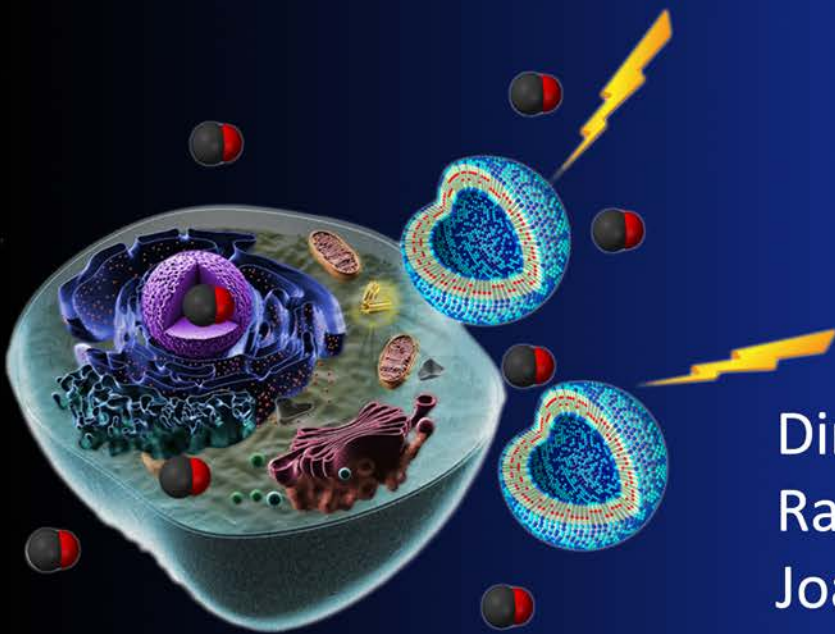


## Metal·lotensioactius i fosfolípids: estudi d'agregats supramoleculars com a sistemes alliberadors de monòxid de carboni

Maribel Marín García

Tesi Doctoral  
2017



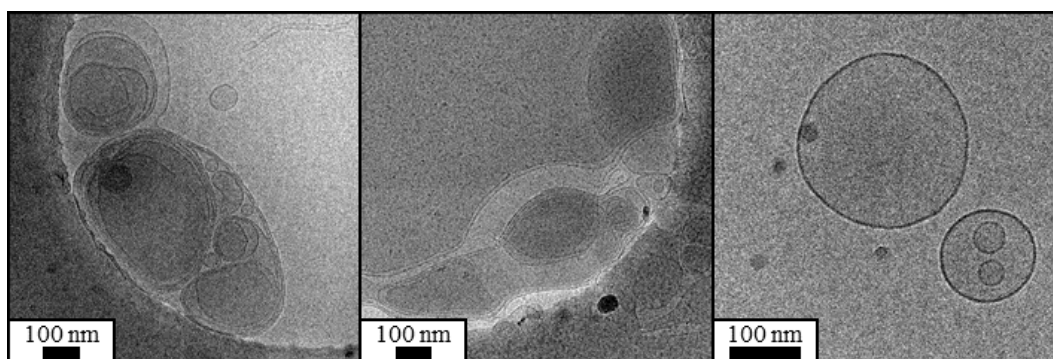
Directors:  
Ramon Barnadas Rodríguez  
Joan Suades Ortuño

## Resultats

### 4.2.1.4. VISUALITZACIÓ D'AGREGATS MITJANÇANT CRIOMICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ (*Cryo*-TEM)

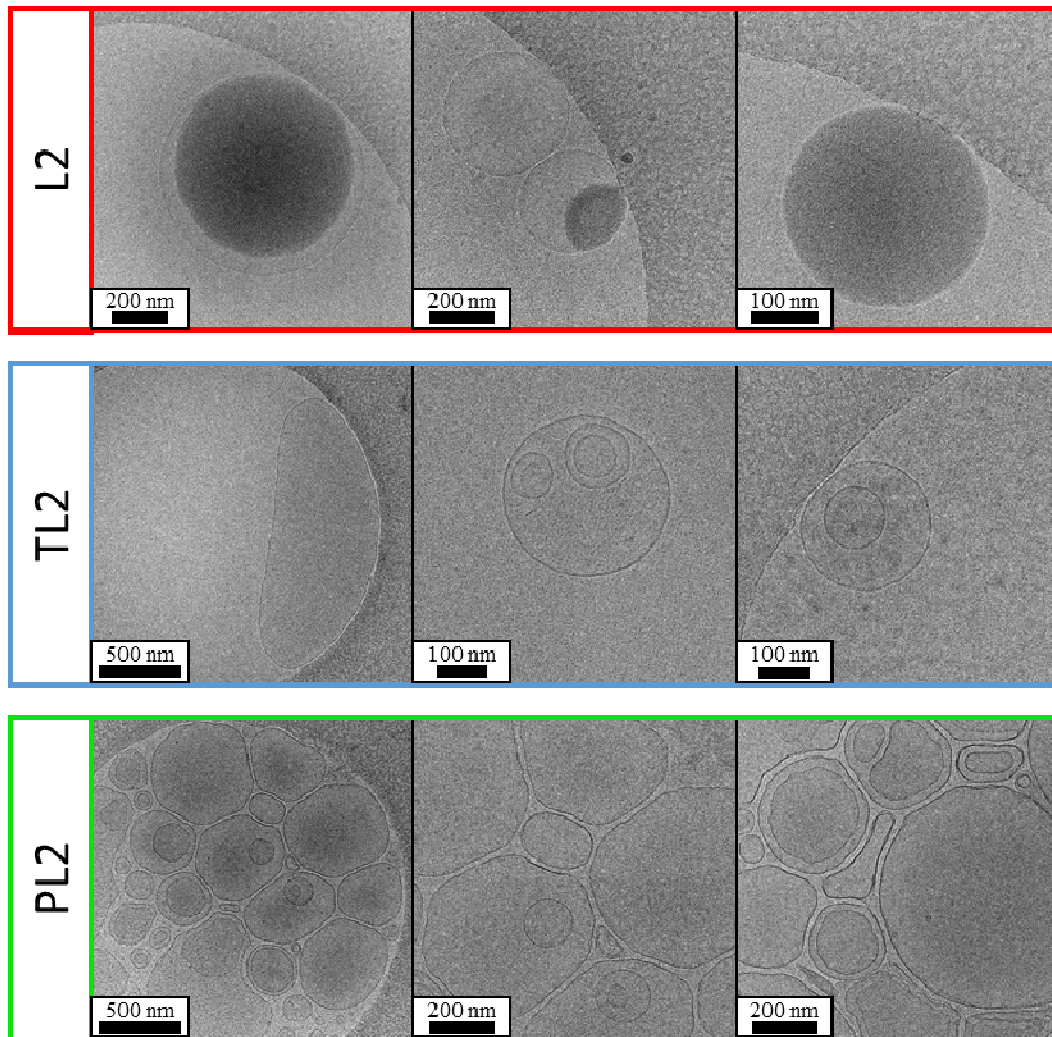
La microscòpia electrònica de transmissió criogènica resulta molt apropiada per a la visualització d'agregats en solució. En aquest apartat, aquesta tècnica és emprada per a determinar la mida i morfologia de liposomes i d'agregats preparats a partir de solucions de tensioactius purs, així com la d'agregats obtinguts a partir de sistemes mixtes SPC/tensioactiu.

Les solucions d'agregats a observar es preparen pel mètode d'hidratació d'un film amb aigua desionitzada i com a mínim trenta minuts abans de la seva anàlisi. A la Figura 60, on es mostren imatges de liposomes a una concentració d'SPC 3 mM, s'observen agregats multilamel·lars (MLVs) de mida gran, alguns dels quals amb forma el·lipsoïdal, i d'altres més petits. En general, les mostres de liposomes preparats d'aquesta manera acostumen a ser molt polidisperses.



**Figura 60.** Fotografies de *cryo*-TEM de liposomes d'SPC a una concentració 3 mM.

Les fotografies dels agregats purs dels compostos FL2 es van obtenir a una única concentració, superior a la cmc de cada compost, i que es correspon a una de les concentracions estudiades per DLS (Figura 61). Com s'observa, el nombre de vesícules detectades per camp de visió és força reduït pel que fa al lligand L2 (100 mM) i al complex TL2 (20 mM), mentre que la visualització d'agregats pel complex PL2 (20 mM) resulta molt més efectiva tot i que la concentració dels dos MTS és la mateixa.

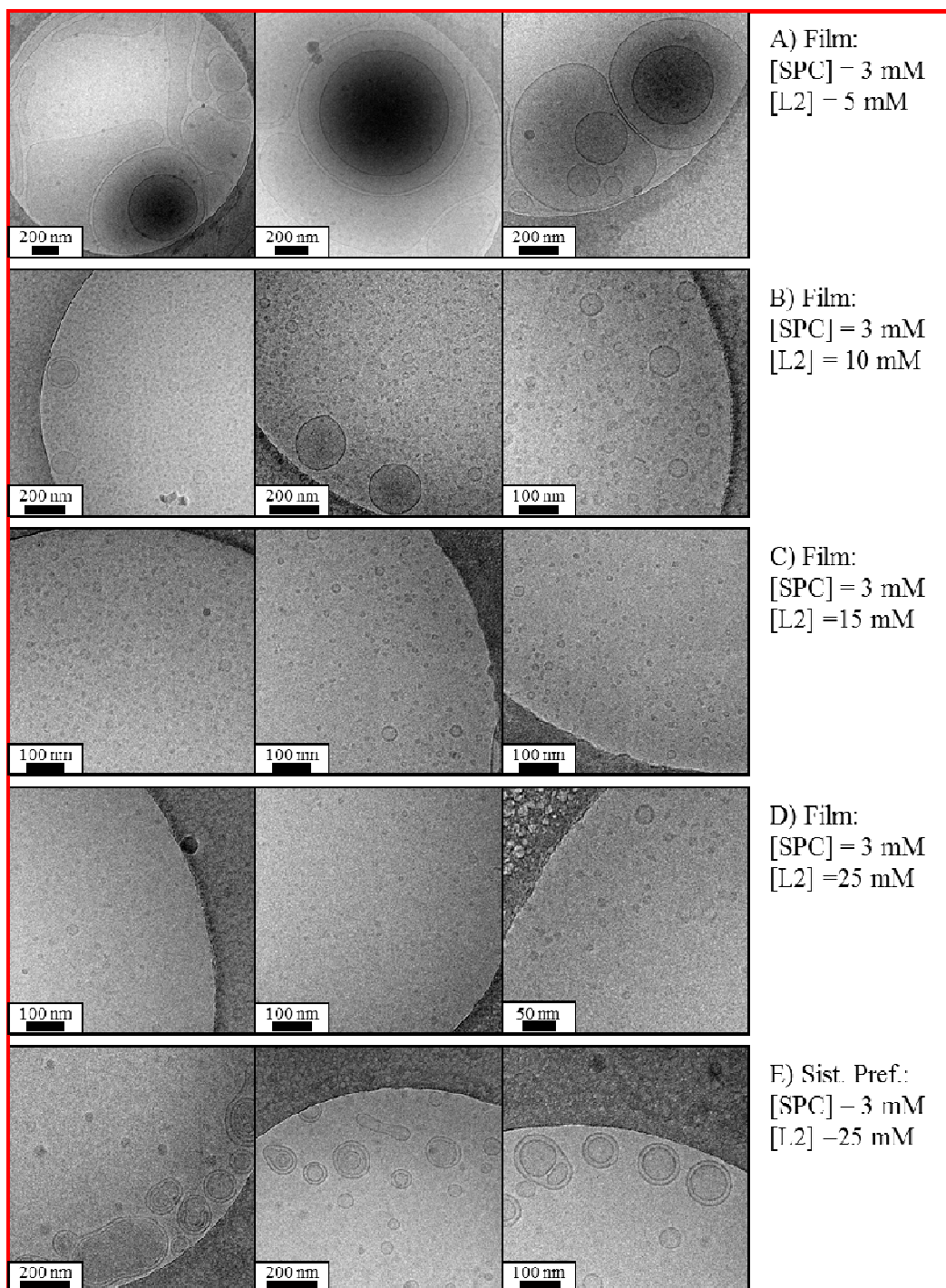


**Figura 61.** Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats dels compostos FL2 en aigua. Concentració: lligand L2 100 mM; complex TL2 20 mM i complex PL2 20 mM.

En el cas del lligand L2 s'observen majoritàriament vesícules unilamel·lars amb un diàmetre aproximat de 300-400 nm (LUVs). D'altra banda, al complex TL2 es detecten vesícules unilamel·lars de mida gran (al voltant d'una micra de diàmetre) i agregats multivesiculars (MVV) de menor dimensió, d'uns 200 nm. Finalment, el complex PL2 mostra un ventall més gran d'agregats, coexistint vesícules petites unilamel·lars d'uns 100 nm (SUVs) i agregats força més grans, de l'ordre d'una micra, de tipus multivesicular. En tots els casos els resultats són coherents amb els valors de diàmetre obtinguts mitjançant DLS. La presència d'agregats unilamel·lars i el fet que als agregats MVVs les bicapes es trobin distanciades, es pot justificar tenint en compte que la càrrega negativa dels compostos FL2 provoca repulsions entre membranes.



## Resultats



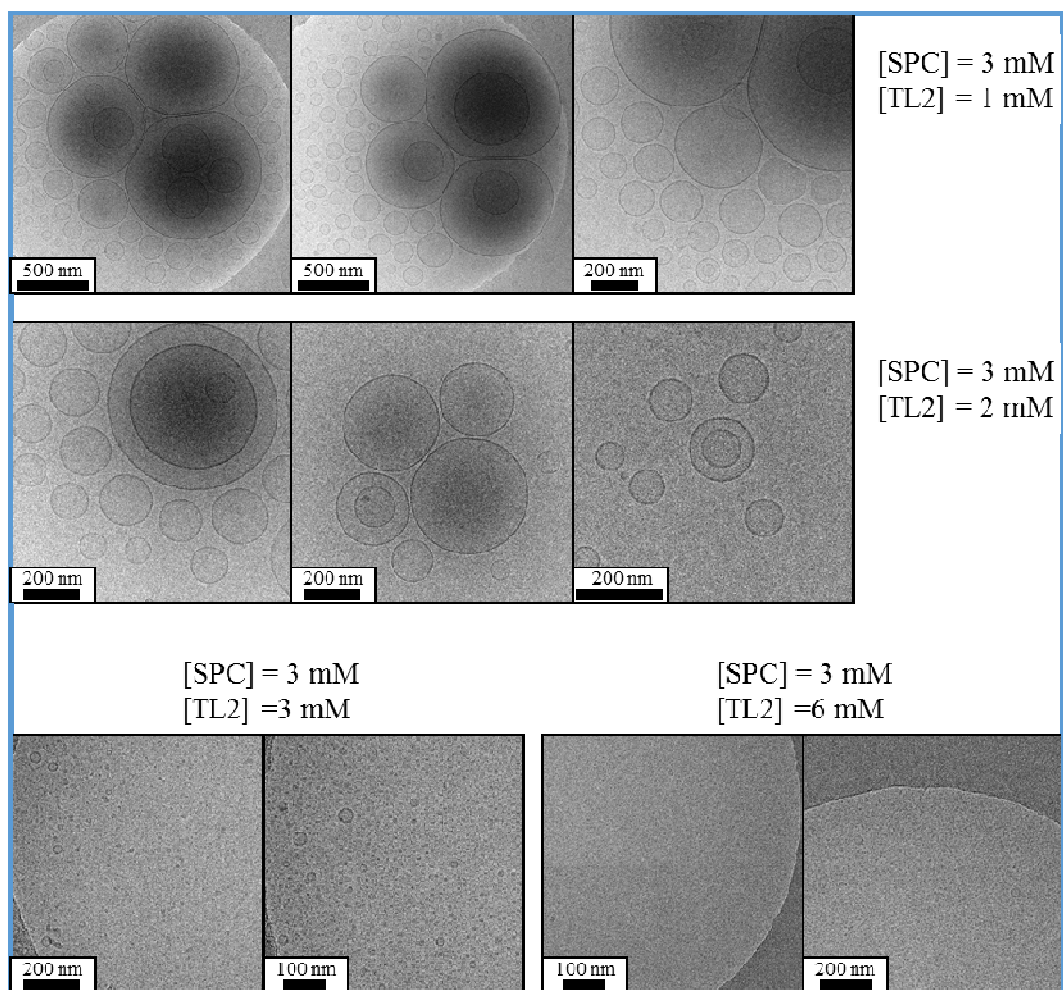
**Figura 62.** Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/L2 en aigua. A-D) Sistemes mixtes obtinguts per hidratació d'un film homogeni. E) Sistema obtingut per mescla de suspensions de liposomes d'SPC i de lligand L2.

Les fotografies corresponents als agregats de sistemes mixtes SPC/L2 es mostren a la Figura 62. A les imatges dels sistemes mixtes SPC/L2 obtinguts per hidratació d'un film homogeni s'aprecia la tendència observada mitjançant DLS, és a dir, que a mesura que augmenta la concentració de lligand els agregats obtinguts són cada vegada més petits i,



per sobre d'una concentració crítica, només es detecten nanoagregats. Inicialment, quan la concentració de lligand és baixa (5 mM) s'observen agregats MVVs de mida gran, amb un diàmetre situat al voltant dels 800 nm. En augmentar la concentració de lligand fins a 10 mM s'aprecien majoritàriament vesícules d'aproximadament 200 nm, unilamel·lars i algunes més petites (~ 50 nm). Finalment, a elevades concentracions de lligand, a partir de 15 mM d'L2, pràcticament només hi ha nanoagregats, tot i que encara és possible trobar algunes petites vesícules unilamel·lars, com a màxim, d'uns 30 nm de diàmetre.

D'altra banda, l'apartat E de la Figura 62 conté imatges d'un sistema mixt obtingut mitjançant mescla de liposomes extrusionats (per membranes de 100 nm de porus) i d'agregats del lligand L2. Es poden observar vesícules oligovesiculars (OLVs) d'aproximadament 100 nm, posant de manifest, tal i com s'havia determinat mitjançant DLS, que els liposomes no són solubilitzats per aquest compost.

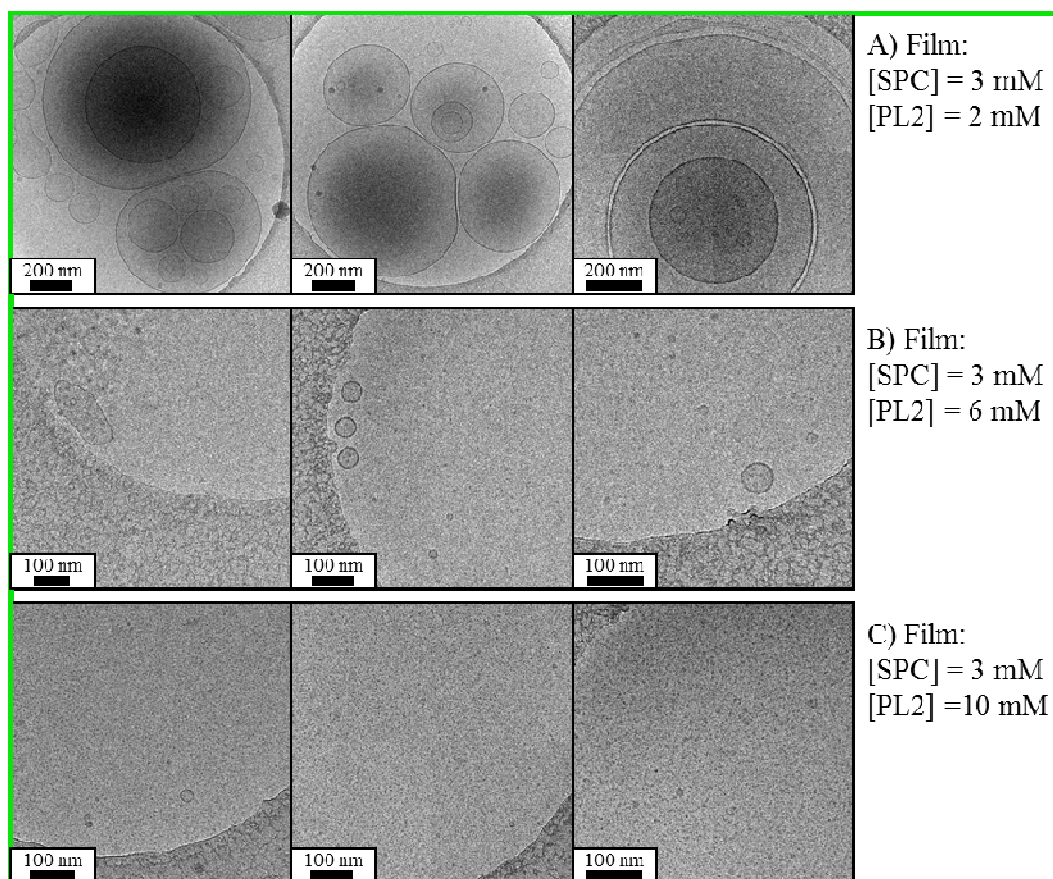


**Figura 63.** Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/TL2 en aigua.

## Resultats

Pel que fa als sistemes mixtes SPC/TL2 (Figura 63), a concentracions baixes de tensioactiu s'observen majoritàriament dos tipus d'agregats: agregats MVVs de mida gran, al voltant dels 800 nm, i una gran quantitat d'agregats unilamel·lars d'aproximadament 100 nm de diàmetre. La mida de les vesícules esdevé cada cop més petita en augmentar la concentració de TL2, fins que a partir d'una proporció SPC/TL2 3:3 mM/mM pràcticament només s'observen sistemes micel·lars.

Les fotografies dels agregats mixtes SPC/PL2 es mostren a la Figura 64. A concentracions baixes de complex (SPC/PL2 3:2 mM/mM) s'observen agregats micromètrics MVVs, i en augmentar la proporció a 3:6 mM/mM es passa a visualitzar vesícules unilamel·lars molt petites d'aproximadament 30 nm. Finalment, quan la concentració de complex PL2 és elevada (10 mM) només s'observen nanoagregats.



**Figura 64.** Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/PL2 en aigua.

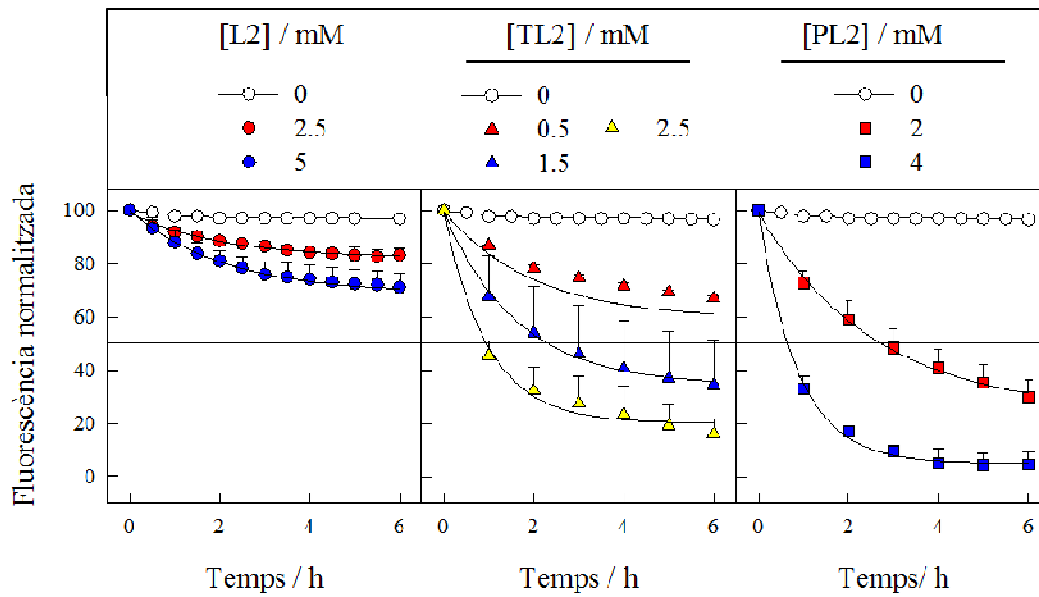
**4.2.1.5. PERMEABILITAT DELS AGREGATS MIXTES SPC/MTS**

La fosfina L2, així com els complexos que se'n deriven, són molècules amfifíliques que, per si soles, formen agregats supramoleculars en dissolució aquosa quan es troben per sobre de la cmc. Els resultats anteriors mostren que es poden obtenir agregats mixtes amb SPC si les mostres es preparen a partir de films secs que continguin els dos tipus de substància. L'efecte que la incorporació de les molècules de la família L2 causa a les membranes s'ha estudiat determinant la seva permeabilitat a la piranina (HPTS). Els resultats posen de manifest que la inserció de qualsevol dels tres compostos FL2 modifica el pas del fluoròfor a través de les bicapes d'SPC (Figura 65). Com pot apreciar-se, les membranes dels liposomes purs són pràcticament impermeables, mantenint-se el valor de fluorescència deguda a l'HPTS encapsulada al voltant del 100 % durant 6 hores. Contràriament, en les vesícules mixtes la fluorescència decreix en el temps. Com s'observa, a les 6 h els sistemes SPC/L2 3:5 mM/mM tenen una pèrdua de fluorescència situada al voltant del 30 %. En el mateix temps, els sistemes PC/TL2 3:2,5 mM/mM arriben a perdre fins al 85 % del seu contingut, mentre que els agregats PC/PL2 3:4 mM/mM el perden totalment.

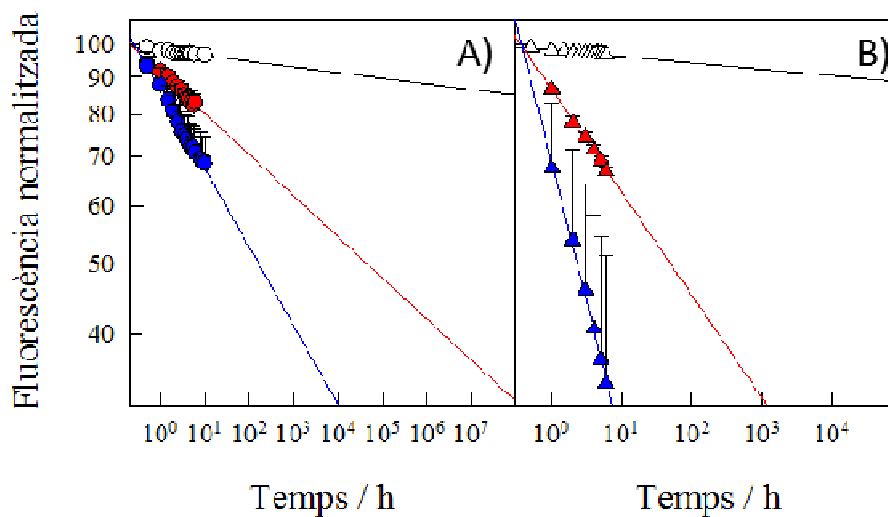
La quantificació de la permeabilitat s'ha realitzat a partir del temps en el que les vesícules alliberen el 50% del seu contingut inicial ( $t_{1/2}$ ). En els casos en que la permeabilitat és elevada, el temps referit s'ha obtingut per interpolació a les corbes experimentals (ajustant funcions exponencials decreixents simples), i en aquells en que la sortida de la sonda és lenta, ha estat necessari calcular-lo a partir de l'extrapolació de les rectes obtingudes en una representació doble logarítmica (Figura 66). Els valors obtinguts mostren que els liposomes purs tenen un  $t_{1/2}$  pràcticament infinit ( $5,66 \cdot 10^{33}$  hores). En presència d'L2, les membranes es permeabilitzen lleugerament, assolint els  $t_{1/2}$  els valor de 44777 i 164 h per a les relacions SPC:L2 3:2,5 i 3:5 mM/mM respectivament. L'efecte dels complexos resulta més important. La comparació dels  $t_{1/2}$  (Figura 67) indica que l'alteració de les propietats barrera de la membrana fosfolipídica té lloc en el següent ordre: TL2 > PL2 >> L2.



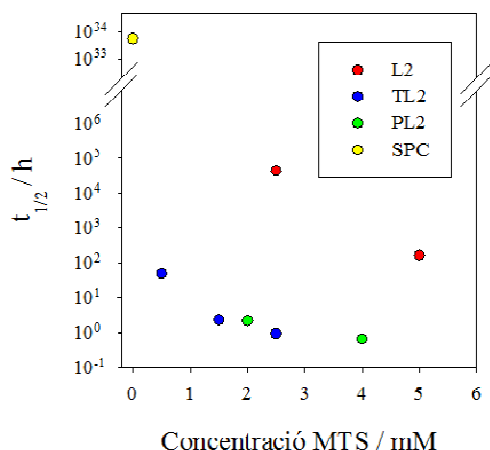
## Resultats



**Figura 65.** Permeabilitat dels agregats mixtes SPC/FL2. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).



**Figura 66.** Representacions doble logarítmiques emprades per obtenir el  $t_{1/2}$  en el sistemes poc permeables a l'HPTS: A) mesclades amb L2; B) mesclades amb TL2. La llegenda és la mateixa que la de la Figura 65. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).



Conc. / mM	t <sub>1/2</sub> / h		
	L2	TL2	PL2
0,5		49,8	
1,5		2,31	
2			2,72
2,5	44777	0,94	
4			0,65
5	164		

**Figura 67.** Representació dels  $t_{1/2}$  en funció de la concentració de sistemes mixtes SPC/tensioactiu FL2. A la taula es mostren els valors de  $t_{1/2}$  representats per les diferents composicions.

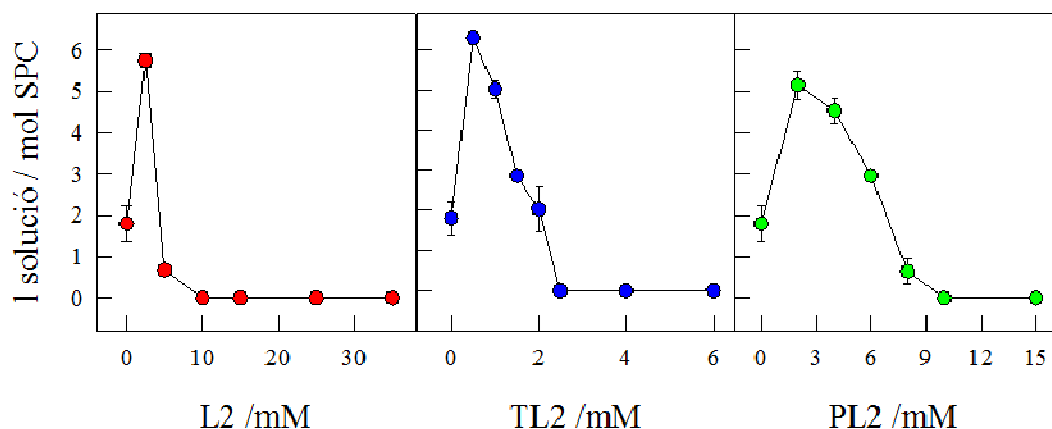
#### 4.2.1.6. VOLUM ENCAPSULAT DELS AGREGATS MIXTES SPC/MTS

Fer una estimació del volum aquós encapsulat en liposomes o als sistemes mixtes SPC/tensioactiu és un factor important per si en un futur es volen emprar aquests sistemes com a sistemes vehiculars de substàncies hidrosolubles. Cal tenir en compte que, a la vista dels resultats de permeabilitat dels sistemes mixtes, la determinació del volum encapsulat ha de ser un procediment ràpid per evitar resultats erronis. En cas contrari l'alliberament del marcador fluorescent per part de les vesícules faria que els resultats donessin valors molt inferiors als reals. Tenint en compte els resultats de permeabilitat i el temps que es triga en fer una SEC (uns 2-4 minuts), podem afirmar que en el pitjor dels casos (SPC/PL2 3:4 mM/mM) el volum encapsulat experimental seria com a mínim entre un 90-95 % del valor real.

A la Figura 68 es mostra el volum encapsulat per als sistemes mixtes SPC amb els compostos de la família L2 preparats pel mètode d'hidratació d'un film homogeni emprant una solució d'HPTS. En tots els casos la concentració final de fosfolípid és manté constant (3 mM) mentre s'augmenta la concentració de tensioactiu. Destaca el fet que mentre pels liposomes purs el volum encapsulat és  $1,8 \pm 0,4$  l de solució/mol lípid, pels sistemes mixtes SPC/tensioactiu, a concentracions baixes de tensioactiu, el volum encapsulat és molt més gran:  $5,7 \pm 0,2$  l solució/mol lípid pels sistemes SPC/L2 3:2,5 mM/mM;  $6,3 \pm 0,2$  l solució/mol lípid pels sistemes SPC/TL2 3:0,5 mM/mM i  $5,2 \pm 0,3$  l solució/mol lípid pels sistemes SPC/PL2 3:2 mM/mM. Tot i que en aquestes proporcions SPC/tensioactiu la mida dels agregats és similar a dels liposomes purs

## Resultats

segons els resultats obtinguts per DLS (apartat 4.2.1.3.), el fet d'incorporar una substància amb càrrega negativa (els grups sulfonat de les molècules) a la bicapa lipídica fa que hi hagi més repulsions entre elles, fent que els agregats mixtes, tot i ser de mida gran, tinguin menys bicapes que els liposomes purs, amb la qual cosa el volum encapsulat augmenta notablement.



**Figura 68.** Volum encapsulat dels agregats mixtes formats per SPC i compostos FL2. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).

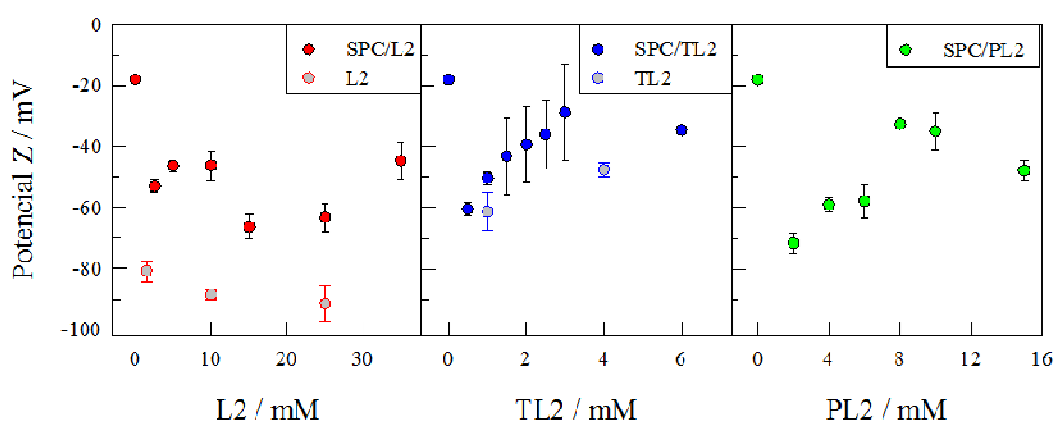
A partir del màxim d'encapsulació, el volum encapsulat disminueix progressivament en incrementar la quantitat de tensioactiu, un fet que és paral·lel a la disminució de mida dels agregats detectada per DLS, fins a arribar a una concentració a partir de la qual no hi ha substància encapsulada (entre 5 i 10 mM per l'L2, 2,5 mM pel TL2 i 10 mM pel PL2). Els valors referits es corresponen bé amb els valors de concentració a partir del qual només es detecten nanoagregats.

### 4.2.1.7. POTENCIAL Z

A la Figura 69 es mostren els resultats d'aquest paràmetre obtinguts en l'anàlisi de solucions mixtes preparades pel mètode d'hidratació d'un film homogeni, a una concentració constant de fosfolípid (3 mM) i concentracions creixents d'L2, TL2 o PL2. En primer lloc, s'observa com el potencial Z passa d'un valor de -18 mV en liposomes purs a valors molt més negatius en addicionar qualsevol dels compostos FL2. Aquest increment de càrrega negativa és coherent amb la inserció a la membrana lipídica dels compostos que contenen grups sulfonat. D'altra banda, s'observa que el tipus d'agregat



també té influència en el valor de potencial Z, detectant-se diferents tendències als valors del potencial. Així doncs, als sistemes vesiculars SPC/L2 (per sota de 10 mM d'L2) es determina un valor de potencial Z pràcticament constant situat al voltant de -45 mV. Ara bé, en arribar al primer punt on hi ha nanoagregats (L2 15 mM) el valor de potencial decreix fins a -66 mV, i a partir d'aquesta concentració hi ha una tendència creixent. Pel que fa als sistemes SPC/TL2, s'observa una tendència creixent del valor de potencial Z a la zona vesicular, fins a una proporció lípid/tensioactiu 3:3 mM/mM, punt a partir del qual el valor de potencial Z es manté constant, i que es correspon a la zona micel·lar. Finalment, pel que fa als sistemes mixtes SPC/PL2, a la zona vesicular (fins PL2 10 mM) el comportament és similar al TL2, amb una tendència creixent del valor del potencial, que s'inverteix en arribar a la zona micel·lar.



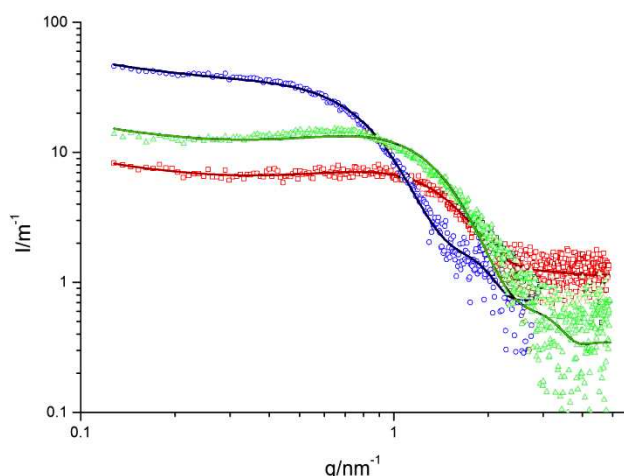
**Figura 69.** Potencial Z dels agregats mixtes formats per SPC i compostos FL2. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).

#### 4.2.1.8. SAXS

Les característiques físiques dels agregats formats pels complexos FL2 en aigua han estat estudiades mitjançant SAXS amb llum convencional. Aquesta tècnica permet extreure informació estructural del seu empaquetament i morfologia.

A la Figura 70 es mostren les corbes de dispersió del lligand L2 i dels dos complexos organometàl·lics, TL2 i PL2, juntament amb el millor ajust teòric, corresponent a sistemes vesiculars, fet que és coherent amb el que s'observa a les fotografies obtingudes mitjançant *Cryo*-TEM. A la Taula 23 es mostren els paràmetres corresponents a aquest ajust.

## Resultats



**Figura 70.** Intensitats SAXS en funció del vector mòdul de dispersió ( $q$ ) per dispersions d'L2 (quadrats vermells), TL2 (cercles blaus) i PL2 (triangles verds).

	<b>L2</b>	<b>TL2</b>	<b>PL2</b>
$A_m$ ( $\text{\AA}^2$ )	$49 \pm 3$	$153 \pm 10$	$72 \pm 6$
$L_c$ (nm)	$0,74 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,02$
$L_h$ (nm)	$2,25 \pm 0,05$	$2,48 \pm 0,05$	$4,22 \pm 0,2$
$V_c$ ( $\text{nm}^3$ )	$0,363 \pm 0,025$	$1,15 \pm 0,080$	$0,814 \pm 0,070$
$V_h$ ( $\text{nm}^3$ )	$1,10 \pm 0,07$	$3,79 \pm 0,26$	$3,04 \pm 0,29$
$N_w$	$34 \pm 5$	$115 \pm 10$	$100 \pm 10$

**Taula 23.** Paràmetres moleculars dels tensioactius formant agregats supramoleculars en aigua obtinguts a partir de les corbes d'ajust mostrades a la Figura 70.  $A_m$ : àrea per molècula,  $L_c$ : longitud hidrofòbica,  $L_h$ : longitud hidrofílica,  $V_c$ : volum hidrofòbic,  $V_h$ : volum hidrofílic i  $N_w$ : nombre de molècules d'aigua associades amb el cap polar.

A la Taula 23 es mostren valors directes de l'ajust ( $A_m$ ,  $L_c$ ,  $L_h$ ,  $N_w$ ) i alguns derivats dels anteriors, com els volums de les zones hidrofíliques i hidrofòbiques, obtinguts a partir del producte de l'àrea molecular per la longitud corresponent ( $L_h$  i  $L_c$  respectivament). Com pot apreciar-se, els valors d'àrea per molècula ( $A_m$ ) o de volum hidrofòbic ( $V_c$ ) pel complex TL2 són comparables als del complex PL2 més una molècula de lligand. D'altra banda, la  $L_c$  del complex TL2 és coherent amb les dimensions de la molècula obtingudes amb ChemBioDraw (0,9 nm des del metilè del grup sulfonat fins l'oxigen del carbonil més el radi de van der Waals de l'oxigen i mig de l'enllaç C-S), mentre que

el complex PL2 és lleugerament més llarg que l'esperat per ChemBioDraw (1 nm des del metilè del grup sulfonat fins un dels protons d'un anell benzènic). El volum del lligand i complexos determinat per SAXS es comparà amb un model teòric on s'exclou el dissolvent, de manera que en el cas del lligand els valors són força concordants però en el cas dels complexos els valors experimentals són superiors als teòrics. En conjunt, les dades posen de manifest que degut a la rigidesa i el gran volum dels complexos, l'empaquetament a la part hidrofòbica de les membranes dista molt de ser compacta. Aquestes dificultats d'empaquetament fa que les membranes presentin certa rugositat.<sup>135</sup>

### 4.2.1.9. ALLIBERAMENT DE CO

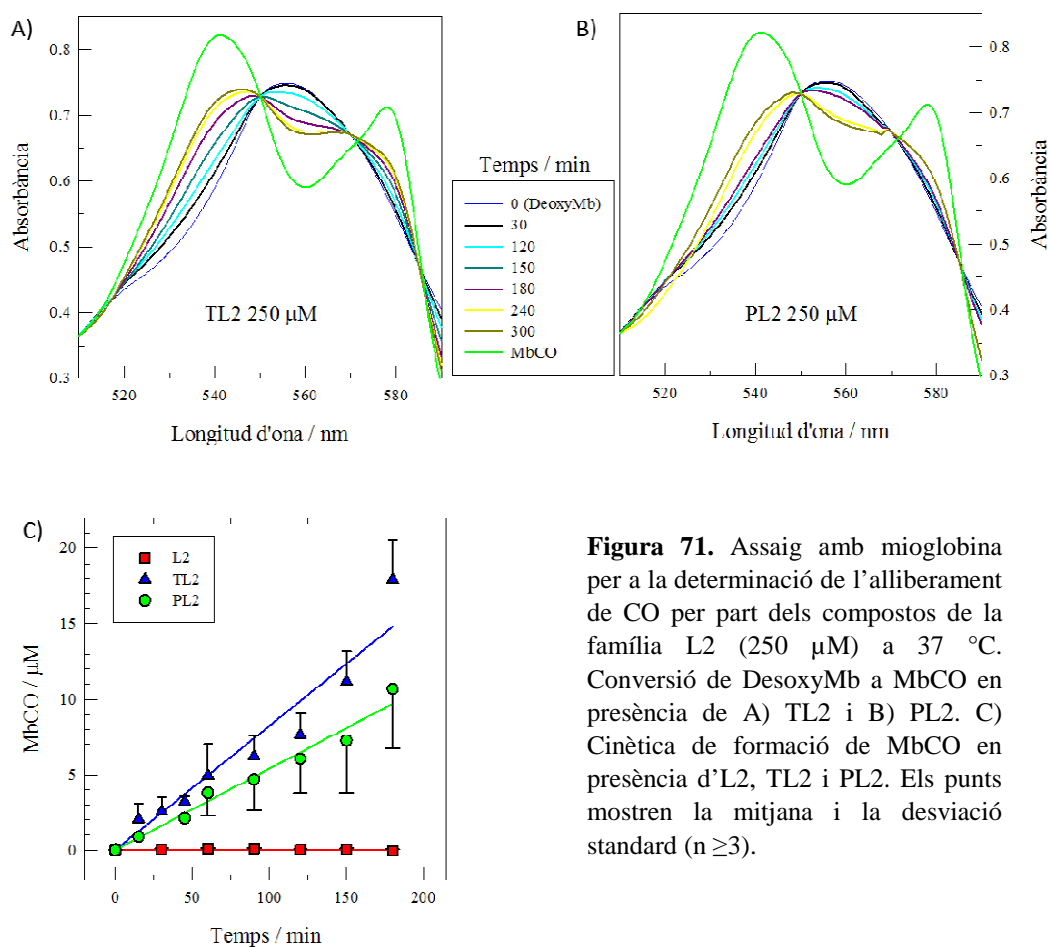
#### Assaig amb mioglobina

Els MTS estudiats en aquest treball presenten l'àtom metàl·lic (Mo) coordinat a diversos grups carbonílics, fet que fa d'aquests compostos uns bons candidats per a alliberar CO sota determinades condicions. Tenint en compte el gran nombre de treballs que utilitzen l'assaig amb mioglobina per a la determinació de l'alliberament de CO,<sup>83, 102, 136</sup> es va triar aquesta tècnica en un primer moment per tal d'avaluar les possibilitats d'aquests complexos per ser emprats com a CORMs.

Així doncs, la capacitat d'alliberar CO dels complexos organometàl·lics TL2 i PL2 es va determinar seguint espectrofotomètricament la conversió de desoxyMb a MbCO a una concentració final de tensioactius de 250  $\mu$ M, tal i com es descriu a l'apartat 3.4.1. El lligand L2, el qual no presenta grups carbonils a la seva estructura molecular, s'utilitzà com a control negatiu. Els resultats mostren que en presència d'L2 l'espectre de l'Mb es manté constant, posant de manifest que no es produeix alliberament de CO i que no es produeixen interferències per la presència dels sistemes agregats. Per contra, en realitzar l'assaig amb els compostos TL2 i PL2 s'observa un increment al pic corresponent a MbCO al llarg del temps (Figura 71) que indica que s'està produint l'alliberament de CO per part dels MTS.



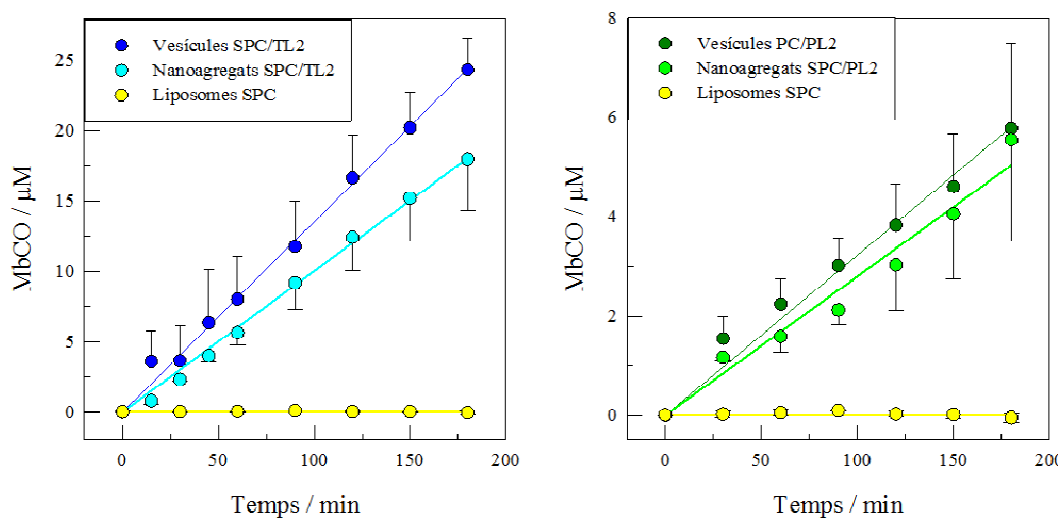
## Resultats



L'evolució de l'espècie MbCO representada en funció del temps per a cada un dels complexos, Figura 71 C), ens permet extreure el valor de les seves velocitats inicials d'alliberament de CO i els temps de vida mitjana, els quals es troben resumits a la Taula 25. Tots dos complexos presenten elevats temps de vida mitjana, fet que resulta interessant donat que el seu ús com a CORMs permetria un alliberament lent i controlat al cos humà.

D'altra banda, es va estudiar l'habilitat dels complexos TL2 i PL2 d'alliberar CO quan es troben en sistemes mixtes SPC/MTS, tant formant agregats vesiculars com nanoagregats. Per cada tipus d'agregat es van estudiar dues relacions molars que proporcionaven diferents tipus d'agregats: vesícules SPC/TL2 3:1 i 3:2 mM/mM; nanoagregats SPC/TL2 3:3 i 3:6 mM/mM; vesícules SPC/PL2 3:4 i 3:6 mol/mol i nanoagregats SPC/PL2 3:10 i 3:15 mM/mM. La concentració final de cada tensioactiu a la solució de Mb, al igual que a l'assaig amb complexos purs, va ser de 250 µM. Els resultats obtinguts per cada tipus d'agregat mostren la mitjana de les dues relacions

molars donat que no es van produir diferències significatives entre ells. Les cinètiques de formació d'MbCO i per tant, d'alliberament de CO, es mostren a la Figura 72 junt amb els controls negatius de liposomes d'SPC. Els valors obtinguts per a les corresponents velocitats inicials d'alliberament i temps de vida mitjana es recullen a la Taula 25.



**Figura 72.** Cinètiques de formació d'MbCO a 37 °C en sistemes mixtes SPC/TL2 i SPC/PL2 formant sistemes vesiculars o nanoagregats. La concentració d'MTS va ser 250 µM. S'utilitzen liposomes d'SPC 3 mM com a control negatiu. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ).

	Alliberament de CO ( $\times 10^4$ ) (mol CO·mol CORM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
<b>TL2 Pur</b>	$3,86 \pm 0,22^{a,e}$	$1300 \pm 84$
<b>Vesícules SPC/TL2</b>	$5,31 \pm 0,10^{a,b,f}$	$942 \pm 21$
<b>Nanoagregats SPC/TL2</b>	$4,17 \pm 0,09^{b,g}$	$1199 \pm 30$
<b>PL2 Pur</b>	$2,22 \pm 0,10^{c,d,e}$	$2253 \pm 111$
<b>Vesícules SPC/PL2</b>	$1,19 \pm 0,07^{c,f}$	$4210 \pm 262$
<b>Nanoagregats SPC/PL2</b>	$1,14 \pm 0,06^{d,g}$	$4398 \pm 238$

**Taula 25.** Velocitat d'alliberament de CO i temps de vida mitjana dels MTS purs i de sistemes mixtes SPC/TL2 i SPC/PL2 formant sistemes vesiculars o nanoagregats a 37 °C. La concentració d'MTS va ser 250 µM. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ( $n \geq 2$ ). Els superíndex indiquen les diferències significatives entre mostres ( $p < 0,05$ ).

## Resultats

S'observa que el complex TL2 és, en qualsevol de les formes estudiades (pur o en sistemes mixtes amb SPC), més ràpid en l'alliberament de CO que el PL2 (Taula 25). D'altra banda, l'alliberament de CO del complex TL2 és lleugerament més ràpid en sistemes vesiculars que en sistemes nanomètrics, però aquests darrers no són significativament diferents del complex pur. (Taula 25). Mentre que per al complex PL2 l'alliberament dels agregats mixtes és més lent que el del complex lliure, sense que es detectin diferències significatives en funció del tipus d'agregat.

No obstant, malgrat l'assaig amb mioglobina és fins ara dels més emprats per a determinar l'alliberament de CO en CORMs, diverses publicacions posen en dubte aquest mètode donat que el ditionit sòdic emprat com a agent reductor pot desencadenar i/o accelerar la reacció.<sup>137</sup> És per aquest motiu que s'han estudiat i posat a punt mètodes alternatius per determinar l'alliberament de CO dels MTS purs i en sistemes mixtes amb SPC.

### **Determinació de l'alliberament de CO mitjançant FTIR**

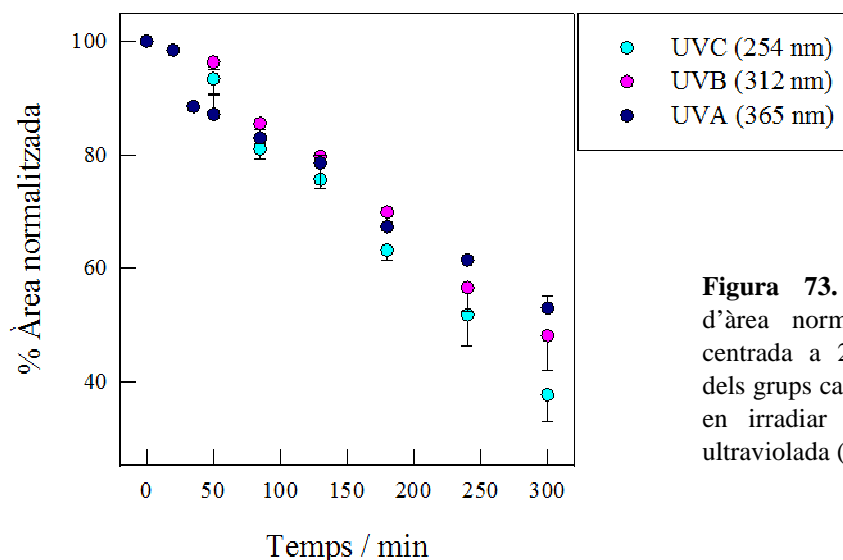
Tal com s'ha vist a l'apartat anterior, els MTS FL2, així com els sistemes mixtes que formen amb fosfolípids, són força estables en solució aquosa i presenten temps de vida mitjana molt llargs. El fet de poder modular l'alliberament de CO fotoquímicament resulta molt atractiu per a aquests compostos, per la qual cosa es va decidir estudiar les seves possibilitats com a molècules alliberadores de monòxid de carboni activades fotoquímicament (PhotoCORMs).

En aquest apartat s'avalua, doncs, la capacitat dels MTS de la família L2 d'alliberar CO en ser irradiats amb llum ultraviolada (UV) i amb llum visible. Aquesta propietat es determina espectrofotomètricament seguint els canvis a les bandes d'IR corresponents als grups carbonils de les molècules, al mateix temps que es segueix l'evolució a les bandes d'absorció a l'UV-VIS. Addicionalment, el CO alliberat es detecta amb la mateixa tècnica però en la fase gasosa, seguint el procediment descrit als mètodes experimentals.

En un primer moment, pel que fa a la posta a punt d'un mètode per determinar l'efecte de la radiació UV sobre els MTS, es van considerar les tres zones amb què es divideix l'ultraviolat, és a dir, UVC (de 280 a 100 nm), UVB (de 315 a 280 nm) i UVA (de 400 a 315 nm). El resultats preliminars, obtinguts pel complex TL2 pur en medi aquós,

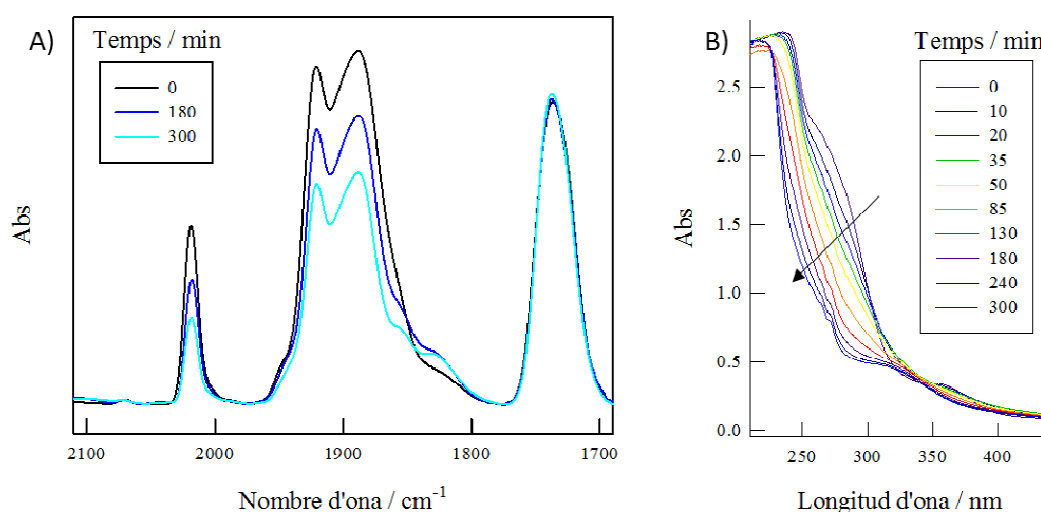


mostren que els tres tipus de radiació UV són actius i que el degraden amb una intensitat que és proporcional a la seva energia (Figura 73). A partir d'aquest resultat, l'estudi es va centrar només en l'efecte dels UVA (a més de la llum visible), ja que són més compatibles per al seu ús en humans que les altres zones de l'UV.



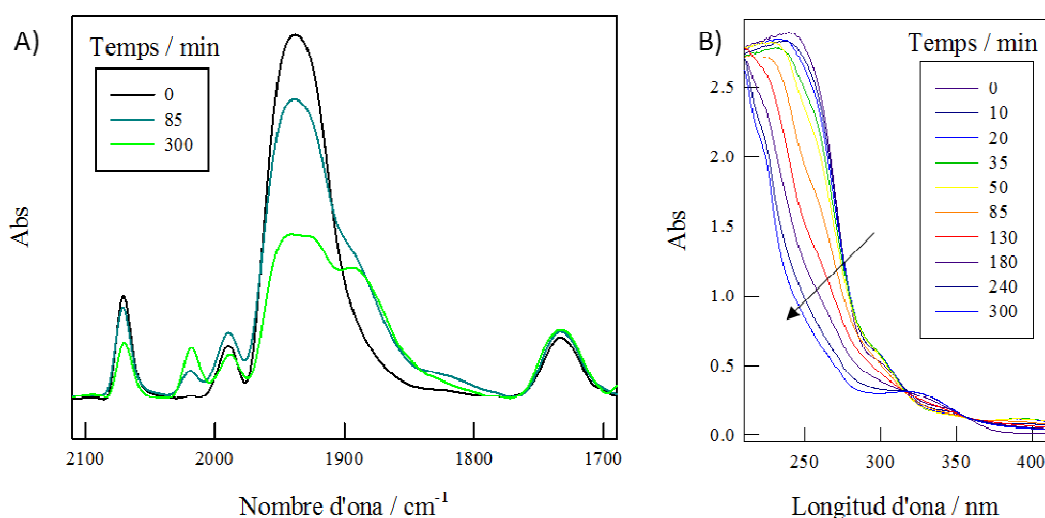
**Figura 73.** Representació del % d'àrea normalitzada per la banda centrada a  $2019\text{ cm}^{-1}$ , característica dels grups carbonils del complex TL2, en irradiar les mostres amb llum ultraviolada (UVC, UVB o UVA).

A les Figures 74 i 75 es mostren, respectivament, l'evolució dels espectres d'IR i UV-VIS en funció del temps d'irradiació amb UVA per a un sistema SPC/TL2 que formi agregats vesiculars (SPC/TL2 30:10 mM/mM), i un sistema SPC/PL2 de nanoagregats (SPC:PL2 3:10 mM/mM).



**Figura 74.** Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS d'agregats vesiculars SPC/TL2 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ( $\lambda_{\text{màx}} = 365\text{ nm}$ ).

## Resultats



**Figura 75.** Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS de nanoagregats PC/PL2 3:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ( $\lambda_{\text{màx}} = 365 \text{ nm}$ ).

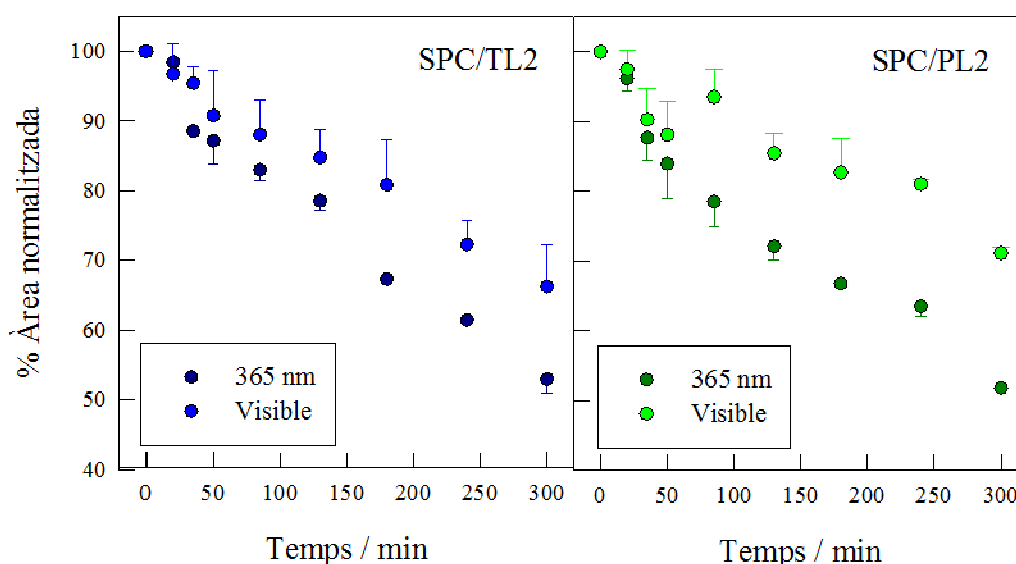
Els espectres d'infraroig es normalitzen amb la banda corresponent al CO del fosfolípid, a  $1730 \text{ cm}^{-1}$ , donat que aquesta banda no es veu afectada en el procés d'irradiació. Aquest fet es va constatar en comparar l'àrea de la banda del CO de l'SPC amb la corresponent al seu grup fosfat (situada al voltant de  $1200 \text{ cm}^{-1}$ ), de manera que es va comprovar que la relació d'àrea entre les dues bandes es mantingué constant durant l'exposició a l'UVA.

A la Figura 74 A) es pot observar un canvi important a les bandes dels grups carbonils del compost TL2 centrades a  $2019 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1921 \text{ cm}^{-1}$  i  $1888 \text{ cm}^{-1}$  com a resultat de la pèrdua de grups CO durant el procés d'irradiació. Pel que fa al sistema SPC/PL2, en ser irradiat amb llum UVA el seu espectre d'IR (Figura 75 A)) mostra canvis significatius a les bandes dels grups carbonils corresponents al complex PL2 centrades a  $2072 \text{ cm}^{-1}$  i  $1937 \text{ cm}^{-1}$ , la qual cosa posa de manifest que el complex de pentacarbonil també perd grups CO. Com a control negatiu es van mantenir a la foscor mostres amb les mateixes relacions molars i concentracions que les estudiades. En aquests casos l'espectre d'IR es va mantenir constant en el temps. En referència als espectres d'UV-VIS pels dos MTS, també s'aprecien importants canvis deguts a la irradiació (Figura 74 B) i 75 B)).

No només la llum UV provoca l'alliberament de CO, ja que aquest procés també té lloc quan les mostres són irradiades amb llum visible (Figura 76). Ara bé, tant per la llum

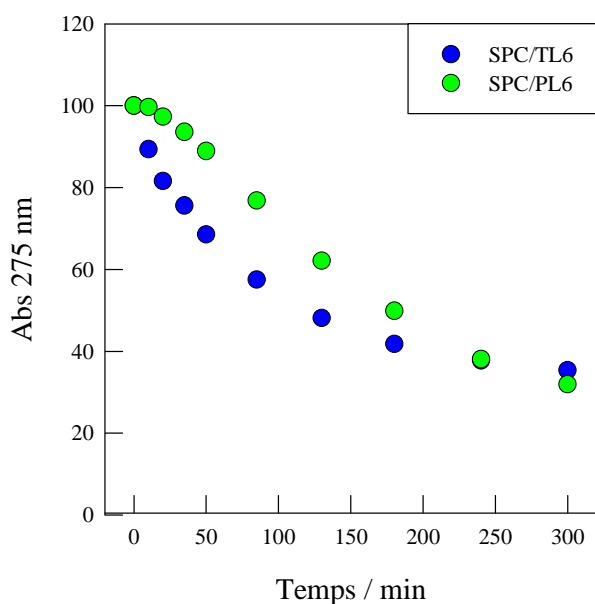
UVA com per la visible, no s'observen diferències significatives en funció del tipus d'agregat estudiat (sistemes vesiculars o nanoagregats) pel que les dades es van tractar de manera conjunta.

La Figura 76 mostra la variació del percentatge d'àrea normalitzada corresponent als pics característics dels grups carbonils per cada complex,  $2019\text{ cm}^{-1}$  i  $2072\text{ cm}^{-1}$  per TL2 i PL2 respectivament. Els sistemes estudiats són: sistemes mixtes SPC/TL2 3:1 (vesiculars) i 5:10 (nanoagregats) mM/mM i sistemes mixtes SPC/PL2 3:1 mM/mM (vesiculars) i 3:10 (nanoagregats) mM/mM. Es pot apreciar com l'alliberament de CO és major en irradiar amb UVA que amb llum visible (Figura 76). D'altra banda, els canvis indicats també es poden seguir a partir de la disminució de l'absorbància a  $275\text{ nm}$ , segons es mostra, per exemple, a la Figura 77 pel cas d'agregats vesiculars SPC/TL2 30:10 mM/mM irradiats amb UVA.



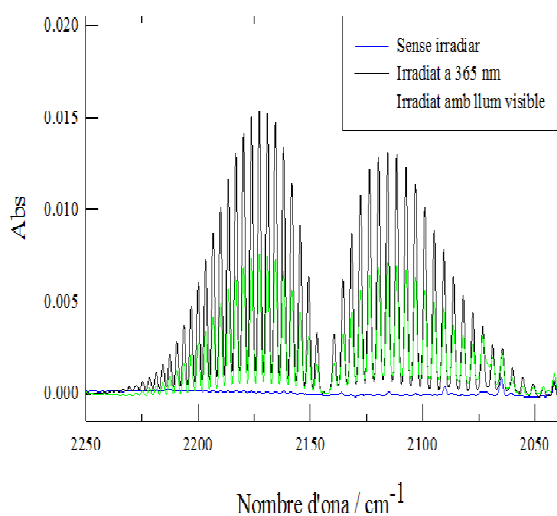
**Figura 76.** Representació del % d'àrea normalitzada d'una banda CO característica de cada complex en irradiar amb llum UVA o llum visible (A) sistemes mixtes SPC/TL2 i (B) sistemes mixtes SPC/PL2.

## Resultats



**Figura 77.** Variació de l'absorbància a 275 nm d'agregats vesiculars SPC/TL2 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ( $\lambda_{\text{màx}}= 365$  nm).

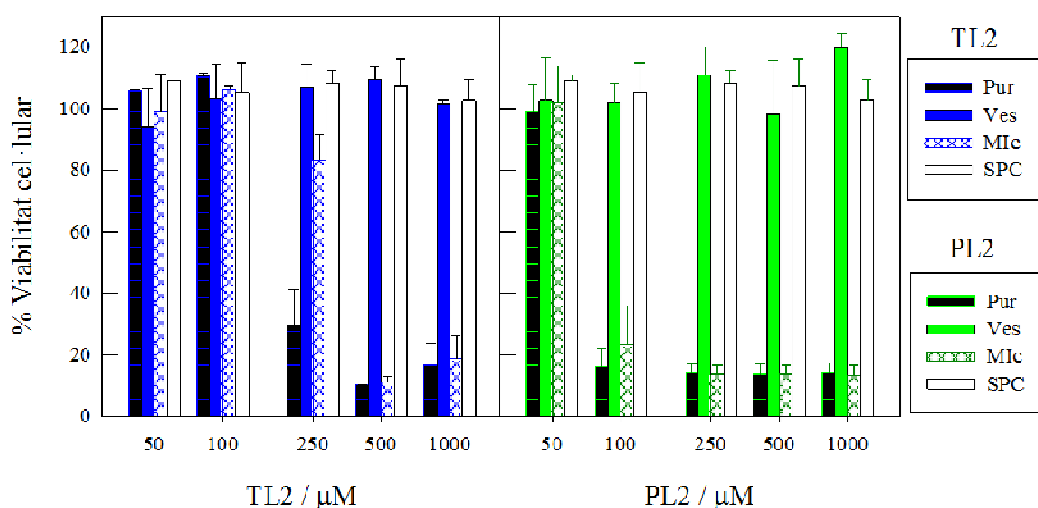
D'altra banda, la literatura descriu que en ocasions els CORMs poden alliberar  $\text{CO}_2$  en lloc de  $\text{CO}$ ,<sup>138</sup> pel que és necessari determinar quin gas és el que es desprèn. La circumstància referida es va avaluar a través de l'espectre de vibració-rotació del  $\text{CO}$  en la fase gasosa (entre  $2250$  i  $2050 \text{ cm}^{-1}$ ) d'una cel·la tancada on es diposita una mostra, la qual és irradiada durant 60 minuts amb llum UVA o visible. L'espectre IR de la Figura 78 mostra l'espectre característic del  $\text{CO}_{(\text{g})}$  en un sistema SPC/PL2 3:1 mM/M (vesicular) d'una mostra mantinguda a la foscor, una irradiada amb llum UVA i una altra amb llum visible, evidenciant un cop més i sense cap mena de dubte que els MTS de la família L2 poden ser classificats com PhotoCORMs.



**Figura 78.** Bandes vibracionals del monòxid de carboni detectat a la fase gasosa en contacte amb una suspensió del sistema mixt PC/PL2 3:1 mM/mM mantinguda en la foscor o exposada a irradiació UVA o visible.

#### 4.2.1.10. Toxicitat

La toxicitat dels MTS de la família L2 es va avaluar mitjançant un assaig amb XTT en cultius cel·lulars de fibroblasts humans (Apartat 3.5.2.). La determinació es va dur a terme afegint-hi concentracions creixents dels complexos TL2 o PL2 en estat pur, i de sistemes mixtes SPC/MTS formant agregats vesiculars (metal·losomes) o de nanoagregats mixtes SPC/MTS. Les lectures, realitzades després de 24h d'incubació amb les mostres, van proporcionar els resultats que es mostren a la Figura 79, els quals posen de manifest que els sistemes mixtes vesiculars són molt menys tòxics que els nanoagregats o el complex pur. També es pot observar que el complex PL2 resulta ser més nociu que el complex TL2 quan aquests són afegits en la seva forma pura o en sistemes nanoagregats.



**Figura 79.** Percentatge de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig amb XTT, en fibroblasts humans, en funció de la concentració de MTS i del tipus d'agregat.

Per tant, els metal·losomes obtinguts amb els dos complexos de la família L2 no són tòxics a la concentració més alta avaluada, 1000 µM, amb valors de viabilitat comparables als causats per liposomes composts únicament per SPC. Els metal·losomes, per tant, són entre 10 i 20 vegades menys tòxics que els sistemes mixtes de nanoagregats o que el corresponent complex pur.



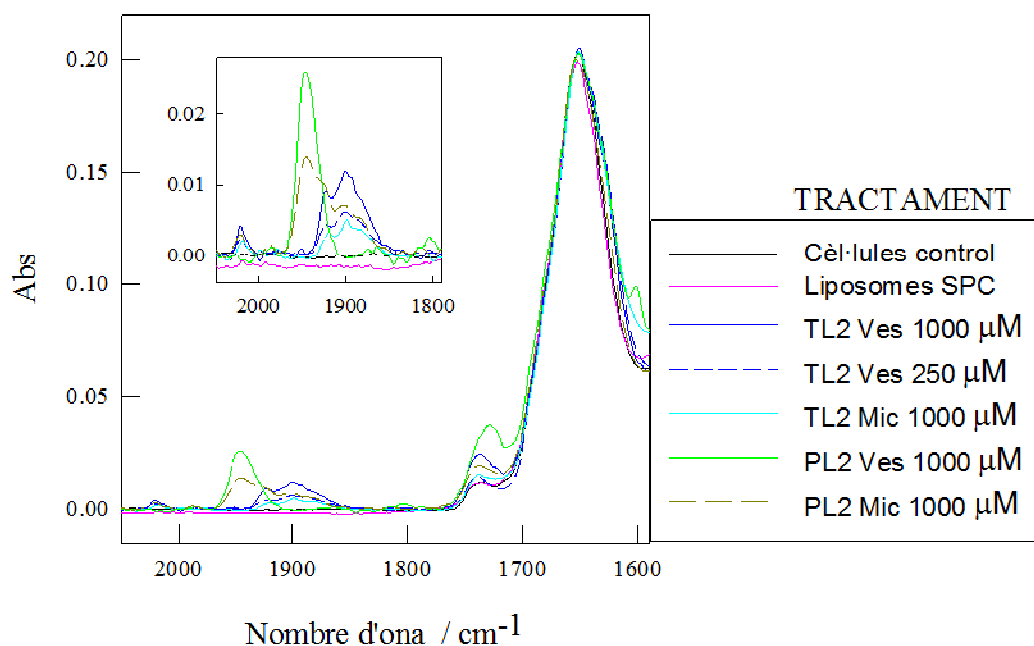
## *Resultats*

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

En aquest apartat s'avalua la capacitat dels sistemes mixtes SPC/TL2 o SPC/PL2 d'interaccionar amb sistemes biològics.

Les cèl·lules es van incubar sobre finestres d'IR amb sistemes vesiculars d'SPC/TL2 30:10 mM/mM, nanoagregats d'SPC/TL2 5:10 mM/mM, metal·losomes d'SPC/PL2 30:10 mM/mM, i nanoagregats d'SPC/PL2 3:10 mM/mM durant 12 h. Les concentracions finals de complex als tractaments van ser 250 i 1000  $\mu$ M pel compost TL2, i 100 i 1000  $\mu$ M en el cas del PL2.

Les finestres d'IR amb les cèl·lules tractades i fixades es van analitzar amb  $\mu$ -FTIR amb llum sincrotró com a font de radiació a la línia MIRAS del sincrotró ALBA, a Cerdanyola del Vallès, amb la col·laboració de la Dra. Núria Benseny. Les bandes vibracionals característiques dels grups carbonils dels MTS es van detectar clarament en alguns tractaments donat que apareixen a una zona ben separada de les bandes corresponents a estructura cel·lular. Va ser possible detectar-les a la concentració d'incubació més alta per tots dos compostos (1000  $\mu$ M) i en qualsevol dels sistemes estudiats (metal·losomes o nanoagregats), mentre que es van detectar amb menor freqüència en el cas de les incubacions realitzades a una concentració de TL2 250  $\mu$ M en metal·losomes. La detecció de les bandes posa en evidència la presència de complexos a les cèl·lules. A la Figura 80 es mostra la mitjana d'alguns espectres enregistrats on s'observen bandes d'absorció a l'IR pròpies dels complexos. Els espectres van ser normalitzats pel màxim d'absorció de proteïna a la banda de l'amida I centrada a 1654  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 80.** Espectres d'IR dels cultius cel·lulars de fibroblasts humans fixats després d'incubar-los amb diversos sistemes agregats. Gràfic inserit: ampliació de la regió on apareixen les bandes vibracionals dels grups carbonils dels complexos TL2 i PL2.

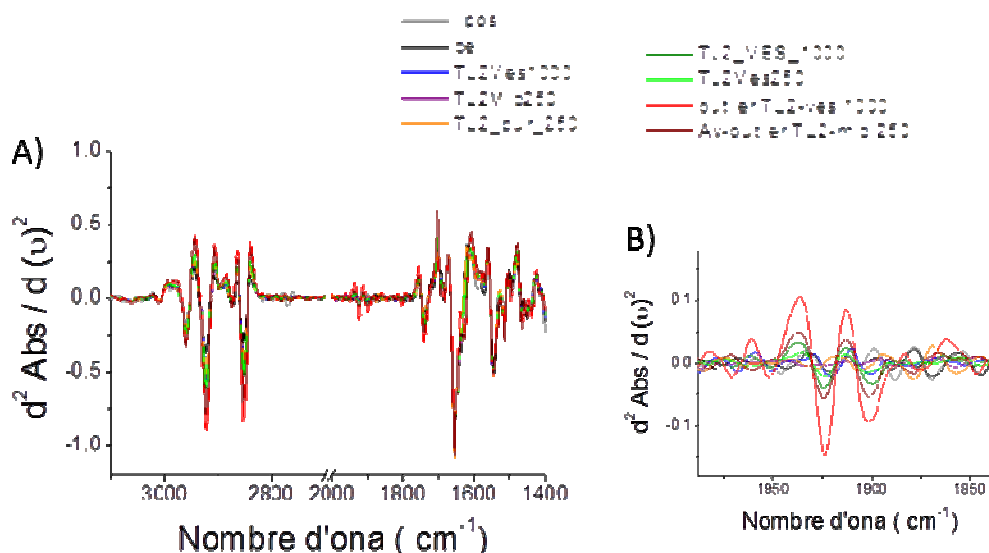
### Anàlisi estadístic de les bandes més rellevants

Amb l'objectiu de realitzar l'anàlisi estadístic de les dades obtingudes, els espectres d'IR són tractats per regions. Les assignacions de les bandes d'absorció típiques corresponents a components cel·lulars són ben conegudes. Generalment, es considera la zona corresponents als lípids, les cadenes hidrocarbonades dels quals absorbeixen entre 2700 i 3000  $\text{cm}^{-1}$ , i una altra zona que rep el nom de *Fingerprint*, corresponent a proteïnes, fosfats, DNA i sucres, amb les bandes localitzades entre 1800 i 1300  $\text{cm}^{-1}$ , zona que també dona informació sobre l'oxidació lipídica (banda centrada a aproximadament 1739  $\text{cm}^{-1}$ ). Ara bé, en el present treball s'han expandit les dues zones indicades, de manera que la dels lípids s'ha ampliat fins a 3150  $\text{cm}^{-1}$ , donat que entre 3150 i 3000  $\text{cm}^{-1}$  es detecten, en alguns espectres, bandes probablement degudes a productes de descomposició dels complexos. I pel que fa a la zona *Fingerprint*, es va ampliar lleugerament, situant-la entre 2100 i 1300  $\text{cm}^{-1}$ . D'aquesta manera s'inclouen també les bandes vibracionals dels grups carbonils dels complexos.

Aquestes regions es normalitzen respecte la banda de l'amida I (1654  $\text{cm}^{-1}$ ) a partir de la segona derivada dels espectres originals i es comparen en funció del tractament aplicat a

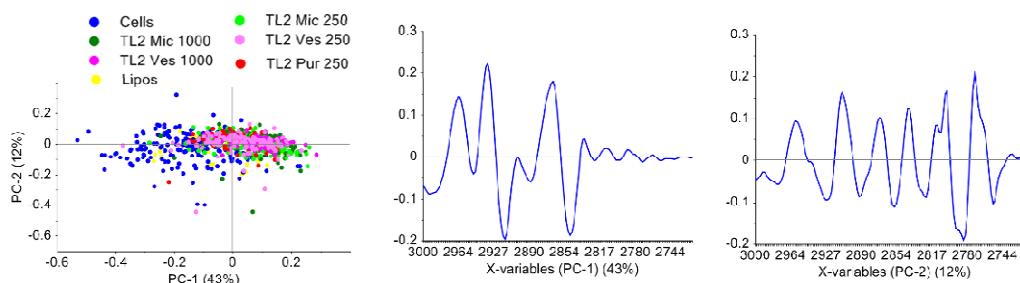
## Resultats

les cèl·lules. La Figura 81 mostra les segones derivades de la mitjana dels espectres per cada tractament (control, liposomes i agregats vesiculars o micel·lars a dues concentracions diferents) amb el complex TL2.

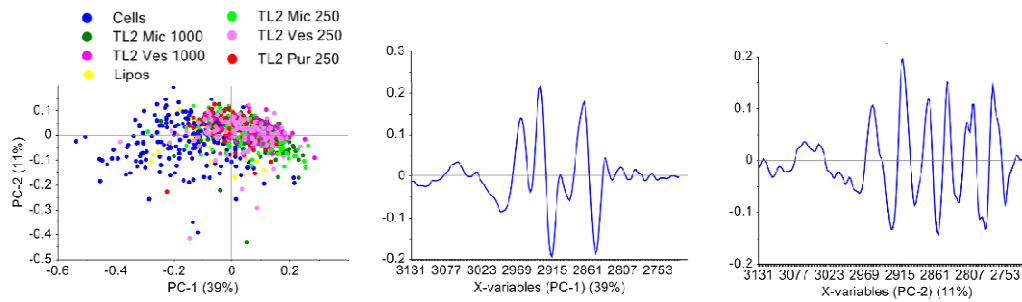


**Figura 81.** A) Espectres normalitzats de la segona derivada de la mitjana dels espectres de cultius cel·lulars sense tractar, tractats amb liposomes, o amb complex TL2 en diferents condicions. B) Ampliació de la zona on apareixen les bandes dels grups carbonils del complex TL2.

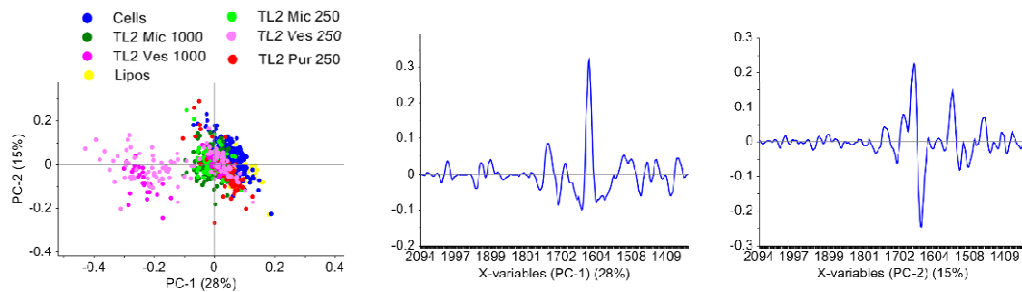
L'anàlisi estadística de les dades es fa, doncs, per regions mitjançant *Principal Component Analysis* (PCA) (Figures 82-84 per TL2 i Figura 85-87 per PL2). Els gràfics permeten detectar clares diferències entre les cèl·lules sense tractament i les tractades amb qualsevol dels compostos, essent aquests canvis més evidents per les concentracions de complex més elevades.



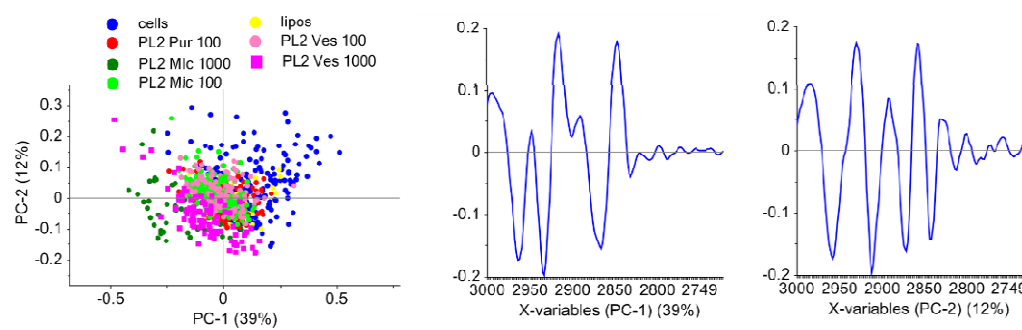
**Figura 82.** Anàlisi estadística (PCA) de la regió del lípid 1 dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex TL2.



**Figura 83.** Anàlisi estadística (PCA) de la regió del lípid 2 dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex TL2.

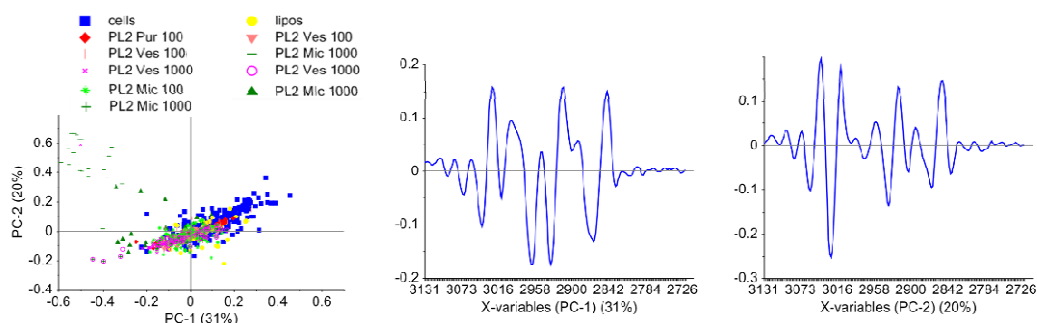


**Figura 84.** Anàlisi estadística (PCA) de la regió *fingerprint* dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex TL2.

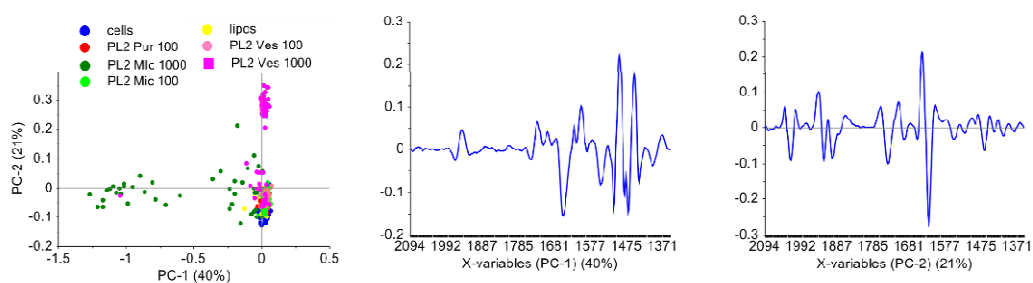


**Figura 85.** Anàlisi estadística (PCA) de la regió del lípid 1 dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex PL2.

## Resultats

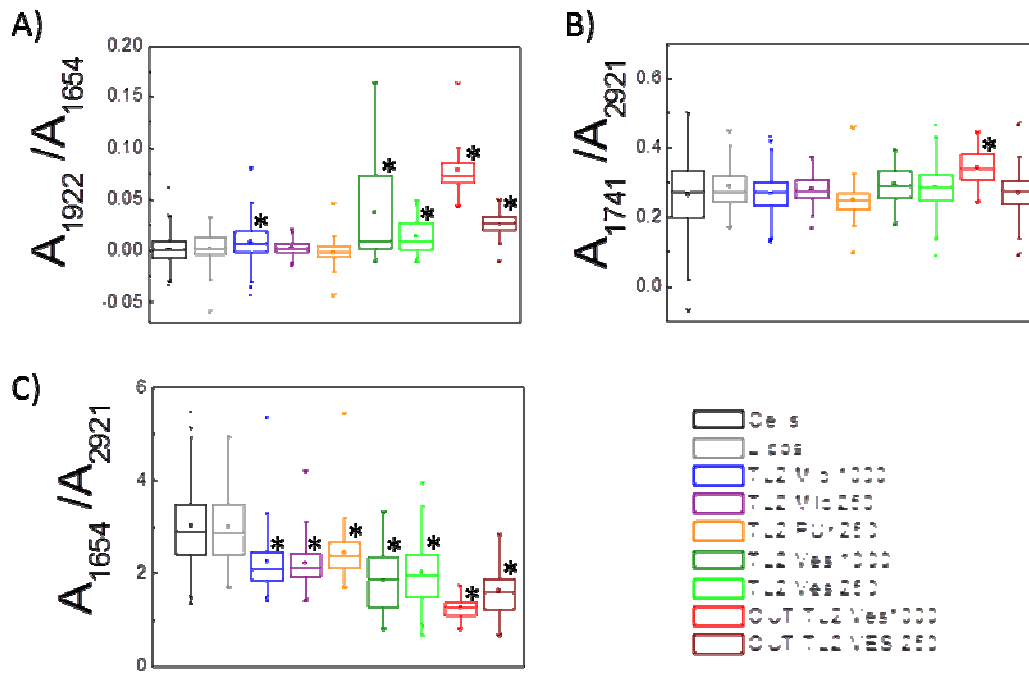


**Figura 86.** Anàlisi estadística (PCA) de la regió del lípid 2 dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex PL2.

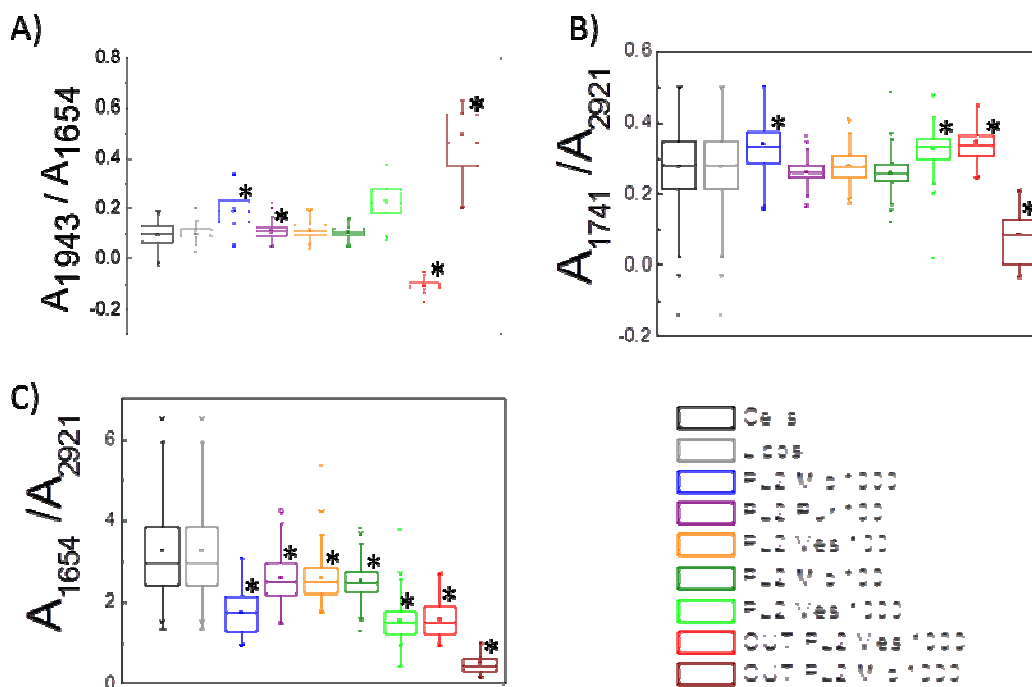


**Figura 87.** Anàlisi estadístic (PCA) de la regió *fingerprint* dels espectres enregistrats amb diferents tipus de tractament amb el complex PL2.

L'estudi de PCA, permet indentificar les diferències entre els diferents grups d'espectres i, un cop identificades les bandes que les originen, aquelles que presenten rellevància biològica s'estudien amb més detall. Les bandes corresponents a estructura cel·lulars que es veuen afectades són:  $-\text{CH}_3$  dels lípids ( $\sim 2962 \text{ cm}^{-1}$ ),  $-\text{CH}_2$  dels lípids ( $\sim 2921 \text{ cm}^{-1}$ ), aldehyd ( $\sim 1739 \text{ cm}^{-1}$ ) per estimar l'oxidació lipídica, i l'amida I ( $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$ ) de les proteïnes. Del complex TL2 s'estudien les bandes del CO centrades a  $1922$  i  $2021 \text{ cm}^{-1}$ , mentre que del complex PL2 la banda a  $1943 \text{ cm}^{-1}$ . A partir de les intensitats de la segona derivada es calculen els quocients següents: a) les bandes corresponents als CO dels MTS normalitzades entre la banda de l'amida I, que s'empra per detectar la presència del complex; la banda de l'aldehyd front la corresponent als  $-\text{CH}_2$ , que avalua l'oxidació lipídica; i, finalment, la relació lípid/proteïna. Els resultats es mostren al BoxPlot de la Figura 88 (complex TL2) i 89 (complex PL2).



**Figura 88.** BoxPlot corresponents a les incubacions amb TL2. Les relacions entre les bandes més rellevants corresponen a: A) Relació entre la banda del complex TL2 i l'amida I; B) Relació entre la banda aldehyd i els  $-CH_2$ ; i C) Relació entre la banda amida I i els  $-CH_2$ . \* Valors significativament diferents respecte el control ( $p \leq 0.01$ ).



**Figura 89.** BoxPlot corresponents a les incubacions amb PL2. Les relacions entre les bandes més rellevants corresponen a: A) Relació entre la banda del complex TL2 i l'amida I; B) Relació entre la banda aldehyd i els  $-CH_2$ ; i C) Relació entre la banda amida I i els  $-CH_2$ . \* Valors significativament diferents respecte el control ( $p \leq 0.01$ )



## Resultats

Els gràfics del PCA ens donen una idea qualitativa de la diferència que hi ha entre els espectres en funció del tractament. S'observa que als PCA de les regions de lípid 1 i lípid 2 els espectres corresponents a cèl·lules tractades amb qualsevol de les condicions estudiades es troben lleugerament separats dels corresponents al control de cèl·lules sense tractar, allunyant-se més aquells on la concentració de complex és més alta. Al PCA del *fingerprint* del complex TL2 (Figura 84) hi ha dos grups que es troben marcadament separats (*outliers*) que corresponen als tractaments amb SPC/TL2 vesicular a 250 i 1000  $\mu\text{M}$ . El Box Plot de la Figura 88 ens permet avaluar de forma més quantitativa aquest efecte. La relació entre les bandes 1922/1654 ens indica la presència del complex a les cèl·lules, on es pot apreciar que l'efecte és major a la concentració més alta. La relació entre les bandes 1741/2921 ens indica l'oxidació lipídica deguda probablement a processos d'estres oxidatiu per la presència del complex, fenomen que el cas del complex TL2 no resulta gaire significatiu. I en referència al quocient I1654/I2921, el seu decrement indicaria una major presència de lípid a le cèl·lules a conseqüència de la internalització dels metal·losomes i/o micel·les.

Pel que fa al complex PL2, el PCA de la regió *fingerprint* mostra també dos grups que se separen, corresponents a sistemes vesiculars i micel·lars a concentració 1000  $\mu\text{M}$ . L'anàlisi del Box Plot ens indica la presència de complexos (Figura 89 A)) i oxidació lipídica (Figura 89 B)) a les concentracions més altes. La disminució del quocient I1654/I2921 tornaria a indicar un increment de la quantitat de lípids amb cadenes hidrocarbonades dins les cèl·lules. D'altra banda, alguns espectres corresponents a cèl·lules tractades amb SPC/PL2 vesicular mostraven bandes centrades a 3025  $\text{cm}^{-1}$  que podrien correspondre a productes de descomposició.