb diferent mida de porus, escollides en funció de la mida de l'agregat que es vol obtenir. Mitjançant aquesta metodologia es van obtenir sistemes de mida ben definida (100 nm, 800 nm o 1 µm) a partir de suspensions preparades pel mètode d'hidratació d'un film de fosfolípids o mescla SPC/lligand o SPC/MTS, fent passar la solució a través d'una membrana 19 vegades.

### **3.3.3. Preparació de liposomes o metal·losomes amb piranina encapsulada**

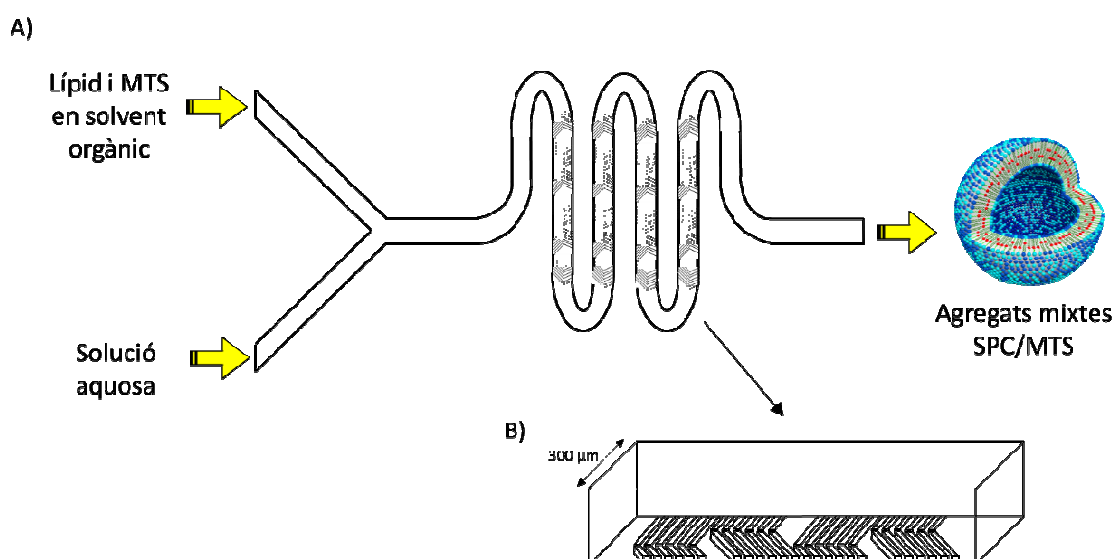
Per tal d'obtenir sistemes vesiculars amb piranina (HPTS) encapsulada s'utilitza una solució aquosa d'HPTS 2 mM a l'hora de preparar els agregats a partir del mètode d'hidratació d'una pel·lícula fina de fosfolípids o mescla SPC/MTS (per liposomes i metal·losomes, respectivament). Una part de la piranina present, en ser un compost hidrosoluble, quedarà a l'interior aquós dels liposomes. Posteriorment, es purifiquen els agregats vesiculars mitjançant cromatografia d'exclusió molecular amb columnes de Sephadex G-25 per tal de separar els agregats de la piranina que hi ha al medi (apartat 3.4.1.).

### 3.3.4. Preparació de liposomes o metal·losomes mitjançant tècniques de microfluídica

Les tècniques de microfluídica emergeixen com un nou mètode de preparació de liposomes on les petites dimensions d'un micromesclador (chips plans) permeten realitzar mescles reproduïbles en mil·lisegons, en volums petits, i dominades bàsicament per fenòmens de difusió i/o convecció.<sup>112</sup>

Aquesta metodologia es va dur a terme a la Universitat de Strathclyde, a Glasgow, en col·laboració amb la Dra. Yvonne Perrie, com a objecte d'una estada a l'estranger de tres mesos de duració. L'objectiu va ser l'estudi de l'efecte de diferents paràmetres (proporcions SPC/MTS, concentració, flux, força iònica, dissolvent orgànic) en la preparació d'agregats mixtes SPC/MTS (en concret, amb els MTS de la família L6), caracteritzant la seva mida.

A l'estudi s'emprà un micromesclador esglaonat d'espiga amb uns canals de 300  $\mu\text{m}$  d'amplada (Figura 23). El lípid i el MTS, dissolts en solvent orgànic, circulen per un dels canals, mentre que per l'altre ho fa una solució aquosa. A l'interior del micromesclador té lloc una reacció de nanoprecipitació que resulta en la formació dels agregats SPC/MTS. La solució obtinguda del micromesclador es purifica amb columnes de Sephadex G-75 per tal d'eliminar el solvent residual (apartat 3.4.1).



**Figura 23.** A) Representació esquemàtica del procés d'obtenció de liposomes o sistemes mixtes SPC/MTS per metodologies de microfluídica. B) Esquema de la cambra interior d'un micromesclador.

Durant l'estudi la proporció SPC/MTS va variar entre 3:0 i 3:3 mM/mM, el flux total d'entrada (TFR) entre 2 i 18 ml/min, el flux relatiu entre la fase aquosa i orgànica (FRR) es va modificar entre 1 i 5, la força iònica de la fase aquosa entre 0 i 155 mM de NaCl, i els dissolvents orgànics emprats van ser metanol i etanol.

En alguns casos l'efecte d'alguns dels paràmetres es va avaluar conjuntament seguint un disseny experimental multifactorial<sup>113</sup> i a partir de les anàlisi de mida obtingudes es van obtenir les corresponents superfícies de resposta.

### **3.3.5. Preparació de bicel·les DMPC/DHPC**

Les bicel·les DMPC/DHPC s'obtenen seguint el procediment descrit a la bibliografia.<sup>114</sup> Inicialment es prepara un film homogeni per evaporació d'una solució clorofòrmica que contingui els dos lípids amb una proporció DMPC/DHPC 3:1 mol/mol. Posteriorment s'hidrata amb la quantitat necessària d'aigua desionitzada que origini una concentració de DMPC/DHPC 302:100 mM/mM i a la dispersió obtinguda s'alternen cicles de baixa (~ 4 °C) i elevada (40-50 °C) temperatura en combinació amb agitació mecànica amb vòrtex. Els sistemes bicel·lars es formen quan la solució esdevé transparent després d'un cicle a baixa temperatura. En augmentar la temperatura la solució esdevé viscosa. En el nostre cas van ser necessaris 8 cicles per a l'obtenció dels sistemes bicel·lars, que es van conservar a 4 °C.

## **3.4. MÈTODES DE CARACTERITZACIÓ D'AGREGATS**

### **3.4.1. Purificació d'agregats per cromatografia d'exclusió molecular (SEC)**

La cromatografia d'exclusió molecular permet la separació de molècules i/o agregats en funció de la seva mida. A diferència d'altres mètodes cromatogràfics, es basa en l'absència d'interaccions entre l'analit i la fase estacionària empaquetada a la columna. Les molècules se separen en funció del seu pes molecular de manera que les més grans són les primeres en eluir, mentre que les més petites, que poden penetrar als porus de la fase estacionària, s'alenteixen i elueixen més tard.

En el present treball s'ha emprat aquesta tècnica per separar liposomes o metal·losomes de substàncies hidrosolubles no incorporades al seu interior amb l'objectiu de

## *Materials i mètodes*

determinar el volum encapsulat de les vesícules i la seva permeabilitat. També es va fer servir SEC en les mostres preparades amb tècniques de microfluídica per tal d'eliminar el dissolvent orgànic residual present degut al propi mètode de preparació de les mostres.

El medi cromatogràfic emprat va ser Sephadex G-25 medium excepte per les mostres preparades per tècniques de microfluídica on es va fer servir Sephadex G-75 superfine. Els gels es van hidratar amb la fase mòbil segons les indicacions del fabricant, 24 h a temperatura ambient pel cas de Sephadex G25 medium, i 3 h a 90°C pel Sephadex G-75 superfine. L'eluent, en general va ser aigua desionitzada, o solucions aquoses de NaCl (isotòniques amb les mostres) en els estudis sobre efectes de la força iònica en la mida dels agregats. Per tal de dur a terme la separació s'utilitzen columnes PD-10, amb un diàmetre intern d'1,5 cm, i s'omplen fins a una alçada de 6,5 cm. El volum de mostra aplicada va ser de 100 µl pels estudis de volum encapsulat i permeabilitat. A les purificacions de les mostres obtingudes mitjançant tècniques de microfluídica s'aplicaven 1,5 ml (1ml de la mostra preparada i 0,5 ml d'aigua desionitzada), es deixava entrar tot el volum, i s'aplicaven 3,5 ml d'aigua desionitzada per recollir els agregats que havien quedat retinguts a la columna. Les columnes poden reutilitzar-se diverses vegades sempre i quan després del seu ús es dugui a terme un rentat exhaustiu i es conservin a 4°C en una solució al 20 % d'etanol.

### **3.4.2. Quantificació de fosfolípids**

La quantificació de fosfolípids es va portar a terme mitjançant el mètode de Marshall Steward<sup>115</sup> amb lleugeres modificacions per tal d'optimitzar el procés. Aquest mètode es basa en la detecció colorimètrica per absorbància en la zona de l'espectre visible del complex, soluble en cloroform, format pel ferrocianat amònic amb els fosfolípids presents a la mostra. El coeficient d'extinció molar del complex, així com la longitud d'ona del màxim d'absorció, depenen del cap polar del fosfolípid en qüestió, de manera que és necessari realitzar una corba patró amb el fosfolípid a quantificar.

El procediment es duu a terme en tubs de vidre amb tap de tefló on s'afegeix 1 ml de reactiu de Steward (ferrocianat amònic en aigua, preparat amb  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1 M (27,03 g/l) i  $\text{NH}_4\text{SCN}$  0,4 M (30,4 g/l)), 1 ml de cloroform i 300 µl de mostra o patró a analitzar (en cas d'emprar volums inferiors de mostra o patró tots el tub s'enrasen fins al

mateix volum amb aigua). A continuació s'agiten els tubs amb l'ajut d'un vòrtex per un període mínim de 60 segons, i es deixen reposar durant 15 minuts fins a una correcta separació de fases. Es retira la fase aquosa (superior) i es determina l'absorbància de la fase clorofòrmica, on està present el complex fosfolípid-ferrocianat amònic, al màxim d'absorbància característic per l'SPC (470 nm). Els valors originats per les mostres s'interpolen a la corba de calibratge obtinguda amb els patrons. A títol orientatiu, i amb els volums indicats anteriorment, per a una mostra d'SPC 0,5 mM s'obté una absorbància situada al voltant d'1,25.

La quantificació de fosfolípids és necessària per als càlculs de volum encapsulat dels diferents tipus d'agregats.

### 3.4.3. Quantificació d'HPTS per fluorescència.

La piranina (HPTS) és una sonda fluorescent amb un grup OH ionitzable, hidrofílica i impermeable a les membranes lipídiques. L'emissió de llum d'aquesta molècula depèn, entre altres factors, de la seva concentració, del pH, de la longitud d'ona d'excitació i de la possible presència de *quenchers* específics al medi. La Figura 24 mostra l'estructura química de l'HPTS i la dependència del seu espectre d'absorció amb el pH. Com s'observa, aquesta molècula presenta dos màxims locals, un a 403 nm, que augmenta en intensitat en acidificar el medi, i un altre a 454 nm, que creix a pH bàsics. A més d'aquests màxims l'HPTS presenta un punt isosbèstic, a 416 nm, en el qual s'intercepten els espectres, punt en què la fluorescència és independent del pH.<sup>116</sup>

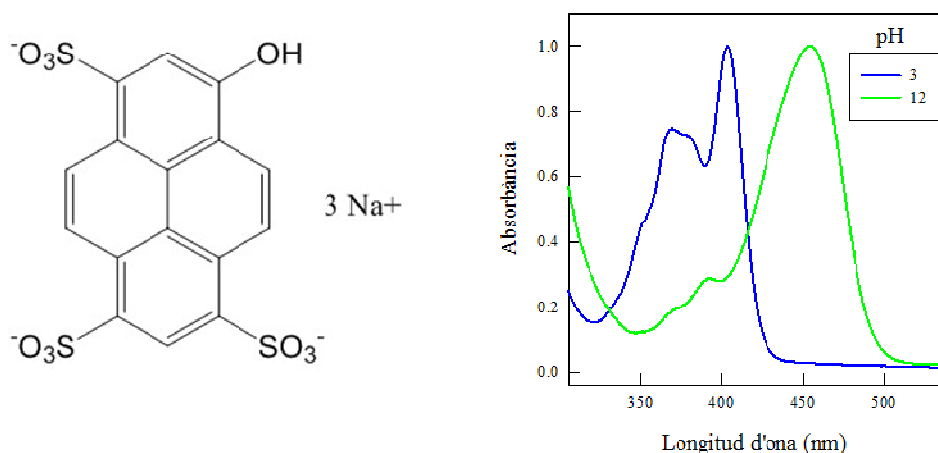


Figura 24. Estructura química de l'HPTS i espectres d'absorbància en funció del pH.

## *Materials i mètodes*

La quantificació d'HPTS en mostres es va portar a terme excitant la sonda al punt isosbètic, mesurant la seva emissió a 510 nm, i comparant els valors obtinguts amb una corba patró realitzada amb solucions estàndard. Aquesta tècnica, combinada amb l'addició d'un *quencher* (DPX) a la solució, va ser emprada per al càlcul de volum encapsulat i als estudis de permeabilitat de sistemes mixtes SPC/l·ligands i SPC/MTS (apartats 3.4.4. i 3.4.5.).

Els espectres de fluorescència han estat enregistrats a la Unitat de Biofísica de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb l'instrument QuantaMaster™ Spectrofluorometer i les dades es tracten amb software Felix32 (Photon Technology International).

### **3.4.4. Determinació de la permeabilitat de vesícules**

Per tal d'avaluar la permeabilitat de liposomes i de vesícules mixtes SPC/l·ligands i SPC/MTS es preparen els sistemes vesiculars que encapsulin HPTS 2 mM, un fluoròfor hidrosoluble que no travessa les membranes lipídiques. Posteriorment, aquests agregats es purifiquen mitjançant cromatografia d'exclusió molecular amb columnes de Sephadex G-25 (el volum aplicat va ser 100 µl) i a la mostra recollida s'afegeix DPX, un *quencher* de la piranina, fins una concentració final de 10 mM.<sup>117</sup> D'aquesta manera, tota la fluorescència que es pugui detectar serà únicament deguda a l'HPTS continguda a l'interior dels agregats. Tot seguit, s'analitza la fluorescència al llarg del temps, durant un mínim de 6 h. Qualsevol decaïment de fluorescència que es detecti serà indicatiu de la sortida de l'HPTS de l'interior dels agregats.

### **3.4.5. Determinació del volum encapsulat**

La determinació del volum aquós encapsulat a l'interior de liposomes o agregats mixtes, generalment expressat com a l de solució encapsulats/mol de lípid, és un paràmetre que informa de la capacitat que tenen les vesícules de capturar medi aquós, pel que, per exemple, és important a tenir-lo en compte en el cas que es vulgui incorporar una substància hidrosoluble al seu interior.

Amb l'objectiu d'avaluar aquest paràmetre, s'obtenen liposomes o vesícules mixtes a partir del mètode d'hidratació d'una pel·lícula fina homogènia, fent servir una solució

aquosa d'HPTS 2mM, i es purifiquen mitjançant SEC per tal d'eliminar l'HPTS no encapsulada. Per fer-ho s'apliquen 100 µl de mostra a la columna i es recullen fraccions de 0,5 ml, les quals es dilueixen a la meitat. D'aquestes fraccions es reserva una alíquota per quantificar el lípid mitjançant el mètode de Marshall Steward. A la resta de solució s'afegeix DPX, de manera que s'elimina totalment la fluorescència de l'HPTS residual que pugui haver quedat en el medi aquós extern dels liposomes durant la separació per columna. Tot seguit es quantifica, al més ràpid possible i mitjançant fluorescència, el contingut d'HPTS encapsulada. D'aquesta manera, en primer lloc, es determinen els mol d'HPTS encapsulats per mol de lípid. A partir del valor referit, i tenint en compte que l'HPTS encapsulada està a una concentració igual (o molt propera) a 2 mM, s'obté el volum encapsulat de les vesícules:

$$Vol. encap (l/mol) = \frac{mmol HPTS_{encapsulada}}{mol Lípid} \cdot \frac{l_{encapsulat}}{2 mmol HPTS}$$

**Equació 1.** Expressió per al càlcul del volum encapsulat

Cal dir que és necessari mesurar el contingut de lípid en una alíquota abans d'afegir el DPX a la mostra donat que el *quencher* interacciona amb els complexos i causa interferències a l'hora de fer la quantificació per Marshall Steward.

### 3.4.6. Determinació de la concentració micel·lar crítica (cmc) per fluorescència

L'existència de canvis en la forma i la intensitat dels espectres de fluorescència tant de lligands com d'MTS en solucions aquoses a diferents concentracions (fluorescència deguda principalment als grups fenils de les molècules) obre la possibilitat a la determinació de la cmc dels complexos. Els canvis de fluorescència es deuen a canvis en l'entorn dels fluoròfors causats per la formació d'agregats de diversa naturalesa, fenomen que ja ha estat descrit en altres compostos tensioactius carregats.<sup>118,119,120</sup> Així doncs, a partir de l'enregistrament de l'espectre d'emissió dels compostos (excitació a 250 nm per lligands i 305 nm per complexos) a mesura que es van realitzant dilucions consecutives, és possible determinar la seva cmc. Després de cada dilució és necessari deixar transcórrer uns 20 minuts per tal que s'estabilitzi el sistema i, per tant, la lectura. La variació de l'evolució descrita es caracteritza obtenint la relació d'intensitats entre dues longituds d'ona, corresponents a màxims locals d'emissió i representant aquests



## *Materials i mètodes*

valors en front de la concentració de complexos. Mitjançant aquest procediment es detecten canvis sobtats de pendent a les corbes, que es corresponen als valors de cmc de cada complex.

### **3.4.7. Espectroscòpia de dispersió dinàmica de la llum (DLS)**

L'espectroscòpia de dispersió dinàmica de la llum és una tècnica no invasiva i ben establerta per tal de determinar paràmetres físics de partícules o agregats en solució a la regió submicromètrica com ara la mida, distribució de poblacions de partícules, índex de polidispersió, coeficient de difusió, etc. El moviment brownià de les partícules en suspensió fa que la llum làser sigui dispersada amb intensitats variables i amb una freqüència diferent de la incident (efecte Doppler). L'anàlisi d'aquestes fluctuacions es relaciona amb la velocitat del moviment brownià i, per tant, amb la mida de les partícules o agregats en suspensió.

Les mesures es van realitzar a temperatura ambient mitjançant l'equip Microtrac Ultrafine Particle Analyzer (UPA) 150, instrument que permet treballar en el rang de mida on es troben la majoria de formulacions preparades (rang de l'instrument entre 0,003 i 6,5  $\mu\text{m}$ ). Les mostres preparades mitjançant tècniques de microfluídica van ser mesurades amb l'equip ZetasizerNano ZS (Malvern Instruments, UK). Les diferents formulacions varen ser preparades amb aigua desionitzada i, com a mínim, trenta minuts abans de ser mesurades per tal de garantir la correcta formació i estabilitat dels agregats. El temps de lectura s'ajustà en funció de la dispersió de la mostra, però en general cinc minuts es considerà un temps suficient. Els resultats s'expressen en distribució en volum.

### **3.4.8. Determinació del potencial Z**

El potencial Z és una mesura indirecta de la magnitud de repulsió o atracció electrostàtica entre partícules essent un paràmetre important per l'estabilitat de formulacions. D'acord amb el model de la doble capa elèctrica, una partícula carregada dispersa en una solució s'envolta, en primer lloc, d'una capa fixa i rígida de contraions coneguda com a capa d'Stern. Tot seguit, al seu voltant es disposa una distribució d'ions de diferent polaritat determinada per un balanç de forces electrostàtiques

oposades, formant l'anomenada capa difosa, creant-se així una doble capa elèctrica en la interfase partícula-líquid. La partícula i la seva atmosfera carregada produeixen a la solució un potencial elèctric relatiu que és màxim a la superfície de la partícula i disminueix gradualment amb la distància, essent zero fora de la capa difosa. De la mateixa manera que alguns ions es mouen amb la partícula, també hi ha una capa de dissolvent que es desplaça amb ella. El límit entre aquest dissolvent i el que es mou lliurement al si de la solució constitueix el pla de tall, en el qual el potencial elèctric associat rep el nom de potencial Z. Aquest depèn principalment del pH, de la temperatura i de la conductivitat del medi, que està determinada per la concentració d'ions, pel que aquests paràmetres han d'estar ben definits en el moment de prendre mesures. Les dades de potencial Z van ser adquirides amb l'equip Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments, UK), preparant les mostres aproximadament trenta minuts abans de ser analitzades.

### 3.4.9. Criomicroscòpia electrònica de transmissió (*Cryo-TEM*)

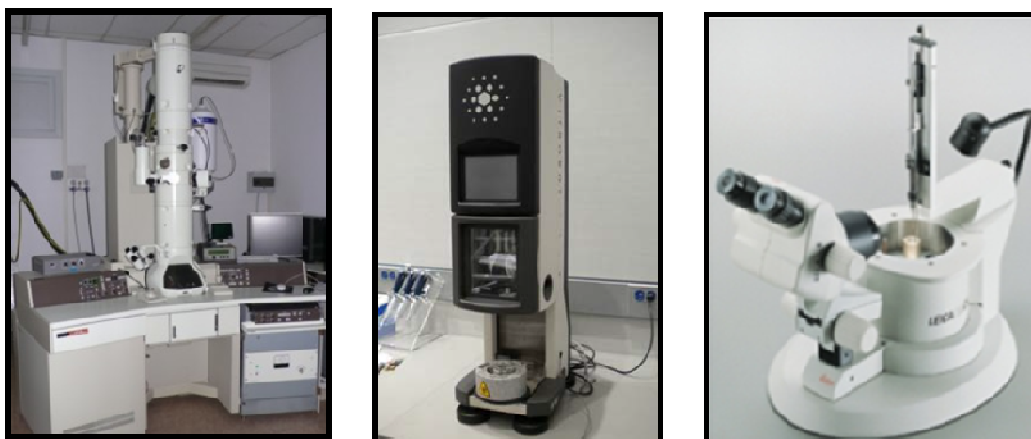
Mitjançant *Cryo-TEM* es poden visualitzar mostres en unes condicions molt properes a les que es troben en medi líquid, és a dir, conservant-ne l'estructura i integritat. Això es possible gràcies a la tècnica criogènica per la qual, a través d'una congelació molt ràpida, s'aconsegueix la vitrificació de l'aigua de la mostra evitant la formació de cristalls de gel que podrien alterar les estructures que es volen visualitzar.

La criofixació de la mostra es duu a terme sobre reixetes de coure, amb una pel·lícula de carboni a sobre, a les que prèviament se'ls hi ha aplicat una petita descàrrega elèctrica per aconseguir que la mostra s'hi adhereixi millor. Es diposita una microgota de mostra sobre la reixeta que es troba subjecta amb unes pinces a l'injector d'un aparell anomenat *Vitrobot*. Tot seguit, per un procés anomenat *blotting*, l'aparell treu l'excés de mostra per un lleu contacte amb paper de filtre, deixant només una capa fina, i immediatament després l'injector submergeix la mostra dins d'età líquid en tant sols unes dècimes de segon, aconseguint d'aquesta manera la criofixació. El procés descrit rep el nom de *Plunge Freezing* i es realitza amb età (que és condensat per transferència d'età gas a un dipòsit refredat amb nitrogen líquid) perquè presenta una elevada conductivitat tèrmica que permet una ràpida transferència de calor de la mostra al líquid, pel que té lloc una correcta criofixació. La reixeta es col·loca tot seguit sobre un portamostres, que està

## Materials i mètodes

refredat en nitrogen líquid i, finalment, s'introdueix el portamostres al microscopi, es fa el buit i es procedeix a visualitzar la mostra.

El microscopi electrònic de transmissió utilitza com a font d'il·luminació un feix electrònic que és dirigit i focalitzat mitjançant lents electromagnètiques. El procés es realitza a l'interior d'una columna d'alt buit, de manera que els electrons accelerats segueixen trajectòries rectes fins que interaccionen amb els àtoms presents a la mostra. El xocs que es produeixen fan que els electrons perdin velocitat i variïn la seva trajectòria. Els electrons que no xoquen amb la mostra es projecten sobre una pantalla fluorescent, placa fotogràfica o CCD (*Charge Coupled Device*) d'una càmera i formen imatges reals. Les zones que més desvien els electrons apareixen més fosques que les que desvien menys.



**Figura 25.** Imatges del microscopi electrònic de transmissió criogènica, vitrobot i *plunging*.

Les imatges obtingudes mitjançant aquesta tècnica es van enregistrar a l'instrument Jeol JEM-2011, que opera amb un voltatge d'acceleració entre 80 i 200 kV (amb una resolució de 0,18 nm a 200 kV), equipat amb càmera CCD GATAN 895 USC 4000, portamostres GATAN cryo holder i detector EDS Oxford Instruments X-max (Figura 25). Totes les mostres visualitzades varen ser preparades amb antelació suficient per tal de garantir la correcta formació d'agregats.

### 3.4.10. Solubilització de liposomes. Determinació del caràcter tensioactiu de lligands i MTS

El fenomen de la solubilització dels liposomes consisteix en el trencament de les membranes lipídiques per efecte de tensioactius, fet que dona lloc a la formació de micel·les mixtes de lípid i tensioactiu.

Per tal de determinar el caràcter tensioactiu dels lligands i MTS estudiats en aquest treball, es van afegir quantitats creixents dels tensioactius en aigua (preparats directament pel mètode d'hidratació d'una pel·lícula fina) a suspensions de liposomes de mida definida (aproximadament 100 nm) preparats per extrusió a partir de MLVs de concentració inicial 15 mM, de manera que la concentració final d'SPC a les mescles es va mantenir constant (3 mM). Les mescles obtingudes es van caracteritzar mitjançant DLS i també es va mesurar la seva absorbància a 600 nm. Ambdues metodologies permeten determinar si es produeixen canvis en la mida dels liposomes en presència dels tensioactius.

### 3.4.11. Dispersió de raig X a angles petits (SAXS: *Small angle X-ray scattering*)

La dispersió de raig X a angles petits és una tècnica no destructiva molt útil per a la determinació de la mida i estructura d'agregats en solució. En travessar les mostres els raigs X es dispersen degut a les diferències de densitat electrònica entre el medi i els agregats. Així doncs, la tècnica es basa en l'avaluació del patró de dispersió de raigs X obtingut per la interacció entre la radiació incident i els electrons dels àtoms de la mostra a analitzar. El patró referit mostra diferents intensitats de raigs X a diferents angles de dispersió. Per cada angle de dispersió  $\phi$  s'obté el mòdul del vector de dispersió,  $q$ , en  $\text{\AA}^{-1}$  (Equació 2).

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \phi$$

**Equació 2.** Expressió del mòdul del vector de dispersió,  $q$ .  $\phi$ : angle de dispersió;  $\lambda$ : longitud d'ona de la radiació.

Segons la Llei de Bragg (Equació 3) la posició dels pics de dispersió es relaciona directament amb la distància de repetició,  $d$ , de l'estructura molecular.

## Materials i mètodes

$$2d \sin \phi = n\lambda$$

**Equació 3.** Llei de Bragg.  $d$ : distància de repetició;  $n$ : ordre del pic de difracció;  $\phi$ : angle de dispersió;  $\lambda$ : longitud d'ona de la radiació.

A partir de les expressions anteriors (Eq. 2 i 3) s'extreu la relació entre el mòdul del vector de dispersió i la distància de repetició  $d$  (Equació 4).

$$q_n = \frac{2\pi n}{d}$$

**Equació 4.** Relació entre  $q$  i  $n$ .  $q_n$ : mòdul del vector de dispersió que indica la posició de l' $n$  ordre de reflexió.

La intensitat de la llum dispersada,  $I$ , es representa en funció dels valors de  $q$ , de manera que la funció per a un sistema amb  $N$  partícules segueix l'equació 5.

$$I(q) = I_0 \cdot \sum_{i=1}^N (\Delta\rho_i^2 \cdot V_i^2 \cdot P_i(q))$$

**Equació 5.** Funció de la intensitat de llum dispersada.  $\Delta\rho$ : diferència de densitat electrònica d'una partícula;  $V$ : volum de la partícula;  $P(q)$ : factor de forma de cada partícula.

El tractament de les dades és d'elevada complexitat matemàtica. En aquest sentit, un espectre de SAXS es pot entendre com la Transformada de Fourier de la variació de la densitat electrònica de la mostra amb el temps.

En el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'utilitza SAXS per a l'estudi d'agregats supramoleculars de MTS purs. Les dades de SAXS proporcionen informació sobre les unitats estructurals de la mostra estudiada, informació que combinada amb altres tècniques, com ara, *cryo*-TEM, és de gran interès per determinar la morfologia i l'empaquetament dels agregats en solució.

Els assajos de SAXS es van enregistrar amb radiació convencional emprant l'aparell SAXS/WAXS S3-MICRO (Hecus X-ray Systems, Graz, Àustria) acoblat a una font de rajos X GENIX-Fox 3D (Xenocs, Grenoble, France) del servei SAXS-WAXS de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), amb la col·laboració del Dr. Ramon Pons. La font de radiació s'utilitzà treballant a 50 kV i 1 mA ( $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ ). El rang de treball de  $q$  fou de  $0,1$  a  $6 \text{ nm}^{-1}$ , i la temperatura  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

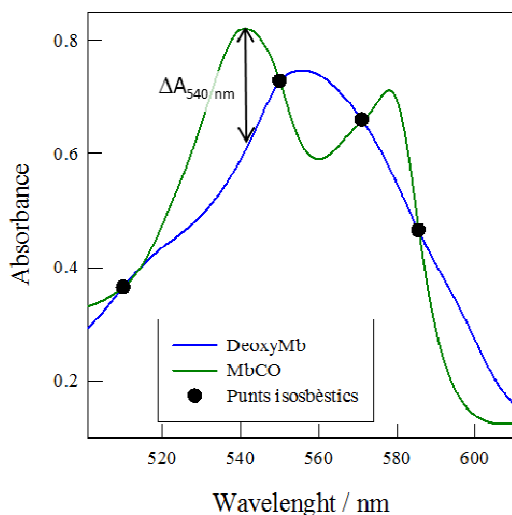
El tractament de les dades consisteix en la construcció d'un model matemàtic de densitat electrònica de l'agregat que tingui en compte un factor de forma de l'agregat i un factor estructural del medi. Posteriorment es compara l'espectre experimental amb el teòric i, si és necessari, es modifiquen els paràmetres del model fins trobar un bon ajust d'ambdues corbes. En el nostre cas les corbes s'ajustaren a models d'intensitat obtinguts tant per models esfèrics com lamel·lars.

### **3.5. MÈTODES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ALLIBERAMENT DE CO**

#### **3.5.1. Determinació de l'alliberament de monòxid de carboni mitjançant l'assaig amb mioglobina**

En un gran nombre de treballs es caracteritza l'alliberament de CO per part dels CORMs mitjançant un assaig amb mioglobina.<sup>83</sup> En ells la detecció del CO alliberat es duu a terme en mesurar espectrofotomètricament la conversió de desoximioglobina (deoxyMb) a carboximioglobina (MbCO). La quantitat d'MbCO formada es quantificarà en mesurar l'absorbància a 540 nm.

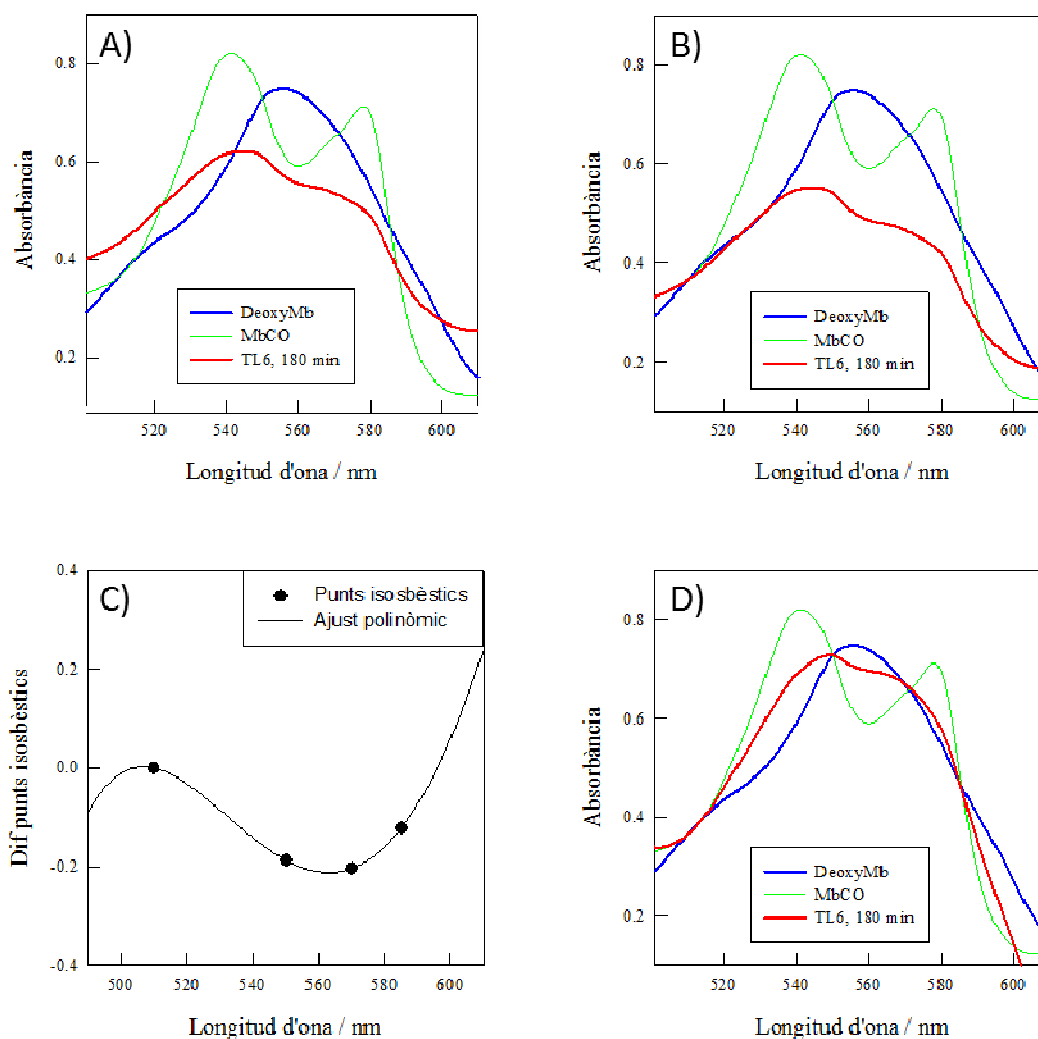
Per fer-ho, es prepara una dissolució de mioglobina 55  $\mu$ M en PBS pH 7,4. Cal tenir en compte que les dissolucions de mioglobina no són estables gaire temps, per tant, es prepara sempre una dissolució fresca just abans de cada experiment. Posteriorment s'hi afegeix ditionit sòdic (concentració final 0,1% en pes) per tal de convertir tota la proteïna a la forma deoxyMb i es bombolleja durant 2 min amb  $N_{2(g)}$ , obtenint-se la solució que serà utilitzada com a referència estàndard de 0 % d'MbCO. La referència 100 % MbCO s'obté bombollejant durant 5 minuts una solució de deoxyMb amb  $CO_{(g)}$  (Figura 26).



**Figura 26.** Espectres UV-VIS de la conversió de Deoxy-Mb a MbCO i localització dels punts isosbèstics. El canvi d'absorbància a 540 nm permet quantificar el CO alliberat pels CORMs.

Per a la determinació de l'alliberament de CO, a 4,5 ml de solució deoxyMb s'afegeix la quantitat necessària de mostra amb el CORM a estudiar, i a la que prèviament s'ha bombollejat  $N_{2(g)}$  per tal d'evitar al màxim la presència d' $O_{2(g)}$  al medi. En el nostre cas la concentració final de CORM emprada va ser de 250  $\mu M$ , i es va evitar afegir-hi més de 100  $\mu l$  de mostra per no diluir significativament la solució de deoxyMb. Feta la mescla, es transvasa ràpidament la solució a una cubeta d'espectrofotòmetre (d'1cm de camí òptic), la qual s'omple totalment, es tapa i es segella amb *parafilm* per evitar l'entrada d' $O_{2(g)}$ . Tot seguit es procedeix a la seva caracterització espectrofotomètrica a una temperatura constant de 37°C. La captació de CO per part de la deoxyMb fa que el pic màxim d'absorció a 560 nm desaparegui progressivament, donant lloc a dos nous màxims, a 540 i 578 nm, corresponents a MbCO (Figura 26).

Aquest procediment, en principi, hauria de ser suficient per determinar directament a partir dels espectres obtinguts la quantitat de MbCO formada, i per tant l'alliberament de  $CO_{(g)}$ . No obstant, altres factors, com l'absorbància pròpia del CORM o la terbolesa que aquest pugui provocar a la mostra, poden interferir a l'hora de fer una estimació acurada de la quantitat d'MbCO real. Per solucionar aquest problema s'aplica un minuciós tractament matemàtic als espectres tenint en compte que, en tot moment, la mostra hauria de presentar els punts isosbèstics indicats anteriorment per a la conversió  $deoxyMb \rightarrow MbCO$ .<sup>121</sup>



**Figura 27.** Representació del tractament matemàtic realitzat als espectres enregistrats durant la determinació de l'alliberament de CO mitjançant l'assaig amb mioglobina. A) Espectre inicial; B) Espectre ajustat al punt isobèstic a 510 nm; C) Corba d'ajust per a la resta de punts isobèstics i D) Espectre corregit.

A partir dels espectres experimentals (Figura 27 A)) s'ajusta el valor d'absorbància de la mostra a 510 nm al de la intersecció de les solucions estàndard de deoxyMb i MbCO (punt isobèstic) (Figura 27 B)). Tot seguit es calcula la diferència entre l'absorbància de la mostra a les longituds d'ona dels altres punts isobèstics i les corresponents absorbàncies dels estàndards. Les diferències així obtingudes es representen en funció de la longitud d'ona i es fa una regressió no lineal que ajusti un polinomi als punts (ajust realitzat amb el programa *Sigma Plot*) (Figura 27 C)). El millor ajust correspon a un polinomi invers de tercer grau i és aquesta corba la que es sostrau de l'espectre de la mostra, obtenint-se l'espectre corregit (Figura 27 D)). Aquest procés es repeteix per



## Materials i mètodes

cadascun dels espectres enregistrats, de manera que als espectres corregits es determina el valor d'absorbància (corregida) a 540 nm, que permet quantificar l'MbCO.

Per fer la quantificació indicada, en primer lloc cal saber la puresa de la Mb comercial, per la qual cosa es mesura l'absorbància a 540 nm de la solució de referència d'MbCO descrita anteriorment (que té una concentració teòrica de 55  $\mu\text{M}$ ), i a partir del seu coeficient d'extinció molar ( $\epsilon = 15,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) s'obté la concentració real (Equació 6):

$$[\text{MbCO}]_{\text{real}} = \left( \frac{A_{540}}{\epsilon} \right) \cdot 1000$$

**Equació 6.** Càlcul de la concentració d'Mb en una solució saturada de MbCO.  $\epsilon$ : coeficient d'extinció molar d'MbCO;  $A_{540}$ : absorbància d'MbCO a 540 nm.

Finalment, les concentracions intermèdies d'MbCO es calculen a partir del canvi d'absorbància a 540 nm (Figura 26), pel que és necessari calcular un coeficient d'extinció molar aparent ( $\epsilon_2$ ) a partir del canvi d'absorbància a 540 nm dels estàndards ( $\Delta A_{540}$ ) (Equació 7). Amb el nou coeficient d'extinció molar aparent i a partir dels canvis a 540 es poden calcular els valors de MbCO a partir de l'equació 8 que es representen en funció del temps.

$$\epsilon_2 = \frac{\Delta A_{540}}{[\text{MbCO}]_{\text{real}}} \cdot 1000$$

**Equació 7.** Equació per al càlcul del nou coeficient d'extinció molar d'MbCO ( $\epsilon_2$ ).  $\Delta A_{540}$ : canvi d'absorbància a 540 nm entre els estàndards.

$$[\text{MbCO}] = \frac{\Delta A_{M540}}{\epsilon_2} \cdot 1000$$

**Equació 8.** Equació per determinar la concentració d'MbCO a cada espectre corregit.  $\Delta A_{M540}$ : canvi d'absorbància a 540 nm respecte el de la deoxyMb.  $\epsilon_2$ : coeficient d'extinció molar aparent.

### 3.5.2. Determinació de l'alliberament de CO mitjançant FTIR

L'alliberament de CO per part dels MTS en ser irradiats amb llum UV o llum visible s'estudia mitjançant FTIR seguint dues aproximacions diferents. D'una banda,

s'analitzen els canvis als espectres dels MTS al llarg del temps i d'altra banda, s'enregistren espectres a la fase gasosa per tal de detectar el monòxid de carboni alliberat en aquest procés.

El procés d'irradiació es duu a terme en cubetes de quars on es disposen les mostres i són irradiades amb llum UV. En el cas de l'UVA s'utilitza una làmpada Spectroline de 4 W (màxima intensitat de longitud d'ona a 365 nm) mentre les mostres es mantenen a una distància aproximada de 8 cm. Per al visible es treballa amb una làmpada halògena (Seon) fent servir un filtre Wratten 2B per eliminar qualsevol radiació UV residual. En aquest darrer cas, les mostres es col·loquen a una distància tal que la intensitat lumínica sigui de 1000 lux (aproximadament entre 6-10 cm).

L'espectroscòpia FTIR permet observar els canvis a les bandes vibracionals dels grups carbonils dels MTS en el cas en que es produeixi l'alliberament de monòxid de carboni. Així doncs, es preparen sistemes mixtes SPC/MTS amb concentració final de complex 10 mM, les quals són irradiades durant 5 hores amb llum UVA o visible. A determinats temps es prenen dues alíquotes. Una d'elles, de 25 µl i sense cap altre tractament, s'asseca al buit sobre una finestra de CaF<sub>2</sub> de 0,5 cm d'espessor, fins a obtenir-se una pel·lícula fina que és analitzada posteriorment amb FT-IR (alternativament les alíquotes es poden congelar fins a la seva anàlisi). La segona alíquota es dilueix amb aigua fins a una concentració de 10 µM de complex per tal d'enregistrar l'espectre UV-VIS al moment.

Pel que fa a la detecció del monòxid de carboni en fase gasosa, els espectres s'enregistren fent servir un adaptador *Perkin Elmer* amb finestres de CaF<sub>2</sub> i un espaiador de tefló d'1cm de gruix. La cel·la, de 3,2 ml de volum, s'omple fins aproximadament un 30 % de la seva capacitat i es col·loca en vertical, de manera que el feix d'IR passa per la part buida, analitzant-se únicament la composició de la fase gasosa en contacte amb la mostra líquida. En tots els casos, per obtenir els espectres s'acumulen 50 *scans* a 4 cm<sup>-1</sup> de resolució, mantenint-se l'aparell amb una purga constant d'aire sec. Posteriorment, els espectres són tractats matemàticament per corregir la línia base i restar el vapor d'aigua.

### **3.6. CULTIUS CEL·LULARS**

Una de les característiques principals dels MTS estudiats en aquest treball és la seva possibilitat de ser emprats com a CORMs. Així, doncs, la seva interacció amb sistemes biològics i els seus efectes sobre ells són aspectes importants a tenir en compte. Donat que els MTS són complexos metàl·lics, és necessari avaluar la seva toxicitat, tot i que el molibdè, en ser un element essencial des del punt de vista biològic i pel fet d'eliminar-se amb facilitat per l'orina,<sup>122</sup> no és considerat com un dels metalls més tòxics per als humans.

Amb aquesta finalitat es van portar a terme dos assajos amb cultius cel·lulars de fibroblasts dèrmics humans amb MTS purs o sistemes mixtes SPC/MTS: un amb XTT per a determinar la seva toxicitat, i un altre adreçat a la possible detecció de canvis en la composició de les cèl·lules mitjançant micro-FTIR.

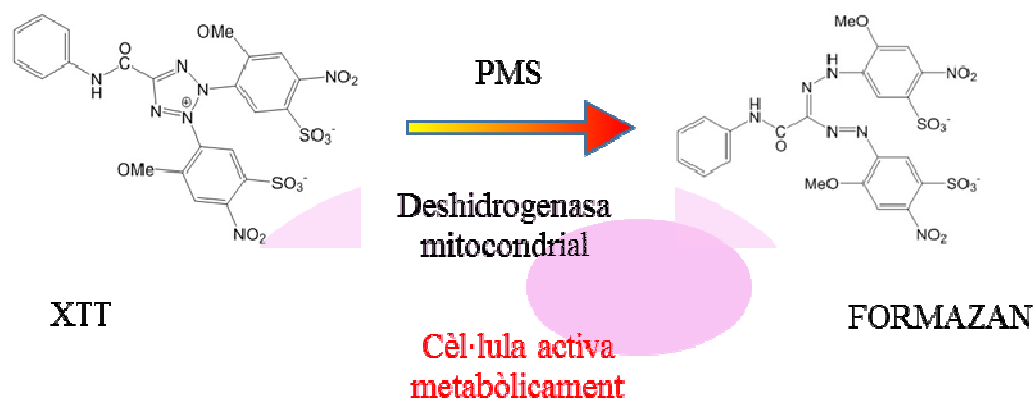
Tots els experiments amb cultius cel·lulars es van dur a terme en col·laboració amb la Dra. Mercedes Camacho del Laboratori d'Angiologia, Biologia Vascular i Inflamació, de l'Institut de Recerca Biomèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, a Barcelona.

#### **3.6.1. Preparació dels cultius cel·lulars**

Els cultius cel·lulars de fibroblasts es fan créixer en flascons de 75 cm<sup>2</sup> en un incubador a 37°C amb un 5% de CO<sub>2</sub>, en medi DMEM amb un 10% de SBF, 1 mM de piruvat, 2 mM de glutamina, 100 U/ml penicil·lina i 100 M/ml estreptomina (medi de creixement). El medi es canvia tres cops per setmana. Un cop assolida la confluència les cèl·lules es tripsinitzen i es sembren per fer els experiments. Es treu el medi del flascó i es renten amb PBS estèril, s'afegeix 1ml de tripsina 0,25% v/v EDTA 0,025% i es deixa a l'incubador a 37°C aproximadament 5 minuts, fins que les cèl·lules ja no es troben adherides a la base del flascó. Llavors s'afegeix medi de creixement temperat, les cèl·lules es resuspenen, es contenen mitjançant una cambra de Neubauer i es dilueixen a la concentració desitjada de sembra per l'experiment que es vol dur a terme.

### 3.6.2. Determinació de la toxicitat dels sistemes SPC/MTS en cultius cel·lulars (assaig amb XTT)

L'XTT (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetraazo-5-carboxanilida) és un reactiu que s'emptra per a determinar la viabilitat cel·lular mitjançant el potencial redox. Les cèl·lules actives metabòlicament són capaces de reduir la solució groga d'XTT formant Formazan, un compost taronja soluble en aigua (Figura 28). L'XTT és reduït a Formazan pel sistema succinat deshidrogenasa de la cadena respiratòria mitocondrial. Només les cèl·lules vives que posseeixin una membrana mitocondrial intacta, així com una membrana cel·lular intacta, tindran actiu aquest enzim. La reacció requereix la presència d'un reactiu d'acoblament electrònic (metilsulfat de fenazina (PMS)) que fa d'intermediari acceptor d'electrons (s'afegeixen 100µl de reactiu d'acoblament electrònic per cada 5 ml d'XTT). Per tant, l'assaig amb XTT permet una anàlisi quantitativa de la viabilitat cel·lular i, en conseqüència, de la toxicitat dels compostos amb un simple assaig colorimètric.



**Figura 28.** Conversió d'XTT a Formazan per les cèl·lules actives metabòlicament.

Per realitzar-lo, se sembren en plaques de 96 pous 100 µl de suspensió cel·lular (obtinguda segons es descriu a l'apartat 3.6.1) a la concentració de  $7,5 \cdot 10^4$  cel/ml en medi 10 % SBF. Un cop s'arriba a la confluència es canvia el medi a medi 1% SBF i es mantenen les cèl·lules durant 24 h. Passat aquest temps les cèl·lules s'incuben durant 24 h en presència de concentracions creixents de sistemes purs d'MTS o mixtes SPC/MTS dissolts en medi de cultiu cel·lular a l'1 % SBF. Després s'aspira el medi, es renten les

## *Materials i mètodes*

cèl·lules amb 100 µl de PBS, s'afegeixen 100 ml de medi a l'1 % SBF i 50 µl de la mescla de reactiu XTT. S'incuba durant 4 h a 37°C i es llegeix l'absorbància de la placa a 450 nm amb un espectrofotòmetre. Els valors d'absorbància resultants es comparen amb els obtinguts per cèl·lules a les que no se'ls ha aplicat cap tractament.

### **3.6.3. Preparació de cultius cel·lulars fixats per a estudis de microscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (µ-FTIR)**

Mitjançant l'espectroscòpia µ-FTIR s'estudia l'efecte del tractament de cultius cel·lulars amb sistemes mixtes PC/MTS de la família L2. L'efecte es quantifica a través de l'anàlisi per PCA (*Principal Component Analysis*) de les bandes típiques de l'estructura del cos cel·lular. Al mateix temps, es determina si es produeix la internalització dels sistemes mixtes a les cèl·lules a través de les bandes dels grups carbonils dels complexos.

Se sembren 500 µl de cèl·lules (obtingudes segons es descriu a l'apartat 3.6.1.) a una concentració de  $8 \cdot 10^4$  cel/ml, sobre finestres d'infraroig de CaF<sub>2</sub>, transparents a l'IR, col·locades a l'interior de plaques de 24 pous. Quan s'arriba a la confluència s'incuben amb diferents formulacions (metal·losomes o nanoagregats PC/MTS) durant 12 h a l'estufa de cultius. Passat aquest temps, s'extreu el medi, les cèl·lules es renten amb 0,5 ml de PBS i es fixen deixant actuar durant 30 minuts una solució de Formalina (Formalin solution, neutral buffered, 10%) que conté aproximadament un 4% de formaldehid. S'extreu la solució fixadora, les finestres es renten un parell de vegades amb aigua destil·lada i finalment es deixen assecar per a la seva anàlisi posterior mitjançant micro-FTIR.

## **4. RESULTATS**

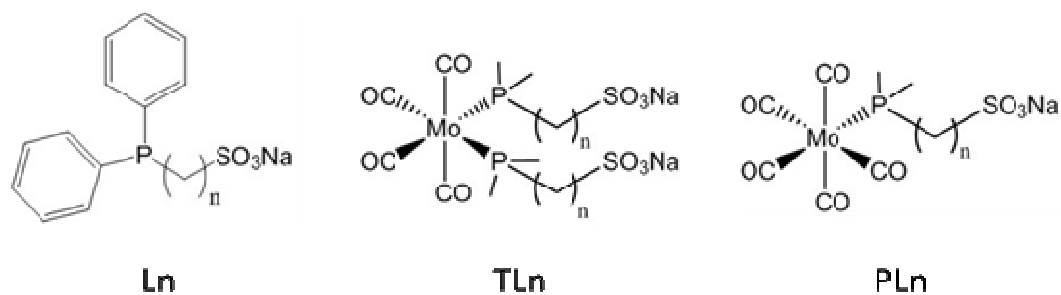
### **4.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPOSTOS**

En aquest apartat es descriu la síntesi i caracterització de les fosfines i dels complexos de coordinació que s'estudien en aquesta Tesi Doctoral. La idea principal és obtenir una família de lligands fosfina amb propietats tensioactives per després coordinar-los a un centre metàl·lic de molibdè amb grups carbonils amb la finalitat d'obtenir complexos organometàl·lics amb propietats tensioactives i que alhora puguin actuar com a molècules alliberadores de monòxid de carboni.

Amb aquesta premissa, és necessari que l'estructura dels lligands presenti una part hidrofílica i una part hidrofòbica, i que a més sigui soluble en aigua atès que volem estudiar fenòmens d'agregació de sistemes mixtes de fosfolípids tant amb els lligands com amb els complexos de coordinació que d'aquests se'n deriven.

Per aquest motiu, s'ha escollit com a lligands una família de tres membres de difenilfosfines amb diferent longitud de la cadena alquílica, amb un grup sulfonat a l'extrem oposat de l'àtom de fòsfor, obtenint d'aquesta manera molècules amfifíliques. La Figura 29 mostra l'estructura dels lligands i els complexos de molibdè objecte d'estudi d'aquest treball. La síntesis d'aquests compostos i l'estudi de les seves propietats d'agregació es troben perfectament descrits en una tesi doctoral realitzada amb anterioritat en el nostre grup de recerca i en les publicacions associades.<sup>123, 124, 46</sup> Ara bé, els estudis en l'esmentat treball es varen realitzar a partir de l'obtenció de desenes de mil·ligrams dels diferents productes. Per a la realització de la present Tesi Doctoral, ha calgut preparar els diferents compostos a l'escala d'uns pocs grams. Aquesta diferència d'escala ha obligat a modificar molts dels procediments sintètics emprats i, en alguns casos, fins i tot a dissenyar mètodes de síntesis alternatius.

## Resultats

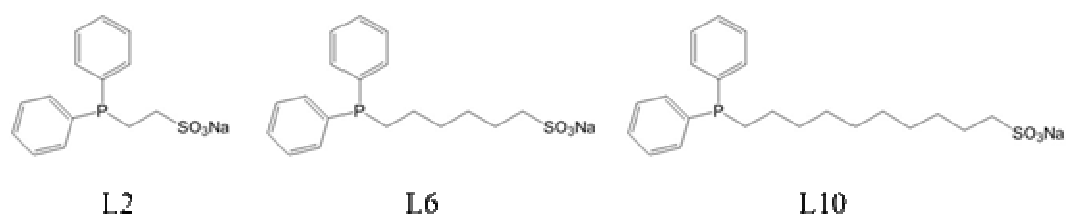


**Figura 29.** Representació esquemàtica de les fosfines i dels complexos organometàl·lics de molibdè ( $n= 2, 6$  i  $10$ ).

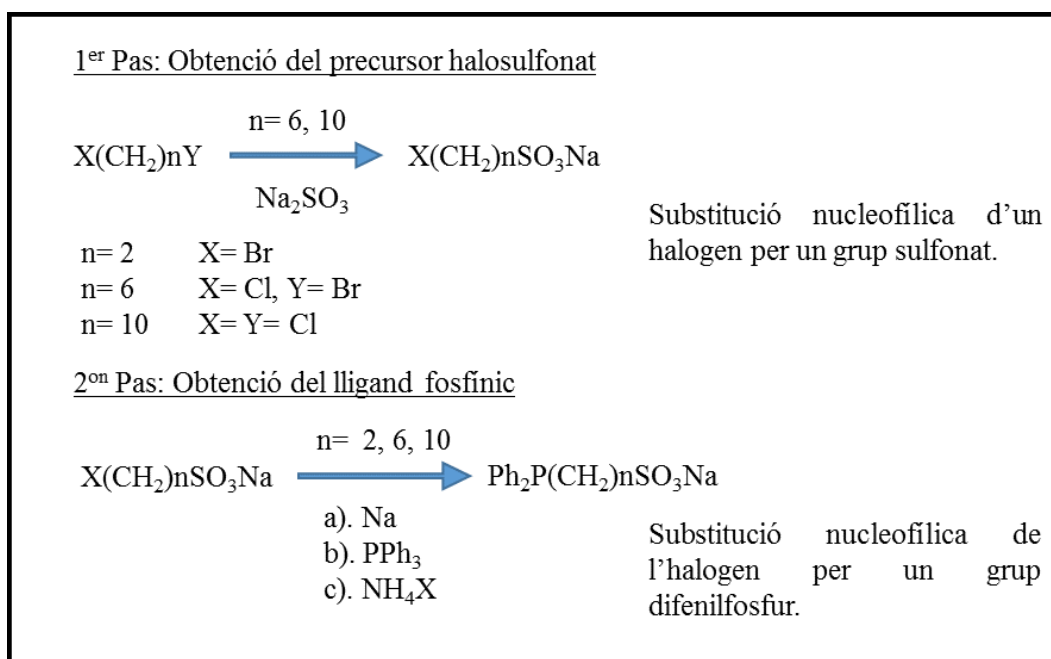
### 4.1.1. LLIGANDS FOSFINA

#### 4.1.1.1. RUTA SINTÈTICA PER A LA PREPARACIÓ DE LLIGANDS

Les tres fosfines ( $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $n= 2, 6$  i  $10$ ), esquematitzades a la Figura 30, comparteixen la mateixa ruta sintètica (Esquema 1). No obstant, les seves síntesis presenten certes diferències donat que no és possible trobar, a nivell comercial, alguns dels productes de partida, de manera que és necessari sintetitzar-los.



**Figura 30.** Representació esquemàtica de la família de lligands fosfínics,  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$  ( $n= 2, 6$  i  $10$ ).



**Esquema 1.** Ruta sintètica per a la preparació dels lligands fosfínics,  $\text{Ph}_2\text{P(CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$  ( $n= 2, 6$  i  $10$ ).

Per a la síntesi de la fosfina de cadena més curta el precursor halosulfonat  $\text{Br(CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$  és comercial i fàcil d'obtenir, mentre que per les fosfines de cadena més llarga aquest precursor es sintetitza partint d'un compost tipus  $\text{X(CH}_2)_n\text{Y}$  ( $\text{X, Y=}$  grups halògens). Amb la finalitat de fer el primer pas de la reacció més selectiu és preferible que els dos halògens siguin diferents, de manera que la diferencia de labilitat eviti la formació del producte disulfonat. No obstant, per a la síntesi de la fosfina L10 no és possible trobar comercialment un precursor amb els grups halògens diferents per lo que cal considerar aquest aspecte i modificar lleugerament el procés per evitar subproductes no desitjats.



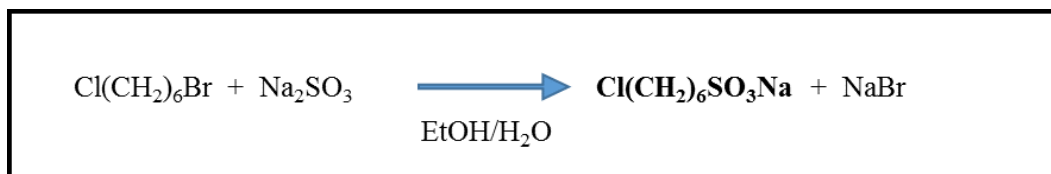
## Resultats

### 4.1.1.2. PRECURSORS HALOSULFONATS

#### 4.1.1.2.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DEL PRECURSOR HALOSULFONAT L6

- **Procediment sintètic**

La via sintètica per a la preparació del precursor halosulfonat L6 es descriu al següent esquema:



**Esquema 2.** Via sintètica per a la preparació del precursor halosulfonat L6

Donat que en aquest procés el producte de partida té els dos grups halògens diferents, la síntesi del precursor halosulfonat L6 no presenta grans dificultats. La síntesis es porta a terme mitjançant el procediment descrit en treballs anteriors.<sup>123</sup> El producte desitjat s'obté amb una petita proporció de compost disulfonat i sal de brom que es poden eliminar amb facilitat recristal·litzant el cru de reacció amb etanol bullent.

La integració dels senyals dels espectres <sup>1</sup>H-RMN, abans i després de la recristal·lització (Figura 32 i 33, respectivament), ens permeten quantificar la proporció de producte disulfonat a cada moment. En aquests espectres es detecta la presència d'un triplet a 3.62 ppm que correspon als protons del metilè units a l'àtom de clor (-CH<sub>2</sub>Cl) i un multiplet entre 2.88-2.82 ppm corresponent als protons del metilè units al grup sulfonat (-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). La integració dels senyals del producte del cru de reacció indica una proporció aproximada de 10:1.2 de producte monosulfonat/producte disulfonat. Però tal i com es pot veure a l'espectre després de recristal·litzar aquesta impuresa s'elimina totalment, obtenint el producte desitjat amb un rendiment del 65 %.

- **Caracterització**

#### **Anàlisi elemental**

Anàlisi elemental del precursor Cl(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>SO<sub>3</sub>Na

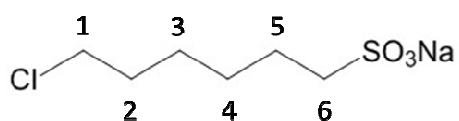
Fórmula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>ClNaO<sub>3</sub>S

Teòric (%): C, 32,36; H, 5,43; S, 14,40.

Experimental (%): C, 31,03; H, 5,28; S, 13,77.

### Ressonància magnètica nuclear

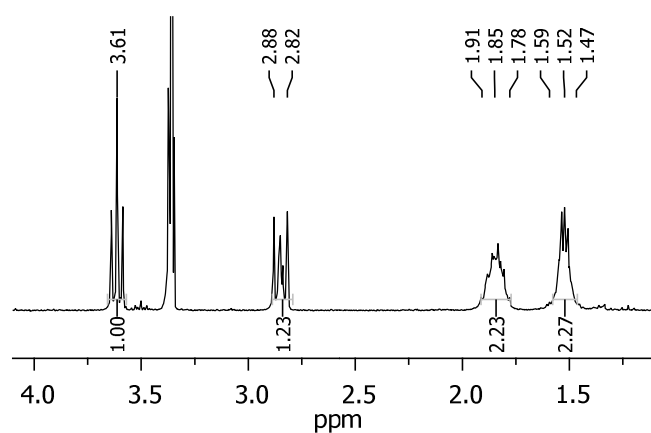
A la Taula 2 es mostra l'assignació dels pics i els desplaçaments químics de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del precursor  $\text{Cl}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$  (Figura 31) en metanol- $d_4$ . Les Figures 32 i 33 mostren, respectivament, els espectres abans i després de recristal·litzar.



**Figura 31.** Representació esquemàtica del precursor L6

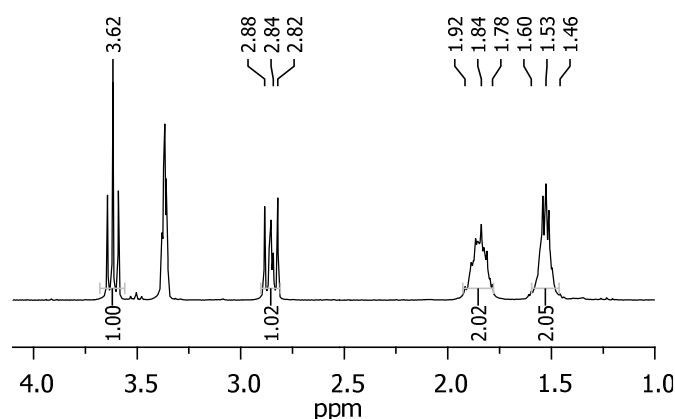
Assignació	$\delta$ (ppm)	Integració
1	3.62 (t)	2H
6	2.88-2.82 (m)	2H
2,5	1.92-1.78 (m)	4H
3,4	1.60-1.44 (m)	4H

**Taula 2.**  $^1\text{H}$ -RMN del precursor L6 en metanol- $d_4$ . Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.



**Figura 32.** Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del precursor L6 en metanol- $d_4$  abans de recristal·litzar.

## Resultats

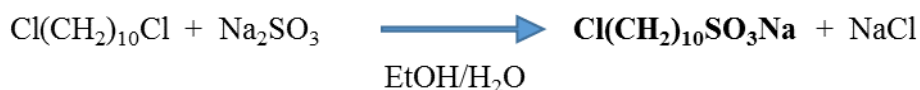


**Figura 33.** Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del precursor L6 en metanol-d4 recristal·litzat

### 4.1.1.2.2. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DEL PRECURSOR HALOSULFONAT L10.

- **Procediment sintètic**

La preparació del precursor halosulfonat L10 (Esquema 3) es porta a terme partint d'un compost amb els dos grups halògens idèntics,  $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{Cl}$ . Es tria aquest compost i no seu homòleg amb àtoms de brom per tal que la menor labilitat de l'enllaç carboni-clor en front de carboni-brom alenteixi les velocitats de reacció evitant la reacció d'hidròlisi que portaria a la formació de l'alcohol  $\text{HO}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$ , el qual no és fàcil separar del producte.<sup>123</sup>



**Esquema 3.** Via sintètica per a la preparació del precursor halosulfonat L6

Donat que els dos halògens del producte de partida són iguals cal prendre certes mesures a fi d'evitar la formació del producte disulfonat. A més, per tal de millorar el rendiment i evitar la presència de producte disulfonat, el procediment sintètic es modifica respecte el descrit als treballs anteriors. La reacció es duu a terme amb un gran excés de 1,10-diclorodecà sobre el sulfit sòdic (aproximadament 10:1), amb un volum major de dissolvent orgànic que en el cas del precursor L6, i afegint el sulfit sòdic

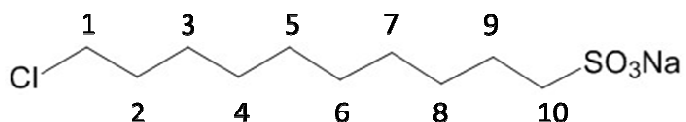
molt lentament, durant 4h. La reacció s'atura a les 8h tot i que no és completa, però és necessari finalitzar en aquest punt per evitar la formació de l'alcohol.

En augmentar el volum de dissolvent orgànic s'aconsegueix que gran part del producte monosulfonat desitjat quedi a la fase orgànica essent aïllat pur de la solució evaporant la solució, filtrant i rentant amb èter dietílic, alhora que és possible recuperar el reactiu de partida  $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{Cl}$ . El rendiment es pot augmentar recristal·litzant en etanol bullent, per fraccions, el producte obtingut en evaporar la fase aquosa, el qual és format per  $\text{NaCl}$  i una mescla de producte monosulfonat, producte disulfonat en una proporció 10:12.5, com es pot veure a l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 35). Finalment, s'obté el producte amb un rendiment del 62 %.

- **Caracterització**

### Ressonància magnètica nuclear

A la Taula 3 es mostra l'assignació dels pics i els desplaçaments químics de l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del precursor  $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$  (Figura 34) en metanol- $d_4$ . Les figures 35 i 36 mostren, respectivament, els espectres abans i després de recristal·litzar.

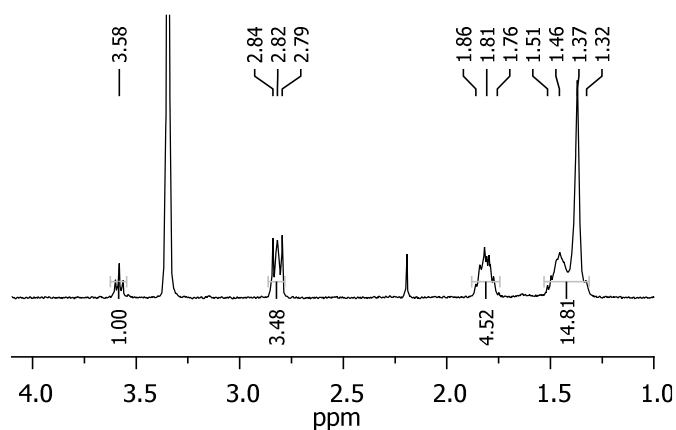


**Figura 34.** Representació esquemàtica del precursor L10

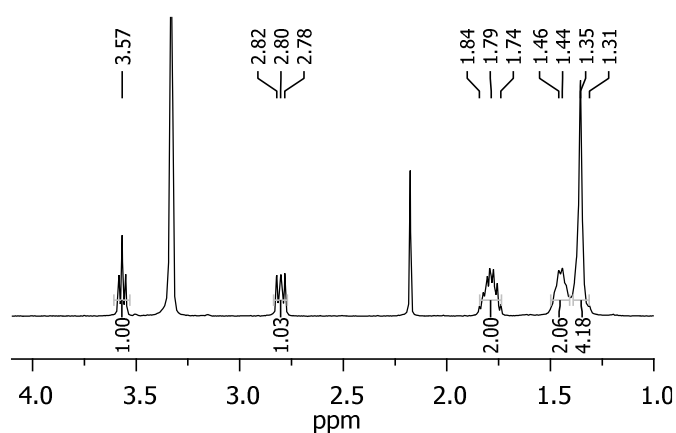
Assignació	$\delta$ (ppm)	Integració
1	3.58 (t)	2H
10	2.84-2.79 (m)	2H
2,9	1.86-1.76 (m)	4H
3,8	1.51-1.40 (m)	4H
4-7	1.40-1.32 (m)	8H

**Taula 3.**  $^1\text{H}$ -RMN del precursor L10 en metanol- $d_4$ . Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

## Resultats



**Figura 35.** Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del precursor L10 en metanol-d<sub>4</sub> abans de recristal·litzar.

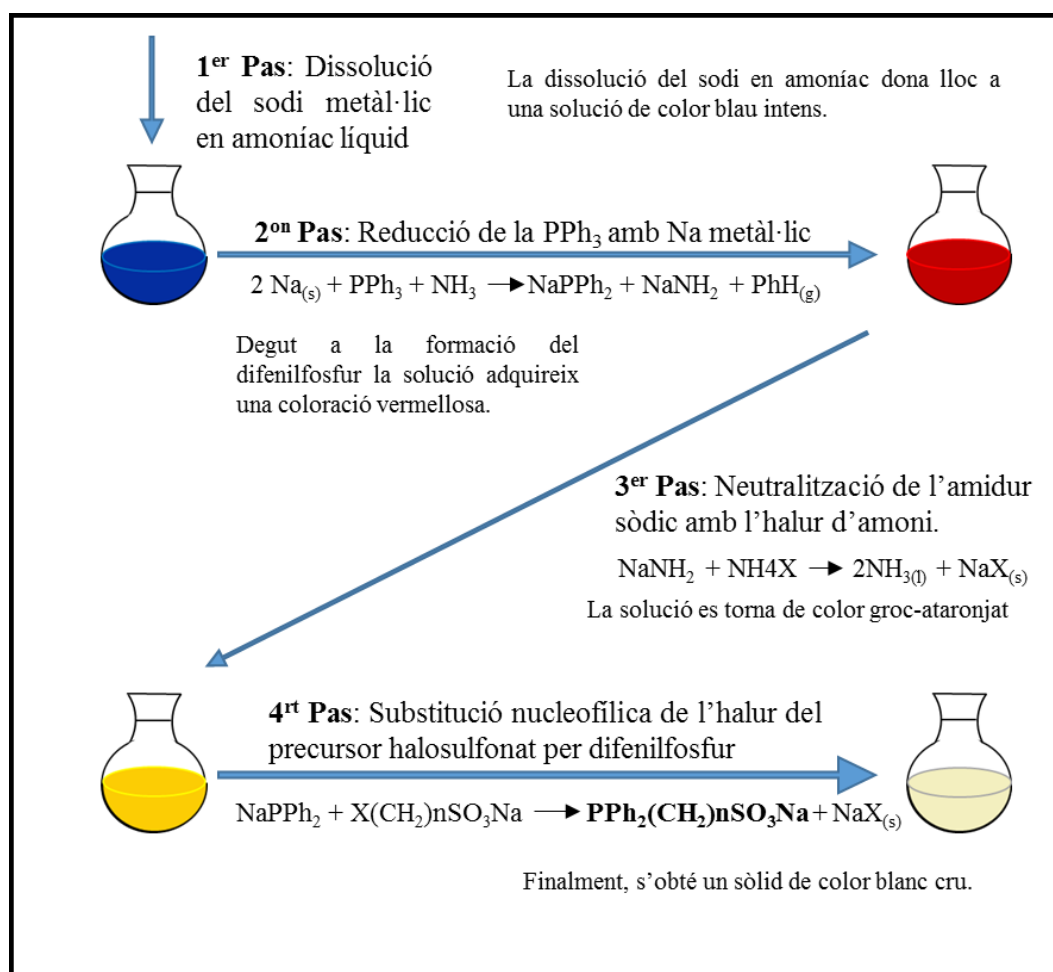


**Figura 36.** Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del precursor L10 en metanol-d<sub>4</sub> recristal·litzat.

### 4.1.1.3. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DELS LLIGANDS FOSFINA (Ln)

- **Procediment sintètic**

La síntesi dels lligands fosfina es duu a terme en medi amoniacal i sota atmosfera inert de nitrogen en un bany criogènic a -78 °C, seguint la ruta sintètica detallada a l'esquema 4. La baixa temperatura és necessària per poder treballar amb amoníac líquid i controlar la reacció que és molt exotèrmica.



**Esquema 4.** Ruta sintètica per a la preparació dels lligands fosfínics ( $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ ,  $n = 2, 6$  i  $10$ ).

En l'esquema anterior es pot veure com en un primer pas el sodi metàl·lic redueix la trifenilfosfina a difenilfosfur i l'amoniac a amidur. Seguidament, s'elimina aquest últim per reacció amb un halur d'amoni i s'afegeix el precursor halosulfonat, el qual dona lloc al lligand fosfina en reaccionar amb el difenilfosfur del medi. La manipulació del sodi a l'inici de la reacció és un procés a tenir en compte, cal evitar al màxim la seva oxidació. Aquest pas és tant important perquè si s'afegeix defecte de sodi, podria quedar trifenilfosfina sense reduir al medi donant lloc a subproductes no desitjats. Un altre factor a tenir en compte és la necessitat d'assecar bé tots els reactius, l'aigua protonaria l'anió difenilfosfur donant lloc a difenilfosfina ( $\text{HPPH}_2$ ).

Finalitzada aquesta ruta de síntesi, l'excés de difenilfosfur s'elimina del medi per protonació amb aigua i extracció amb èter dietílic i s'obté una mescla de lligand fosfínic

## Resultats

i sal de sodi. Els lligands  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$  ( $n = 2, 6 \text{ i } 10$ ), s'obtenen per recristal·lització del sòlid obtingut amb metanol tal i com es descriu a l'annex A.. S'obtenen els productes amb els següents rendiments: L6 (74 %) i L10 (66 %).

- **Caracterització**

### Anàlisi elemental

- Anàlisi elemental del lligand  $\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{Na}$

Fórmula:

Teòric (%): C, 53,20; H, 4,50; S, 10,13.

Experimental (%): C, 49,62; H, 4,25; S, 9,76.

- Anàlisi elemental del lligand  $\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$  (+ 5% NaCl)

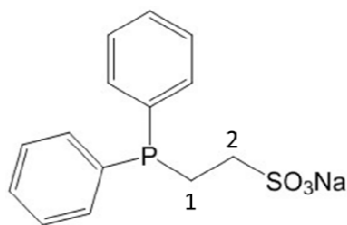
Fórmula:

Teòric (%): C, 55,03; H, 5,64; S, 8,16.

Experimental (%): C, 53,23; H, 5,48; S, 7,93.

### Ressonància magnètica nuclear

L'assignació dels pics dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN de la fosfina L2 (Figura 37) es mostren a les taules 4 i 5 respectivament. Els corresponents espectres es mostren a la Figura 38.



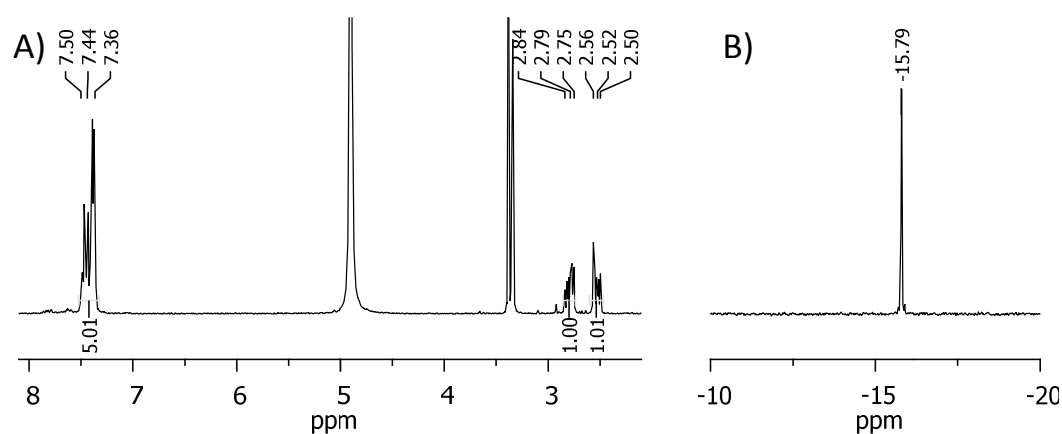
**Figura 37.** Representació esquemàtica de la fosfina L2.

PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.50-7.36 (m)	10H
2	2.84-2.75 (m)	2H
1	2.56-2.50 (m)	2H

Lligand	δ fòsfor (ppm)
PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	-15.8

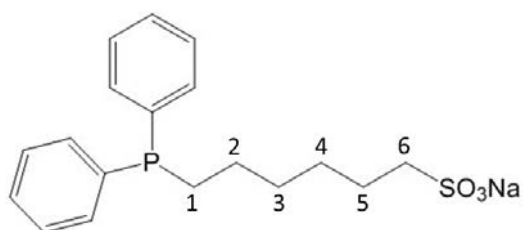
**Taula 4.** <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L2 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

**Taula 5.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L2 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pic i desplaçament químic.



**Figura 38.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L2 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L2 en metanol-d<sub>4</sub>.

Pel que fa a la fosfina L6 (Figura 39), la seva assignació de pics dels espectres de <sup>1</sup>H-RMN i de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN es resumeix a les taules 6 i 7 respectivament. I els corresponents espectres es mostren a la Figura 40.



**Figura 39.** Representació esquemàtica de la fosfina L6.



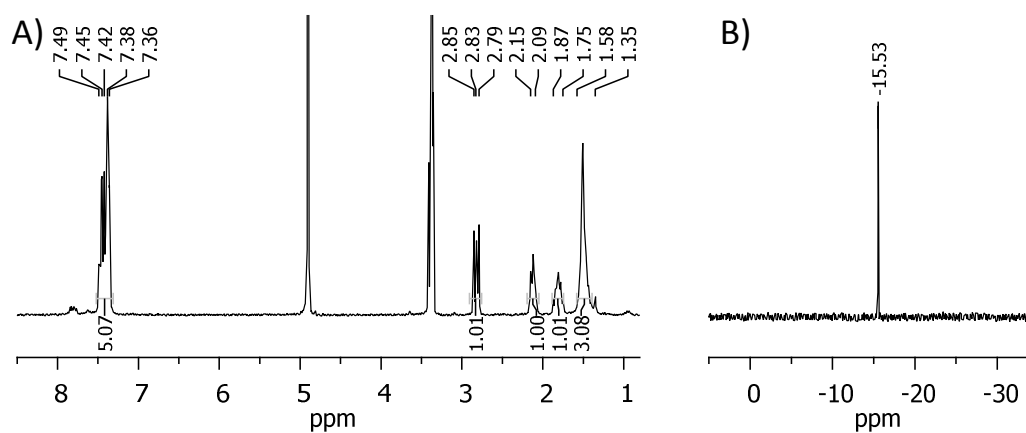
## Resultats

PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> SO <sub>3</sub> Na		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.49-7.36 (m)	10H
6	2.85-2.79 (m)	2H
3	2.15-2.09 (m)	2H
5	1.87-1.75 (m)	2H
1,2,4	1.58-1.35 (m)	6H

**Taula 6.** <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L6 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

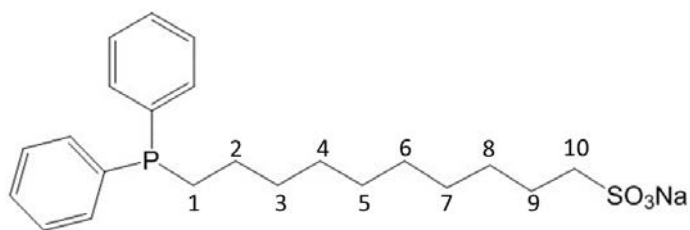
Lligand	δ fòsfor (ppm)
PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> SO <sub>3</sub> Na	-15.5

**Taula 7.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L6 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.



**Figura 40.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L6 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L6 en metanol-d<sub>4</sub>.

L'assignació de pics de la fosfina L10 (Figura 41) es pot veure a les Taules 8 i 9. I a la Figura 42 es mostren els seus espectres de <sup>1</sup>H-RMN i de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN.



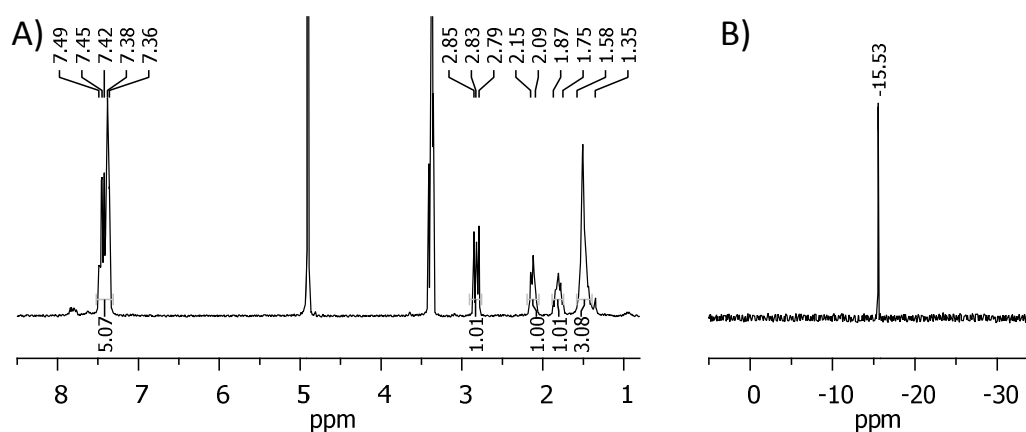
**Figura 41.** Representació esquemàtica de la fosfina L10.

PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> SO <sub>3</sub> Na		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.49-7.26 (m)	10H
10	2.85-2.73 (m)	2H
3	2.11-2.00 (m)	2H
9	1.88-1.71 (m)	2H
1-2, 4-8	1.54-1.19 (m)	14H

**Taula 8.** <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L10 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Lligand	δ fòsfor (ppm)
PPh <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> SO <sub>3</sub> Na	-15.4

**Taula 9.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L10 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.



**Figura 42.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN de la fosfina L10 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN de la fosfina L10 en metanol-d<sub>4</sub>.

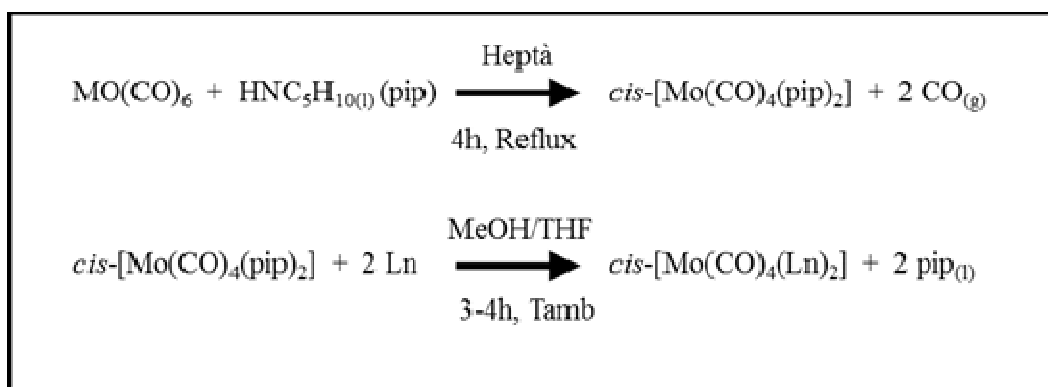
## Resultats

### 4.1.2. COMPLEXOS TL<sub>n</sub> (*cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(Ln)<sub>2</sub>], n= 2, 6 i 10)

#### 4.1.2.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPLEXOS TL<sub>n</sub>.

- **Procediment sintètic**

La ruta sintètica per a la preparació dels complexos organometàl·lics *cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(Ln)<sub>2</sub>] (n= 2, 6 i 10) (Esquema 5) consta de dues etapes. En primer lloc, es duu a terme una substitució nucleofílica de dos carbonils al complex Mo(CO)<sub>6</sub> per grups piperidina, els quals són bescanviats pels lligands fosfina en una segona etapa. Utilitzar compostos carbonílics amb amines com a precursors per a posteriors reaccions de bescanvi és força habitual, donat que són compostos que no presenten gaires complicacions a la seva preparació i les amines són lligands làbils fàcilment bescanviables.



**Esquema 5.** Ruta sintètica per a la preparació dels complexos *cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(Ln)<sub>2</sub>] (n= 2, 6 i 10).

La síntesi del precursor metàl·lic *cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(pip)<sub>2</sub>] a la primera etapa del procés es porta a terme segons el procediment descrit a la bibliografia.<sup>123</sup> Pel que fa al segon pas, el bescanvi de piperidina pel lligand fosfínic és duu a terme en medi MeOH/THF per assegurar la solubilitat de dos productes de partida, a temperatura ambient i resguardat de la llum donat que el producte de reacció és fotosensible. Per al complex TL<sub>2</sub>, tres hores de reacció és temps suficient, no obstant, a la síntesi del complex TL<sub>6</sub> s'observa mitjançant <sup>1</sup>H-RMN que passat aquest temps encara es detecta fosfina lliure sense coordinar, de manera que per a la síntesi dels complexos de cadena més llarga s'augmenta el temps de reacció a 4h. Seguint el procediment descrit s'obtenen els tres complexos amb bons rendiments: TL<sub>2</sub>, 84 %; TL<sub>6</sub>, 82 % i TL<sub>10</sub>, 77 %.

- **Caracterització**

**Anàlisi elemental**

- Anàlisi elemental del complex *cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(L2)<sub>2</sub>].

Fórmula:

Teòric (%): C, 45,60; H, 3,30; S, 7,60.

Experimental (%): C, 42,69; H, 3,66; S, 6,52.

- Anàlisi elemental del complex *cis*-[Mo(CO)<sub>4</sub>(L6)<sub>2</sub>].

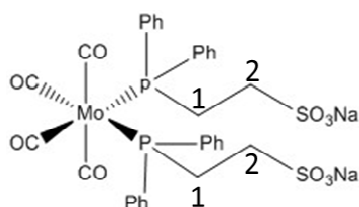
Fórmula:

Teòric (%): C, 45,7; H, 3,36; S, 7,63.

Experimental (%): C, 45,47; H, 3,14; S, 7,36.

**Ressonància magnètica nuclear.**

L'assignació dels pics dels espectres de <sup>1</sup>H-RMN i de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL2 (Figura 43) es mostren a les taules 10 i 11 respectivament. Els corresponents espectres es mostren a la Figura 44.



**Figura 43.** Representació esquemàtica del complex TL2.

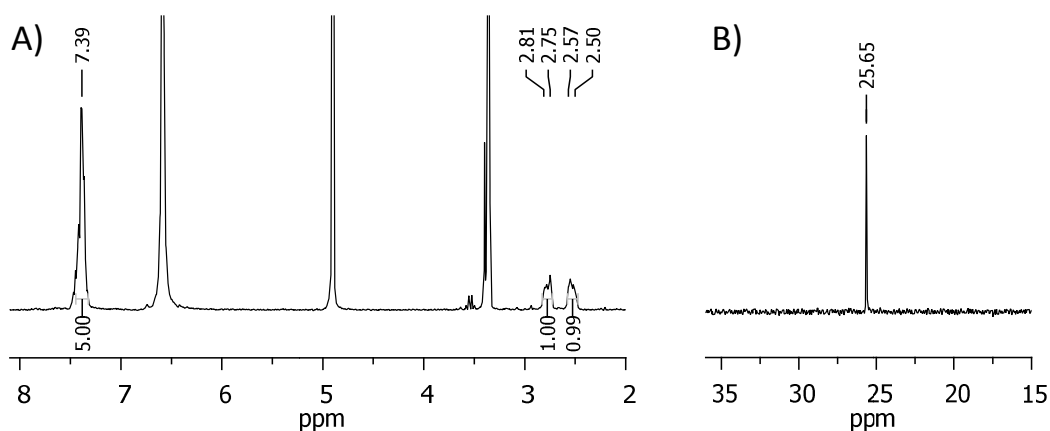
<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L2) <sub>2</sub> ]		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.50-7.33 (m)	20H
2	2.84-2.72 (m)	4H
1	2.58-2.46 (m)	4H

**Taula 10.** <sup>1</sup>H-RMN del complex TL2 en metanol-d4. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Complex	δ fòsfor (ppm)
<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L2) <sub>2</sub> ]	25.6

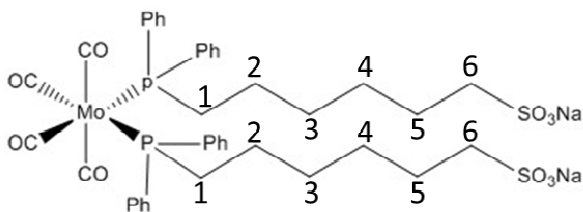
**Taula 11.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL2 en metanol-d4. Assignació de pics i desplaçament químic.

## Resultats



**Figura 44.** A) Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del complex TL2 en metanol-d4. B) Espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex TL2 en metanol-d4.

Pel que fa al complex TL6 (Figura 45), l'assignació dels pics dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN es resumeix a les taules 12 i 13 respectivament. I els corresponents espectres es mostren a la Figura 46.



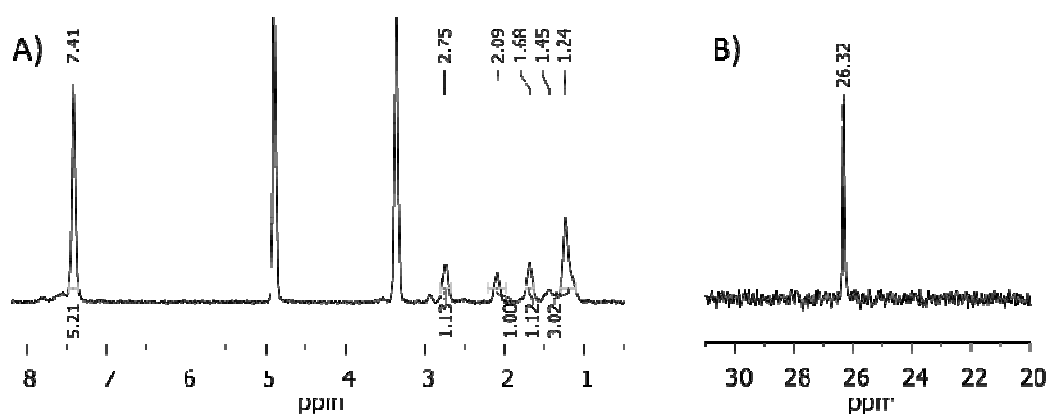
**Figura 45.** Representació esquemàtica del complex TL6.

<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L6) <sub>2</sub> ]		
Assignació	$\delta$ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.56-7.33 (m)	20H
6	2.80-2.68 (m)	4H
1	2.18-2.02 (m)	4H
5	1.71-1.59 (m)	4H
2-4	1.33-1.04 (m)	12H

**Taula 12.**  $^1\text{H}$ -RMN del complex TL6 en metanol-d4. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

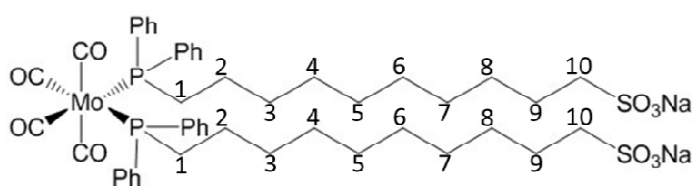
Complex	$\delta_{\text{fòsfor}}$ (ppm)
<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L6) <sub>2</sub> ]	26.3

**Taula 13.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL6 en metanol-d4. Assignació de pics i desplaçament químic.



**Figura 46.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del complex TL6 en metanol-d4. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL6 en metanol-d4.

L'assignació de pics del complex TL10 (Figura 47) es pot veure a les taules 14 i 15. I a la Figura 48 es mostren els seus espectres de <sup>1</sup>H-RMN i de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN.



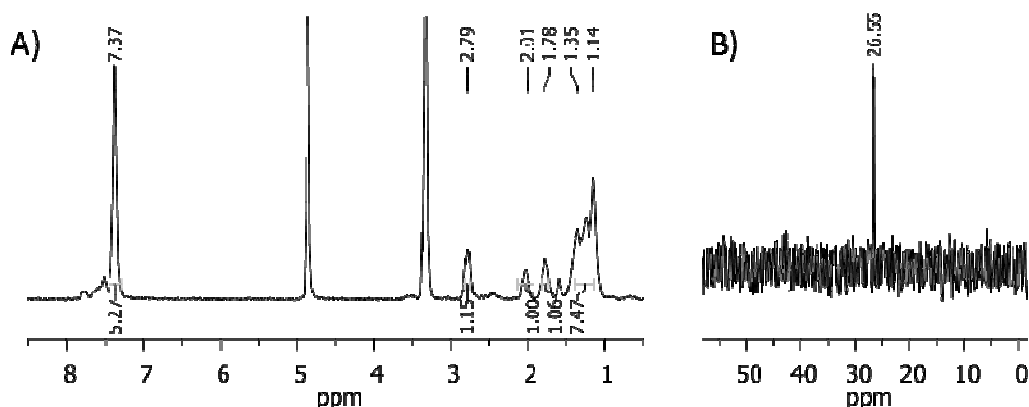
**Figura 47.** Representació esquemàtica del complex TL10.

<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L10) <sub>2</sub> ]		
Assignació	$\delta$ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.48-7.28 (m)	20H
10	2.85-2.72 (m)	4H
1	2.11-1.94 (m)	4H
9	1.86-1.69 (m)	4H
2-8	1.52-0.99 (m)	28H

**Taula 14.** <sup>1</sup>H-RMN del complex TL10 en metanol-d4. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Complex	$\delta_{\text{fòsfor}}$ (ppm)
<i>cis</i> -[Mo(CO) <sub>4</sub> (L10) <sub>2</sub> ]	26.5

**Taula 15.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL10 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.



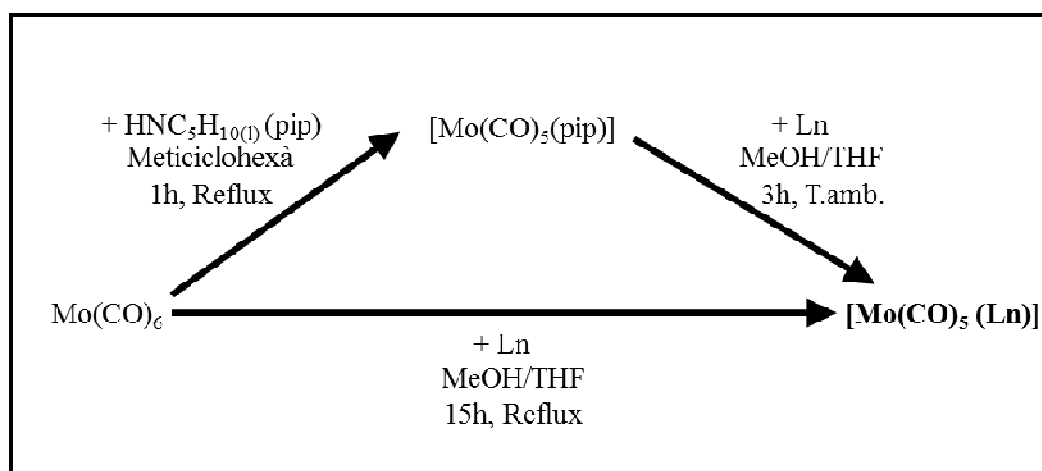
**Figura 48.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del complex TL10 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex TL10 en metanol-d<sub>4</sub>.

### 4.1.3. COMPLEXOS PL<sub>n</sub> ([Mo(CO)<sub>5</sub>Ln], n= 2, 6 i 10)

#### 4.1.3.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DE COMPLEXOS PL<sub>n</sub>.

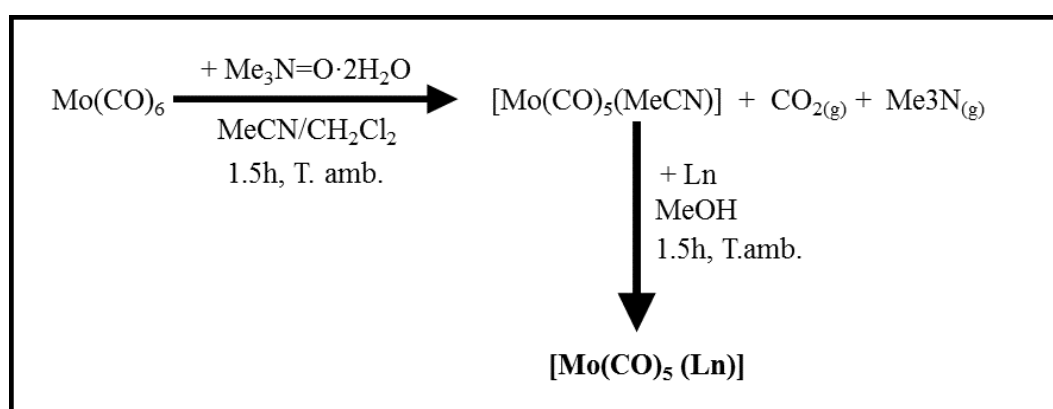
- **Procediment sintètic**

Diferents vies per a la preparació dels complexos [Mo(CO)<sub>5</sub>Ln] han estat estudiades amb anterioritat (Esquema 6). La reacció es pot portar a terme en dues etapes partint de Mo(CO)<sub>6</sub>, en la primera etapa es porta a terme una substitució nucleofílica d'un carbonil per piperidina segons el procediment descrit bibliogràficament<sup>125, 126</sup> i a partir del precursor [Mo(CO)<sub>5</sub>(pip)] s'arriba al complex desitjat per bescanvi de la piperidina pel lligand fosfínic Ln. Un altre mètode per a la preparació dels compostos PL<sub>n</sub> és per reacció directa de Mo(CO)<sub>6</sub> amb el lligand fosfina duent a terme la reacció amb gran excés de metall i modificant el procediment descrit amb un homòleg amb TPPTS.<sup>127</sup>



**Esquema 6.** Vies sintètiques per a la preparació dels complexos  $[\text{Mo}(\text{CO})_5\text{Ln}]$  ( $n= 2, 6$  i  $10$ ).

No obstant aquestes vies requereixen elevades temperatures, temps de reacció molt llargs i/o processos de purificació molt complicats. En el cas de la reacció directa de  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  amb el lligand fosfina  $\text{Ln}$  també calen quantitats molt elevades de reactius d'elevat preu que es posen en excés. Així, doncs, en aquest treball es va optar per obtenir els complexos  $\text{PLn}$  mitjançant una nova via a partir de la modificació de procediments descrits a la bibliografia. El procés consisteix en utilitzar òxid de trimetilamina dihidratat ( $\text{Me}_3\text{N}=\text{O}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) per oxidar un dels carbonils del  $[\text{Mo}(\text{CO})_6]$  a  $\text{CO}_{2(\text{g})}$ . La vacant és ocupada per acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), el qual és emprat com a dissolvent juntament amb diclorometà ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) en proporció 1:1. Tot seguit, s'addiciona el lligand fosfínic a la solució dissolt en metanol, que interacciona amb l'intermedi  $[\text{Mo}(\text{CO})_5(\text{CH}_3\text{CN})]$  produint una reacció de bescanvi i donant lloc al complex  $[\text{Mo}(\text{CO})_5\text{Ln}]$  (Esquema 7).



**Esquema 7.** Via sintètica emprada per a la preparació dels complexos  $[\text{Mo}(\text{CO})_5\text{Ln}]$  ( $n= 2, 6$  i  $10$ ).



## Resultats

Per aquest procediment s'utilitza un 20% d'excés de metall respecte l'òxid de trimetilamina i un dèficit del 10% de fosfina també respecte aquest últim. Donat que tant el  $[\text{Mo}(\text{CO})_6]$  en excés com l'intermedi de reacció  $[\text{Mo}(\text{CO})_5(\text{CH}_3\text{CN})]$  són insolubles en metanol, podran ser eliminats sense problemes. Així, doncs, la reacció es duu a terme a temperatura ambient, en temps relativament curts (3h en total) i el producte es purifica fàcilment recristal·litzant-lo amb metanol. Mitjançant aquesta via es varen obtenir els compostos PLn amb els rendiments següents: PL2, 85%; PL6, 68% i PL10,86%.

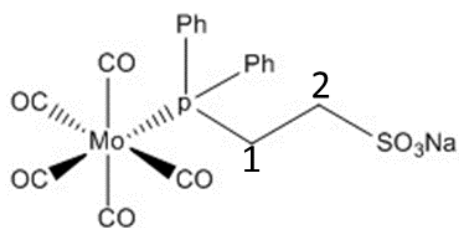
- **Caracterització**

### Anàlisi elemental

- Anàlisi elemental del complex  $\text{Mo}(\text{CO})_5\text{L2}$ .  
Fórmula:  
Teòric (%): C, 41,30; H, 2,50; S, 5,80.  
Experimental (%): C, 38,54; H, 2,75; S, 5,18.
- Anàlisi elemental del complex  $\text{Mo}(\text{CO})_5\text{L6}$ .  
Fórmula:  
Teòric (%): C, 41,30; H, 3,60; S, 5,30.  
Experimental (%): C, 42,10; H, 3,67; S, 4,81.

### Ressonància magnètica nuclear

L'assignació dels pics dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex PL2 (Figura 49) es mostren a les taules 16 i 17 respectivament. Els corresponents espectres es mostren a la Figura 50.



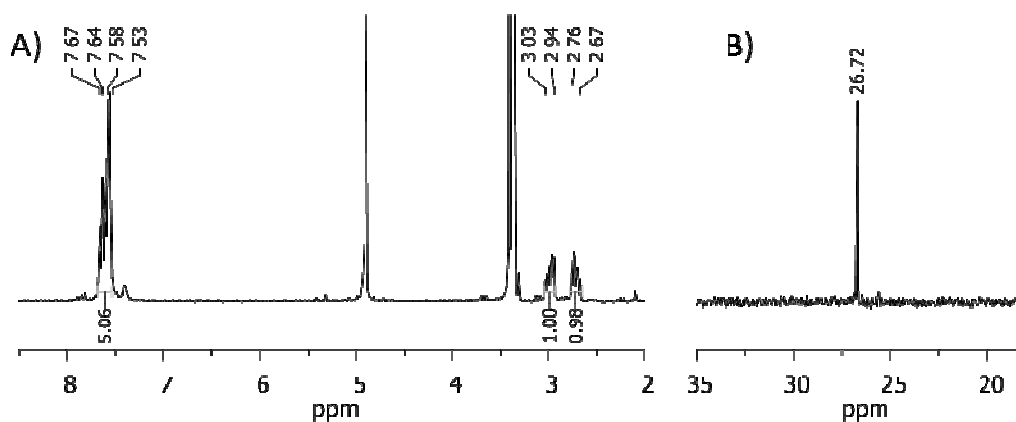
**Figura 49.** Representació esquemàtica del complex PL2.

[Mo(CO) <sub>5</sub> L2]		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.70-7.53 (m)	10H
2	3.04-2.93 (m)	2H
1	2.77-2.66 (m)	2H

**Taula 16.** <sup>1</sup>H-RMN del complex PL2 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Complex	δ fòsfor (ppm)
[Mo(CO) <sub>5</sub> L2]	26.7

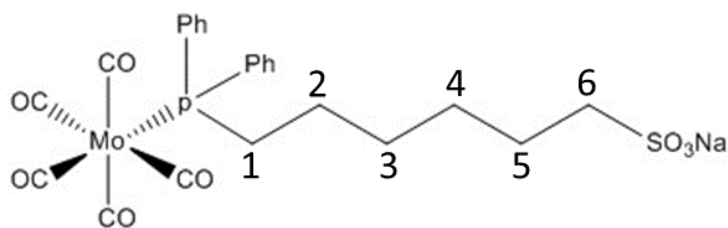
**Taula 17.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex PL2 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.



**Figura 50.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del complex PL2 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex PL2 en metanol-d<sub>4</sub>.

Pel que fa al complex PL6 (Figura 51), l'assignació dels pics dels espectres de <sup>1</sup>H-RMN i de <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN es resumeix a les taules 18 i 19 respectivament. I els corresponents espectres es mostren a la Figura 52.

## Resultats



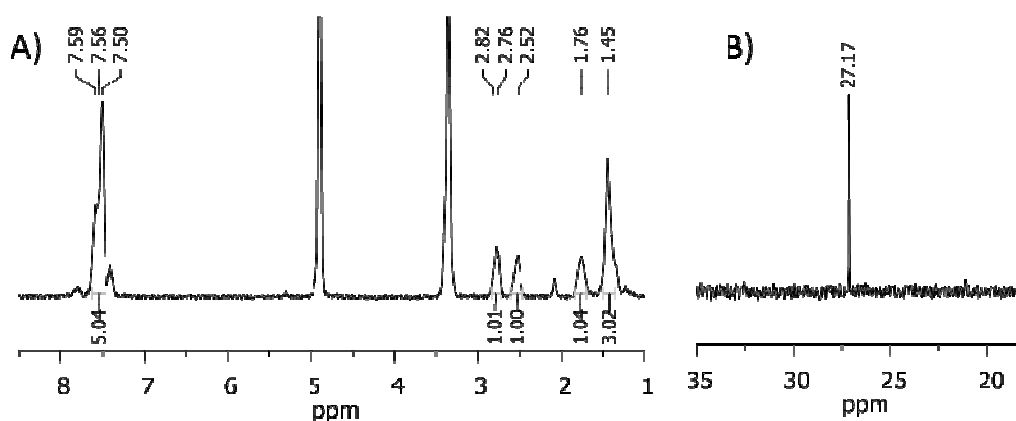
**Figura 51.** Representació esquemàtica del complex PL6.

[Mo(CO) <sub>5</sub> L6]		
Assignació	δ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.68-7.44 (m)	10H
6	2.83-2.71 (m)	2H
1	2.62-2.44 (m)	2H
5	1.85-1.67 (m)	2H
2-4	1.51-1.35 (m)	6H

**Taula 18.** <sup>1</sup>H-RMN del complex PL6 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Complex	δ fòsfor (ppm)
[Mo(CO) <sub>5</sub> L6]	27.2

**Taula 19.** <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex PL6 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.



**Figura 52.** A) Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del complex PL6 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-RMN del complex PL6 en metanol-d<sub>4</sub>.

L'assignació de pics del complex PL10 (Figura 53) es pot veure a les taules 20 i 21. I a la Figura 54 es mostren els seus espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i de  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN.

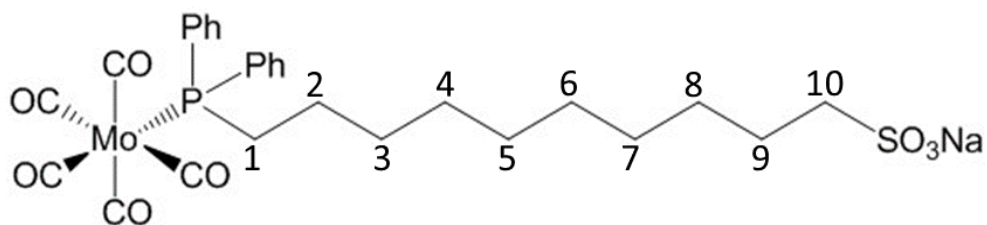


Figura 53. Representació esquemàtica del complex PL10.

[Mo(CO) <sub>5</sub> L10]		
Assignació	$\delta$ (ppm)	Integració
Aromàtics	7.63-7.29 (m)	10H
10	2.84-2.70 (m)	2H
1	2.54-2.38 (m)	2H
9	1.84-1.68 (m)	2H
2-8	1.46-1.18 (m)	14H

Taula 20.  $^1\text{H}$ -RMN del complex PL10 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics, desplaçament químic, multiplicitat i integració.

Complex	$\delta$ fòsfor (ppm)
[Mo(CO) <sub>5</sub> L10]	27.4

Taula 21.  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex PL10 en metanol-d<sub>4</sub>. Assignació de pics i desplaçament químic.

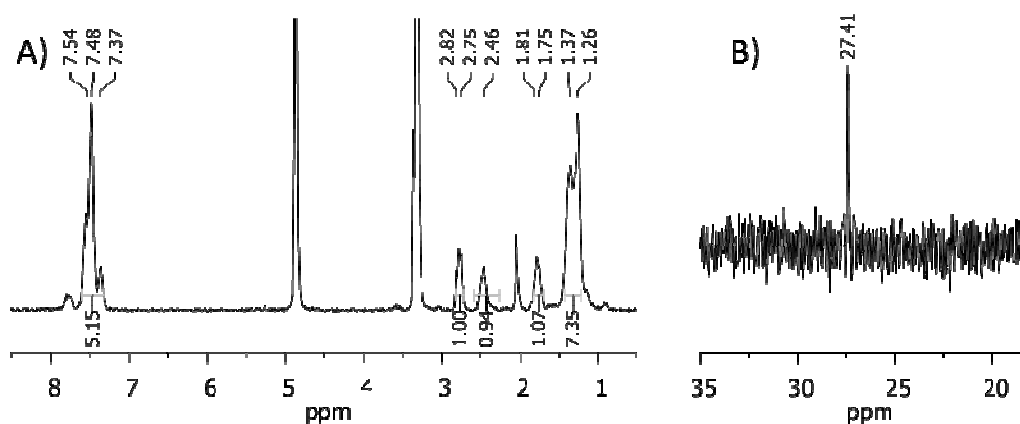


Figura 54. A) Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del complex PL10 en metanol-d<sub>4</sub>. B) Espectre  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del complex PL10 en metanol-d<sub>4</sub>.

## *Resultats*

## 4.2. CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA D'AGREGATS

### 4.2.1. COMPOSTOS DE LA FAMÍLIA L2 (FL2)

#### 4.2.1.1. DETERMINACIÓ DE LA CMC

Els metal·lotensioactius sintetitzats en aquest treball són molècules amfifíliques pel que, consegüentment, en solució aquosa i a concentracions per sobre de la concentració micel·lar crítica (cmc), s'ordenen espontàniament donant lloc a agregats supramoleculars.

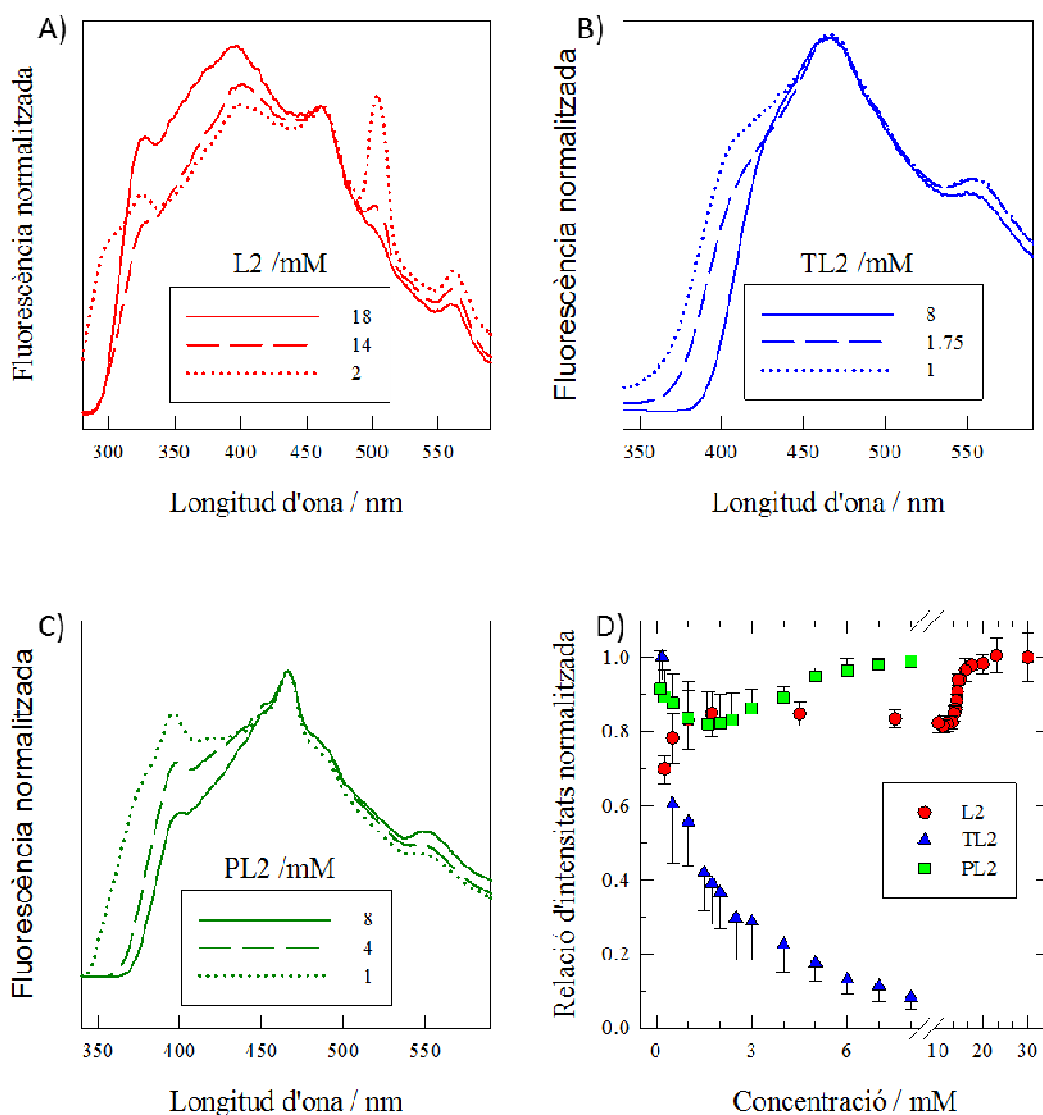
La cmc d'un tensioactiu pot determinar-se per un gran nombre de mètodes, com ara a partir del punt d'inflexió de la representació d'alguna de les propietats físiques de la suspensió en funció de la concentració de tensioactiu. Tècniques com la tensiometria,<sup>128</sup> conductometria,<sup>129</sup> dispersió de la llum,<sup>130</sup> fluorimetria,<sup>131, 132, 133</sup> entre d'altres, són de gran utilitat per a la determinació d'aquest paràmetre.

En aquest apartat es descriu un mètode alternatiu a la tensiometria per a la determinació de la cmc dels compostos sintetitzats de cadena més curta (FL2). Es fonamenta en l'anàlisi dels espectres de fluorescència de suspensions del compost estudiat obtingudes mitjançant dilucions consecutives d'una inicial, amb una concentració per sobre de la cmc, fins arribar a una preparació diluïda on no hi ha agregats.

El fenomen descrit es pot observar a la Figura 55 on es mostren els espectres de fluorescència normalitzats a diferents concentracions dels compostos FL2 i la representació dels canvis produïts per efecte de l'agregació en funció de la concentració.

Com pot apreciar-se a la Figura 55 D) el lligand L2 mostra una abrupta transició del quocient de fluorescència a una concentració de 14 mM. Pel que fa als complexos TL2 i PL2, en tots dos casos, el canvi més acusat té lloc al voltant d'una concentració de 2 mM, determinant-se d'aquesta manera el valor de cmc per cada compost. Els resultats estan d'acord amb els obtinguts mitjançant tensiometria en treballs anteriors.<sup>46</sup>

## Resultats



**Figura 55.** Espectres de fluorescència normalitzats dels compostos de la família L2: A) Lligand L2,  $\lambda_{\text{exc}} = 250$  nm; B) Complex TL2,  $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm; C) Complex PL2,  $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm. D) Relació d'intensitats normalitzada referides al valor inicial (L2: I396/I464, TL2: I396/I467 i PL2: I566/I466) en funció de la concentració de tensioactiu. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 3$ ).

La longitud d'ona d'excitació, els màxims d'emissió triats per fer la relació d'intensitats i el valor de cmc determinat per a cada tensioactiu, mitjançant fluorescència o tensiometria,<sup>46</sup> es troben resumits a la Taula 22.

	$\lambda_{exc} / \text{nm}$	Relació d'intensitats	cmc (mM) Fluorescència	cmc (mM) Tensiometria
<b>L2</b>	250	I396 / I464	14	14
<b>TL2</b>	305	I396 / I467	2,0	2,0
<b>PL2</b>	305	I566 / I466	2,0	1,9

**Taula 22.** Longitud d'ona d'excitació, màxims d'emissió triats per a la relació d'intensitats i valor de cmc dels compostos FL2 determinats mitjançant fluorescència i tensiometria.

#### 4.2.1.2. PROPIETATS TENSIOACTIVES. SOLUBILITZACIÓ DE LIPOSOMES

En aquest apartat s'estudien les propietats tensioactives dels compostos FL2 i la seva capacitat de solubilitzar liposomes.

En general, la interacció de tensioactius amb liposomes produeix una alteració de la seva estructura vesicular que, en funció de la concentració, pot arribar a la seva solubilització total. Aquesta disgregació de la bicapa lipídica per adició de tensioactius acaba donant com a resultat micel·les mixtes que contenen tant molècules de lípid com de tensioactiu. Aquest fenomen és de gran interès ja que, per exemple, és emprat des de fa molts anys per a la purificació i estudi de biomembranes i proteïnes de membrana.<sup>134</sup>

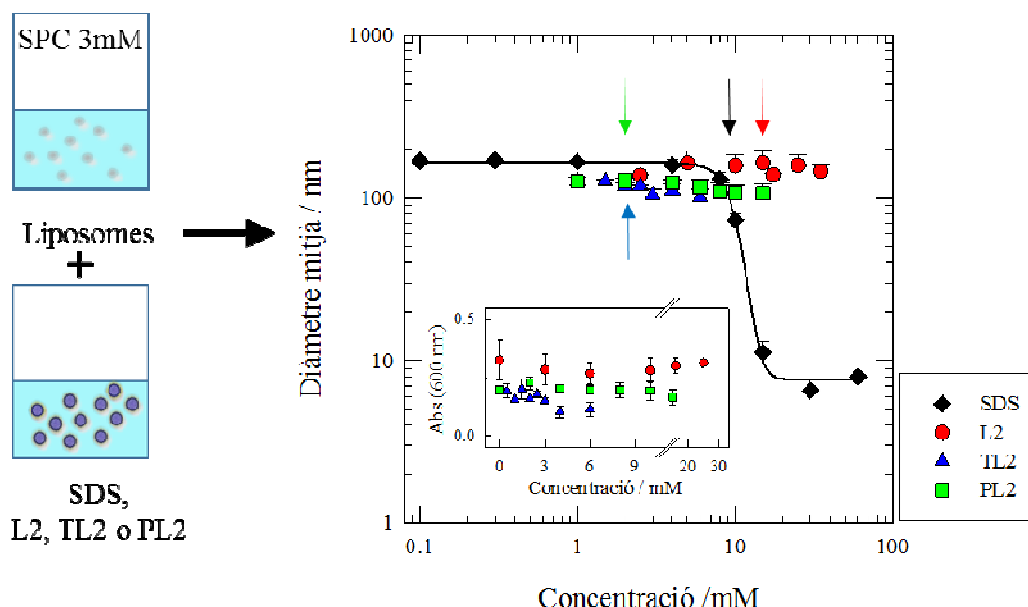
Per tal de determinar les propietats tensioactives de les molècules objecte d'estudi es preparen, tal i com es detalla a l'apartat 3.4.10., suspensions aquoses de liposomes de 100 nm de diàmetre a una concentració final d'SPC de 3mM, i que contenen concentracions creixents de tensioactiu. Les mescles obtingudes s'estudien per DLS i espectroscòpia visible.

Mitjançant espectroscòpia de DLS es determina el diàmetre dels agregats i els resultants es comparen amb els originats pel dodecil sulfat sòdic (SDS), un tensioactiu aniònic àmpliament utilitzat, capaç de solubilitzar els liposomes en 24 h (Figura 56). Complementàriament, s'analitzen els diferents sistemes mesurant la seva absorbància a 600 nm. La Figura 56 mostra com, durant un mínim de 72 hores, el diàmetre dels agregats es manté pràcticament constant en incrementar la concentració dels tensioactius de la família L2 fins i tot més enllà del valor de la cmc: 14 mM pel lligand L2 i 2 mM pels complexos TL2 i PL2 (valors indicats amb fletxes). En canvi, en presència d'SDS, a les 24 h la mida dels liposomes decreix ràpidament quan la



## Resultats

concentració del tensioactiu se situa per sobre de la seva cmc (8,3 mM). Els resultats posen de manifest que els compostos estudiats presenten poc caràcter tensioactiu donat que els liposomes no són solubilitzats a concentracions molt superiors a la seva cmc, i la seva mida es manté durant més de 72 hores, a diferència del que passa amb l'SDS, que en 24 hores solubilitza totalment els liposomes i forma micel·les mixtes.



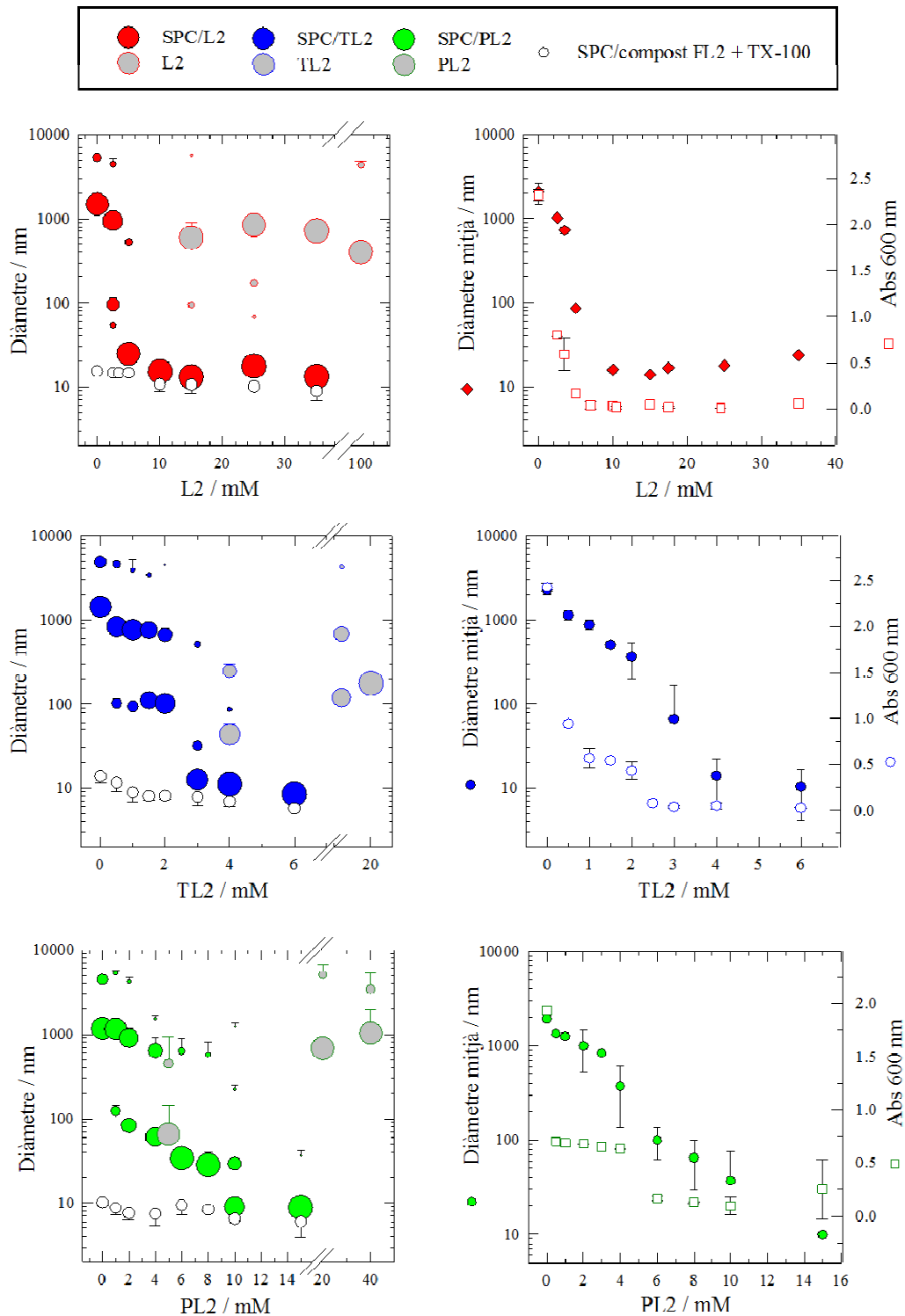
**Figura 56.** Diàmetre mitjà de les mesclades de liposomes (SPC 3 mM final) amb concentracions creixents de compostos de la FL2 (72 h) o amb SDS (24 h). Les fletxes indiquen la cmc de cada compost. Gràfic inserit: absorbància a 600 nm. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 3$ ).

### 4.2.1.3. DETERMINACIÓ DE LA MIDA D'AGREGATS MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE DLS

Mitjançant espectroscòpia de DLS es determina la mida dels agregats de molècules de la família L2 i dels de mesclades seves amb SPC. Els agregats mixtes es van obtenir per hidratació de pel·lícules preparades de manera que la concentració final d'SPC fos constant (3 mM) mentre que la dels compostos FL2 fos creixent.

La mida dels agregats preparats a partir de compostos purs, sense fosfolípid, augmenta en augmentar la concentració de tensioactiu, essent més evident el canvi en els complexos organometàl·lics que en el cas del lligand (Figura 57). Pel que fa als sistemes mixtes, l'increment progressiu de la relació tensioactiu/SPC provoca un canvi important en la distribució de mides dels agregats obtinguts: en augmentar la proporció de tensioactiu el diàmetre dels agregats obtinguts decreix paulatinament, fet que indica

que es produeix la incorporació dels tensioactius a la membrana lipídica. A partir d'una concentració crítica només s'observen nanoagregats, que podrien correspondre tant a sistemes micel·lars com bicel·lars.

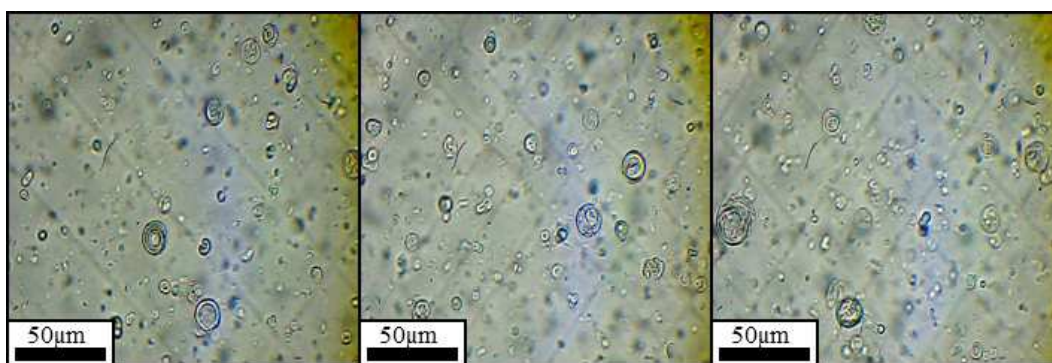


**Figura 57.** Distribució de mida de poblacions (la mida del cercle indica el percentatge de cada població), diàmetre mitjà i valor d'absorbància a 600 nm per sistemes purs de la FL2 i mixtes (SPC/tensioactiu) en funció de la concentració de compost FL2. A les mescles la concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 3$ ).

## Resultats

Tal i com es pot observar a la Figura 57 l'evolució de la mida i l'absorbància mostren una discontinuïtat al voltant de 4 mM pel lligand L2, 3 mM pel complex TL2 i 10 mM pel PL2.

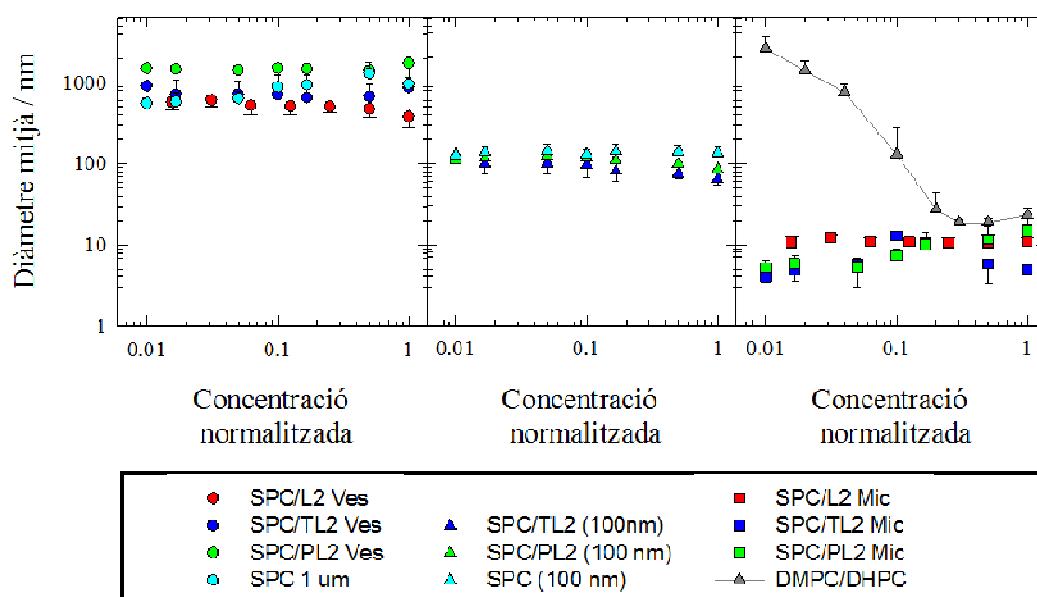
Destaca el fet que amb els tres tensioactius l'absorbància decreix abruptament ja amb la menor quantitat de tensioactiu emprada, fet que posa de manifest que la seva incorporació a la membrana genera un important canvi de mida que no es detectat per DLS. La Figura 58 mostra imatges de liposomes a concentració 3 mM visualitzades mitjançant microscòpia òptica. La mida dels agregats que es detecten queden fora del límit de detecció mitjançant DLS.



**Figura 58.** Imatges de microscòpia òptica d'una suspensió de liposomes 3mM.

El seguiment amb el temps dels agregats mixtes mitjançant espectroscòpia de DLS i UV-VIS posa de manifest que es mantenen estables durant més de 15 dies, tant a 4°C com a temperatura ambient. Finalment, l'addició de Triton X-100, un potent tensioactiu, a concentració de solubilització (concentració final 10 mM)<sup>117</sup> provoca la ruptura de tots els agregats, obtenint-se sistemes amb un diàmetre situat al voltant d'uns 10 nm, corresponents a micel·les mixtes.

D'altra banda, resulta d'especial d'interès estudiar l'estabilitat dels sistemes mixtes anteriors en funció de la dilució, tant en el cas de les vesícules com dels agregats nanomètrics. Aquesta propietat es va avaluar mitjançant espectroscòpia DLS en diluir fins a dos ordres de magnitud, i fins a concentracions menors a la cmc dels tensioactius, una mostra concentrada.



**Figura 59.** Mida dels agregats obtinguts en diluir liposomes, sistemes mixtes SPC/l·ligand, SPC/MTS o bicel·les DMPC/DHPC en funció de la concentració normalitzada. La concentració absoluta inicial (equivalent a una concentració normalitzada d'1) dels sistemes és la següent: SPC 18 mM; SPC/L2 vesicular (Ves) 3:1 mM/mM; SPC/TL2 Ves 18:6 mM/mM; SPC/PL2 Ves 18:6 mM/mM; SPC/L2 micel·lar (Mic) 3:25 mM/mM; SPC/TL2 Mic 6:3 mM/mM; SPC/PL2 Mic 6:1,8 mM/mM i DMPC/DHPC 302:100 mM/mM. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).

A la Figura 59 es pot observar que no hi ha canvis en la mida dels agregats per efecte de la dilució, tant en el cas d'agregats mixtes vesiculars, vesiculars extrusionats per membranes de 100 nm, ni en sistemes mixtes de mida nanomètrica (micel·lar/bicel·lar). Com a control negatiu s'utilitzen liposomes d'SPC de mida 1 μm i 100 nm, donat que la seva estabilitat front la dilució és ben coneguda, i com a control positiu s'utilitzen bicel·les formades per DMPC/DHPC (302:100 mM/mM), les quals, en ser diluïdes per sota de la cmc de la DHPC, es disgreguen de manera que la DMPC forma vesícules grans.<sup>114</sup>