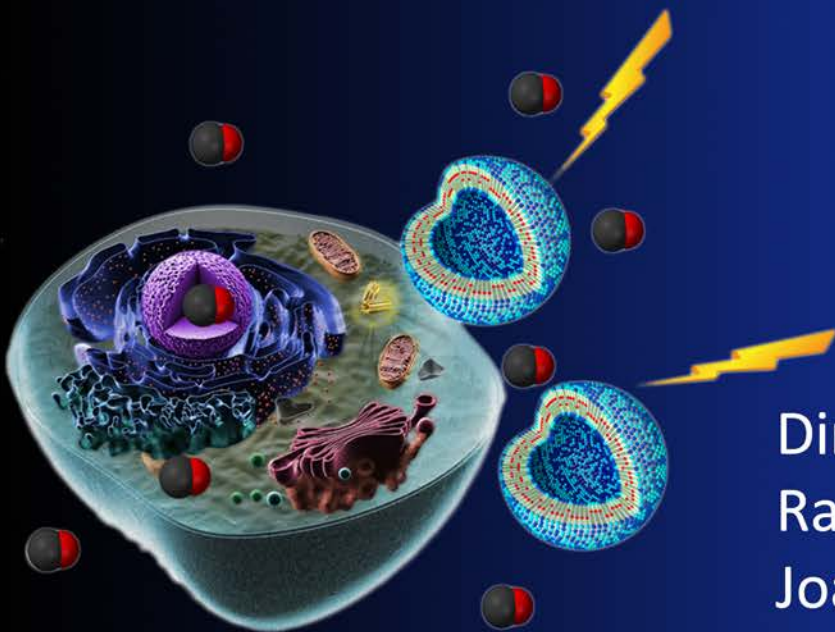


Metal·lotensioactius i fosfolípids: estudi d'agregats supramoleculars com a sistemes alliberadors de monòxid de carboni

Maribel Marín García

Tesi Doctoral
2017



Directors:
Ramon Barnadas Rodríguez
Joan Suades Ortuño

4.2.2. COMPOSTOS DE LA FAMÍLIA L6 (FL6)

4.2.2.1. DETERMINACIÓ DE LA CMC

En aquest apartat s'estudien les propietats d'agregació dels tensioactius FL6. La cmc de cada un dels compostos es determina, tal i com s'ha detallat pels compostos FL2, mitjançant l'anàlisi dels espectres de fluorescència en diluir paulatinament suspensions d'aquests tensioactius. La Figura 90 mostra els espectres dels tres compostos (ligand L6, tetracarbonil TL6 i pentacarbonil PL6) a diferents concentracions i la relació d'intensitats normalitzada entre les bandes que presenten més variació en cada cas.

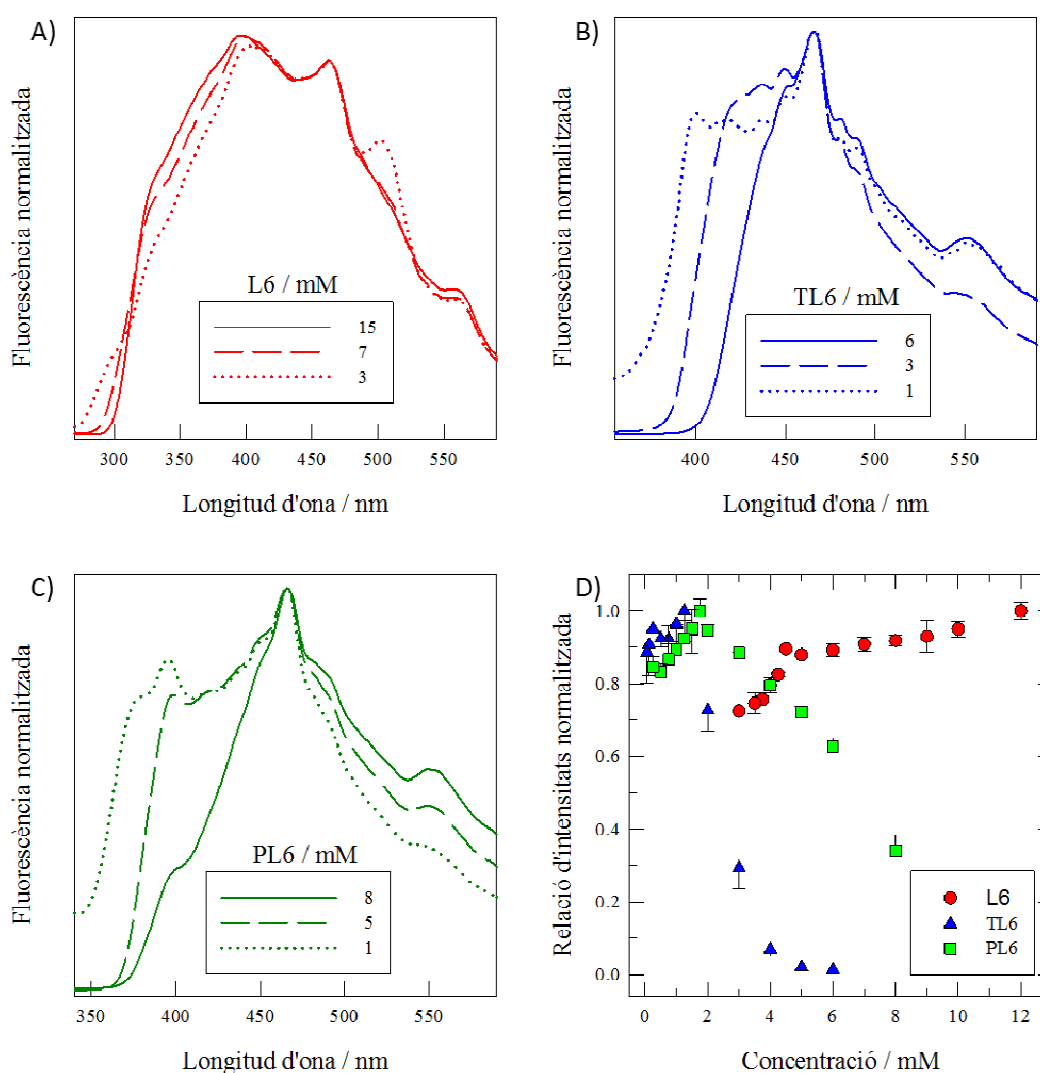


Figura 90. Espectres de fluorescència normalitzats dels compostos FL6: A) Lligand L6, $\lambda_{exc} = 250$ nm; B) Complex TL6, $\lambda_{exc} = 305$ nm; C) Complex PL6, $\lambda_{exc} = 305$ nm. D) Relació d'intensitats normalitzada referida al valor màxim (L6: I330/I464, TL6 i PL6: I396/I466) en funció de la concentració de tensioactiu. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 3$).

Resultats

Les longituds d'ona d'excitació i la relació d'intensitats emprades en la determinació d'aquest paràmetre per cada un dels compostos es detallen a la Taula 25, on també s'inclouen els valors de cmc obtinguts amb aquesta tècnica alhora que es comparen amb els determinats anteriorment mitjançant tensiometria.^{46, 123}

	$\lambda_{exc} / \text{nm}$	Relació d'intensitats	cmc (mM) Fluorescència	cmc (mM) Tensiometria
L6	250	I330 / I464	4,3	4,0
TL6	305	I396 / I466	1,2	0,8
PL6	305	I396 / I466	1,6	1,2

Taula 25. Longitud d'ona d'excitació, màxims d'emissió triats per la relació d'intensitats i cmc dels compostos FL6 obtinguda mitjançant fluorescència i tensiometria.

Com pot apreciar-se a la Figura 90 D), el quocient d'intensitats obtingut per al lligand L6 mostra un canvi bruscat de pendent en arribar a una concentració de 4,3 mM, en el cas del complex TL2 la transició es produeix a més baixa concentració, al voltant de 1,2 mM, mentre que el complex PL2 presenta aquest punt a una concentració d'1,6 mM. Les cmc determinades mitjançant fluorescència presenten valors lleugerament superiors als determinats mitjançant tensiometria.

4.2.2.2. PROPIETATS TENSIOACTIVES. SOLUBILITZACIÓ DE LIPOSOMES

Aquest apartat descriu la capacitat dels compostos FL6 per solubilitzar liposomes d'SPC. Els resultats obtinguts mitjançant DLS i turbidimetria (Figura 91) mostren que en afegir els compostos L6 o PL6, fins i tot a concentracions superiors a la seva cmc, la mida dels liposomes es manté durant més de 72 h i no s'observen canvis en el valor d'absorbància a 600 nm. Per contra, el complex TL6, que té dues cadenes hidrocarbonades amb 6 àtoms de carboni, és capaç de solubilitzar els liposomes a concentracions superiors a la seva cmc en tant sols 3 h, obtenint-se sistemes nanoagregats mixtes entre les concentracions de 4 i 6 mM de complex. Per sobre d'aquesta concentració es detecten agregats de mida micromètrica. En les mesures d'absorbància s'observa el mateix efecte: el valor d'absorbància és mínim entre 4 i 6 mM de TL6 i augmenta bruscament per sobre de 6 mM. Els resultats posen de manifest que tant el lligand L6 com el complex PL6 són tensioactius febles donat que els

liposomes no són solubilitzats a concentracions de tensioactiu molt superiors a la seva cmc, a diferència del complex TL6, que si aconsegueix la seva solubilització.

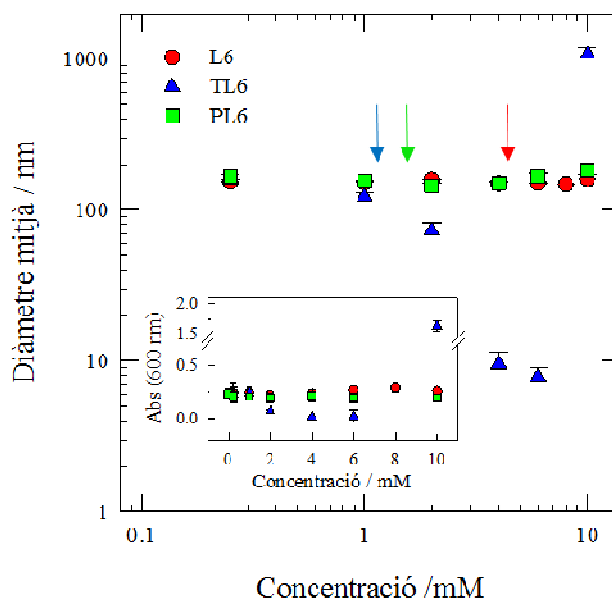


Figura 91. Diàmetre mitjà de les mescles de liposomes (SPC 3 mM final) amb concentracions creixents de compostos FL6. Les fletxes indiquen la cmc de cada compost. Gràfic inserit: densitat òptica a 600 nm. Els punt mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 3$).

4.2.2.3. DETERMINACIÓ DE LA MIDA D'AGREGATS MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE DLS

Les dades obtingudes per a la determinació mitjançant DLS de la mida d'agregats tant purs com sistemes mixtes amb SPC obtinguts a partir de films, es presenten a la Figura 92. Els compostos purs en solució aquosa formen agregats compatibles amb estructures vesiculars, la mida dels quals és independent de la concentració. Amb el lligand L6 s'obtenen agregats d'entre 200 i 400 nm de diàmetre, mentre que els complexos TL6 i PL6 formen agregats de mida micromètrica. D'altra banda, com es pot apreciar, en aquesta família de compostos el tipus d'agregat del sistema mixt obtingut en funció de la concentració de tensioactiu varia significativament d'un compost a un altre. Així, doncs, pel lligand L6 s'observa que inicialment, en l'interval de concentracions entre 1 i 8 mM de compost, el diàmetre dels sistemes mixtes es manté al voltant d'una micra, un valor superior al detectat per dispersions de lligand pur en aigua (~ 200-500 nm). Tot seguit es produeix un canvi dràstic, de manera que en arribar a un valor de concentració de 10 mM només es detecten nanoagregats.

Resultats

Pel que fa al compost TL6, el diàmetre dels agregats obtinguts decreix ràpidament i progressiva en augmentar la concentració de complex, tal i com s'havia vist pels compostos de cadena més curta a l'apartat 4.1.2.3., fins a arribar a un punt on es formen nanoagregats (relacions molars SPC/TL6 entre 3:3 i 3:4 mM/mM). Per sobre de 4 mM de complex és tornen a obtenir agregats micromètrics, amb diàmetres molt similars als obtinguts per als sistemes formats per TL6 pur.

Finalment, la mida dels agregats dels sistemes mixtes SPC/PL6 es manté constant tot i augmentar la concentració de tensioactiu, presentant dues poblacions. Al voltant del 80 % dels agregats SPC/PL6 presenten diàmetres propers a la micra, mentre que la mida del 20 % restant és, aproximadament, de 100 nm, al igual que els agregats formats únicament per complex PL6 pur, en el que també es detecten les mateixes poblacions amb proporcions similars. A la dreta de la Figura 92 es pot apreciar com el seguiment de l'absorbància a 600 nm dels sistemes mixtes SPC/tensioactiu mostra la mateixa tendència que el diàmetre mitjà d'aquests agregats en funció de la concentració. L'absorbància decreix abruptament ja amb la menor quantitat de tensioactiu emprada (SPC/tensioactiu 3:1 mM/mM), fet que posa de manifest la seva incorporació a la membrana. Als sistemes mixtes SPC/PL6 el valor d'absorbància augmenta lleugerament tot i que el diàmetre mitjà es manté constant, aquest fet és degut a l'absorbància pròpia del complex, com es pot veure al gràfic inserit. Pel que fa a la mida, tots els sistemes es mantenen estables durant més de 15 dies. Finalment, en addicionar Triton X-100 a concentració de solubilització (concentració final 10 mM) s'obtenen micel·les mixtes.

Els estudis d'estabilitat en funció de la dilució pels diferents tipus d'agregats obtinguts per sistemes mixtes d'SPC amb els compostos d'aquesta família, representats a la Figura 93, mostren que els agregats mixtes SPC/L6 o SPC/TL6, ja siguin sistemes vesiculars o nanoagregats, són estables en diluir-los dos ordres de magnitud. Pel que fa al complex PL6 (que en el rang estudiat no mostra l'existència de sistemes nanoagregats), els sistemes vesiculars on la proporció d'SPC és superior a la de tensioactiu és mantenen estables. En canvi, la mida dels agregats vesiculars amb elevada proporció de complex, amb una relació SPC/PL6 3:10 mM/mM o major d'MTS, (indicats com PL6 Ves*) disminueix progressivament en ser diluïts, passant d'un diàmetre mitjà inicial d'uns 700 nm fins a arribar a tenir una mida al voltant dels 250 nm.

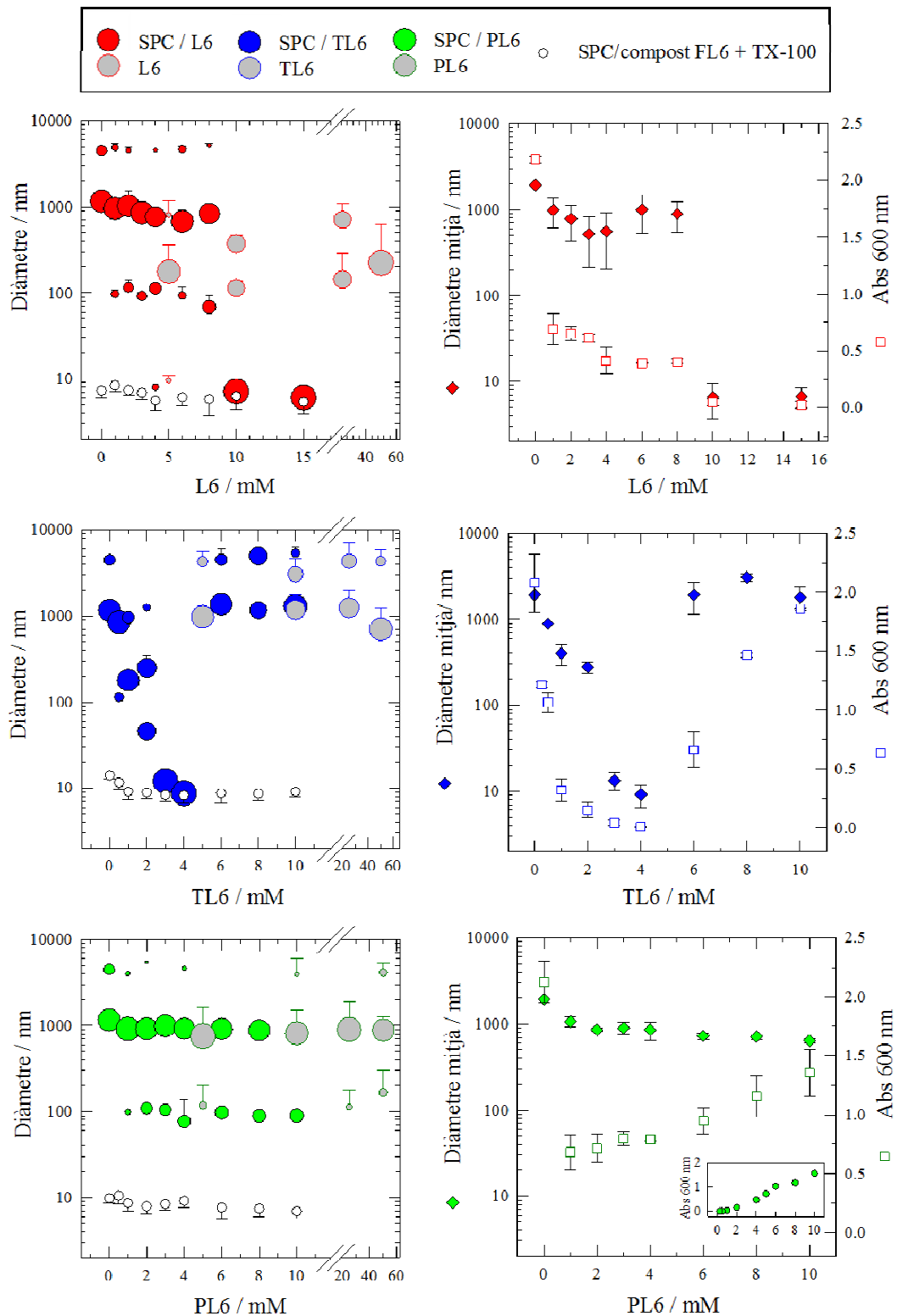


Figura 92. Distribució de mida de poblacions (la mida del cercle indica el percentatge de cada població), diàmetre mitjà i valor d'absorbància a 600 nm per sistemes mixtes SPC/tensioactiu en funció de la concentració de compostos FL6. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Gràfic inserit: absorbància del complex PL6 pur (l'eix de coordenades es correspon amb el de la figura en el què es troba inserit). Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 3$).

Resultats

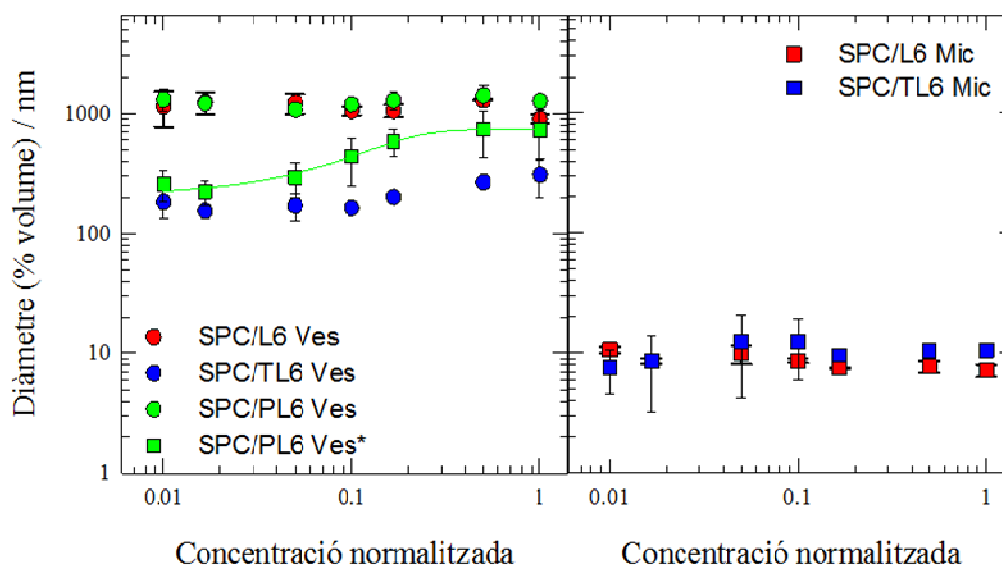


Figura 93. Mida dels agregats obtinguts en diluir sistemes mixtes SPC/tensioactiu en funció de la concentració normalitzada. La composició inicial dels sistemes és la següent: SPC/L6 Ves, 18:6 mM/mM; SPC/TL6 Ves, 36:12 mM/mM; SPC/PL6 Ves, 36:12 mM/mM; SPC/L6 Mic, 1,8:6 mM/mM; SPC/TL6 Mic, 12:12 mM/mM i SPC/PL6 Ves*, 3,6:12 mM/mM. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

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

Les imatges corresponents als agregats dels compostos purs FL6, obtingudes a una concentració superior a la seva cmc, es mostren a la Figura 94. S'observa que a les dispersions de lligand L6 hi ha bàsicament vesícules unilamel·lars de mida gran, amb diàmetres que varien entre els 200 nm i 1 μ m, fet que coincideix amb els valors obtinguts mitjançant DLS. Pel que fa al complex TL6, el nombre d'agregats per camp de visió va ser molt petit i la seva detecció no va resultar fàcil. Les fotografies obtingudes bàsicament mostren petites vesícules unilamel·lars entre 30 i 100 nm de diàmetre, tot i que també poden apreciar-se fragments de membranes que podrien correspondre a vesícules micromètriques. Aquests resultats són totalment contraris als obtinguts amb DLS, on només es detecten agregats de l'ordre de micres. Ara bé, cal tenir en compte que si els agregats presents a la mostra són molt grans, poden quedar retinguts al paper de filtre en el procés de *blotting* durant la preparació de la reixeta. Finalment, pel que fa al complex PL6, a les imatges es poden visualitzar agregats

MVVs amb diàmetres majoritàriament situats al voltant de 800 nm, resultats coherents amb les dades de DLS.

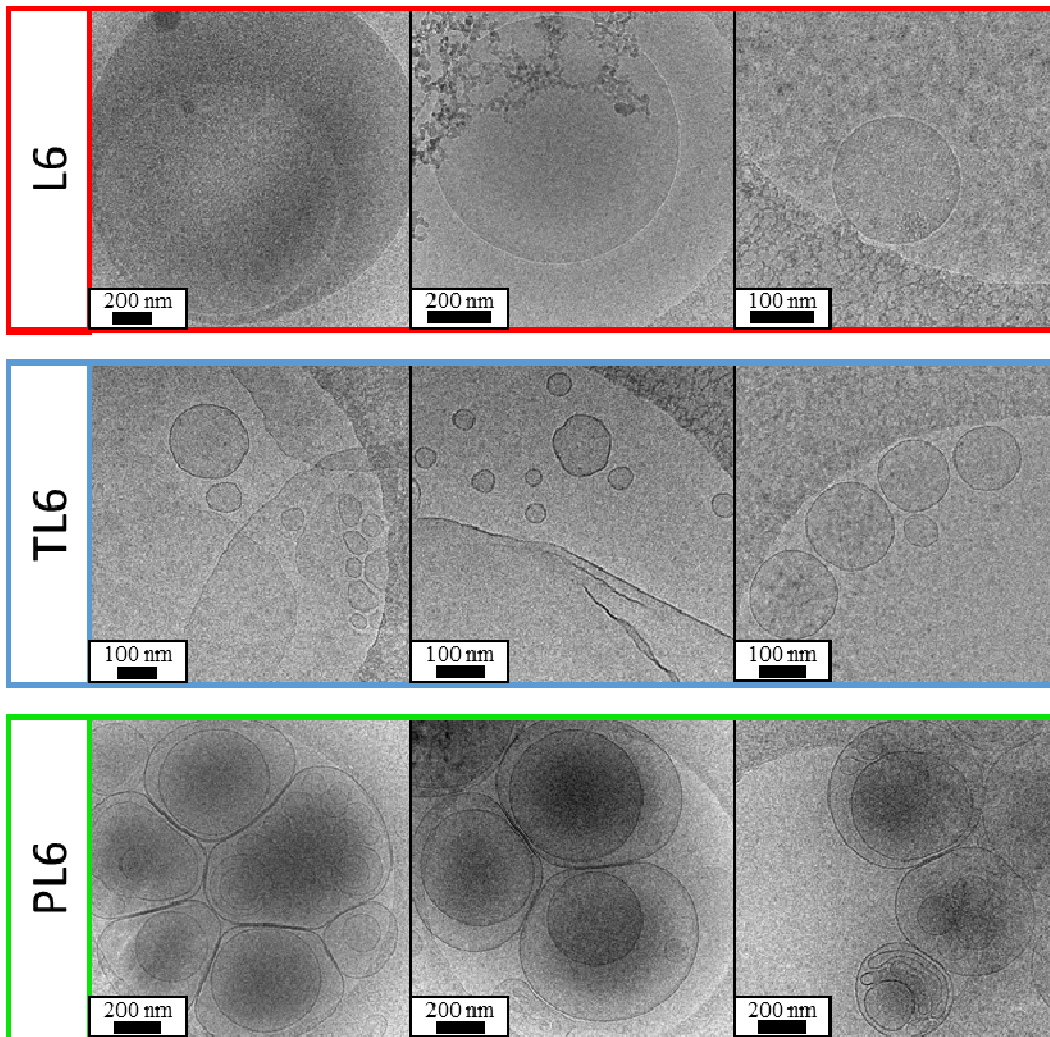


Figura 94. Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats dels compostos FL6 purs en aigua. Concentració: lligand L6 50 mM; complex TL6 20 mM; i complex PL6 20 mM.

Pel que fa als sistemes mixtes SPC/MTS d'aquesta família de compostos, les fotografies dels agregats d'SPC amb el complex TL6 a baixes concentracions (relació SPC/TL6 3:1 mM/mM) presenten diversos tipus d'agregats. Es poden distingir MVVs de diàmetres micromètrics així com vesícules unilamel·lars de mida variada entre 100 i 800 nm, alguns dels quals presenten forma el·lipsoïdal, resultats que es corresponen amb els diàmetres obtinguts per DLS (Figura 95). D'altra banda, en augmentar la concentració fins a una relació equimolar SPC/TL6, s'observen agregats nanomètrics, com era d'esperar tenint en compte les dades de diàmetre determinades a l'apartat 4.2.2.3. A les fotografies de *cryo*-TEM d'aquest sistema mixt es detecten estructures circulars d'uns

Resultats

15-20 nm de diàmetre i estructures lineals de la mateixa mida (veieu ampliació a la Figura 95), que podrien correspondre a sistemes bicel·lars. Tot i així, també és possible visualitzar alguna vesícula petita d'aproximadament 50 nm.

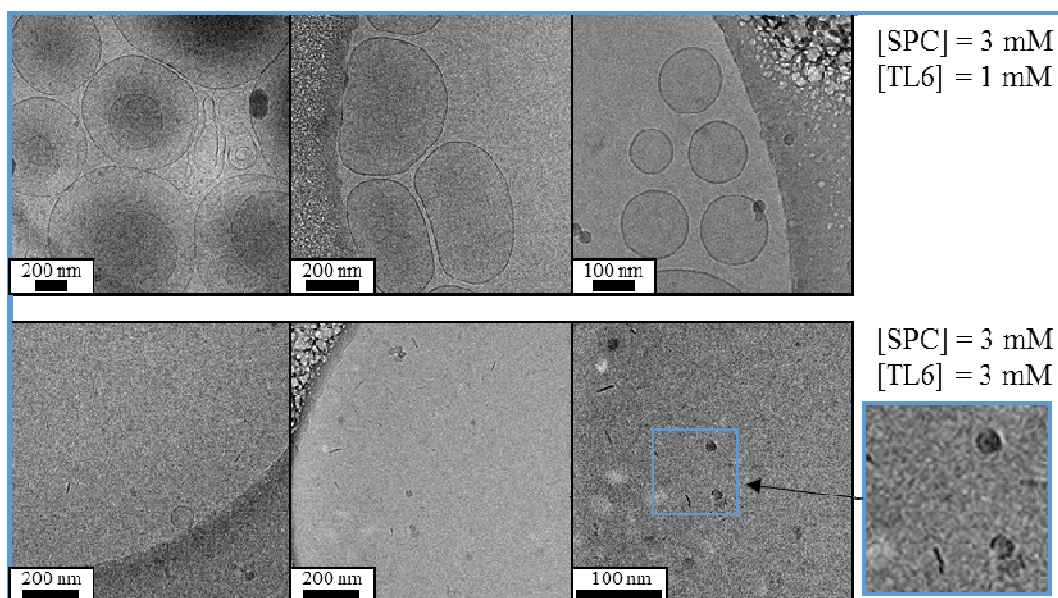


Figura 95. Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/TL6 en aigua. A la dreta es presenta una ampliació on es poden visualitzar estructures compatibles amb la presència de sistemes bicel·lars.

Els sistemes mixtes SPC/TL6 a elevades concentracions de complex (relació SPC/TL6 3:10 mM/mM) també van ser estudiats mitjançant *cryo*-TEM. Tot i això, malgrat els esforços dedicats, no va ser possible detectar cap tipus d'estructura amb aquesta tècnica, probablement degut als elevats valors de diàmetre que presenten. La circumstància referida es va poder escatir mitjançant microscòpia òptica. A la Figura 96 es mostren algunes imatges d'aquest sistema mixt, que forma agregats amb formes tubulars i de mida molt gran, superior al límit de detecció de l'aparell de DLS i que deuen ser eliminades de les preparacions de microscòpia durant el *blotting*.

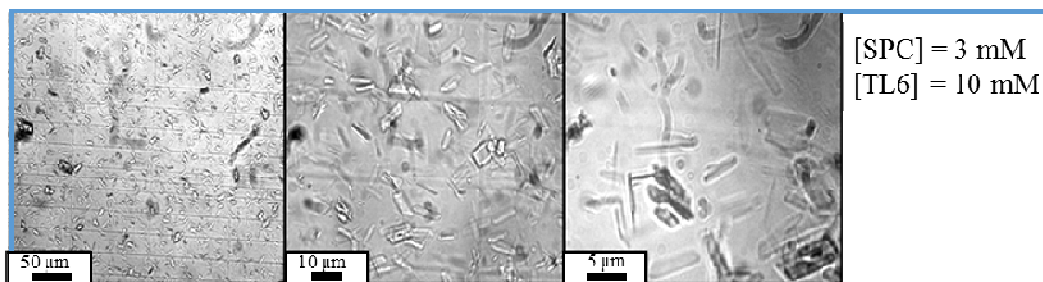


Figura 96. Fotografies de microscòpia òptica dels agregats de sistemes mixtes SPC/TL6 3:10 mM/mM en aigua. Imatges obtingudes l'IQAC-CSIC en col·laboració amb el Dr. Ramon Pons.

Finalment, els sistemes mixtes SPC/PL6 que mitjançant DLS no mostraven canvi de mida en incrementar la quantitat d'MTS, situant-se al voltant d'una micra de diàmetre, es poden visualitzar a les fotografies presentades a la Figura 97. A les imatges del sistema SPC/PL6 3:2 mM/mM s'observen bàsicament agregats micromètrics MVVs, alguns dels quals amb una quantitat molt elevada de petites vesícules al seu interior. També es detecta alguna MLV. En augmentar la concentració de complex fins a una proporció SPC/PL6 3:10 mM/mM es continuen observant sistemes MVVs de mida gran tot i que les bicapes d'aquests agregats presenten certes deformacions i les mostres són més opaques i originen imatges més fosques.

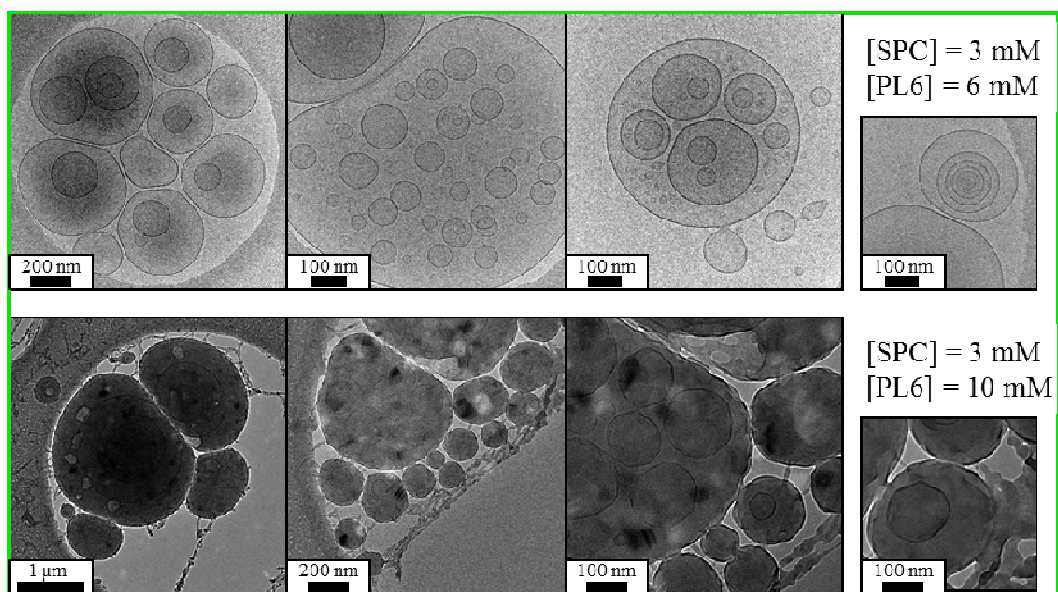


Figura 97. Fotografies de *cryo*-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/PL6 en aigua.

4.2.2.5. PERMEABILITAT DELS AGREGATS MIXTES SPC/MTS

La Figura 98 mostra els resultats dels estudis de permeabilitat a la piranina dels sistemes mixtes formats per SPC i els tensioactius FL6. En tots els casos, en augmentar la proporció de compost els agregats esdevenen més permeables, posant de manifest que la inserció dels tensioactius a la membrana lipídica altera les seves propietats. Els sistemes mixtes SPC/L6 amb relació molar 3:4 perden al voltant del 30 % del seu contingut en 6 h, mentre que els sistemes mixtes SPC/TL6 3:2 mM/mM i SPC/PL6 3:3 mM/mM tenen una pèrdua de fluorescència del 80 % en el mateix temps.

Resultats

La quantificació de la permeabilitat dels agregats es porta a terme a partir del valor de $t_{1/2}$ calculat per interpolació amb les dades experimentals (Figures 98 i 99) seguint el procediment descrit a l'apartat 4.2.1.5. pels compostos FL2.

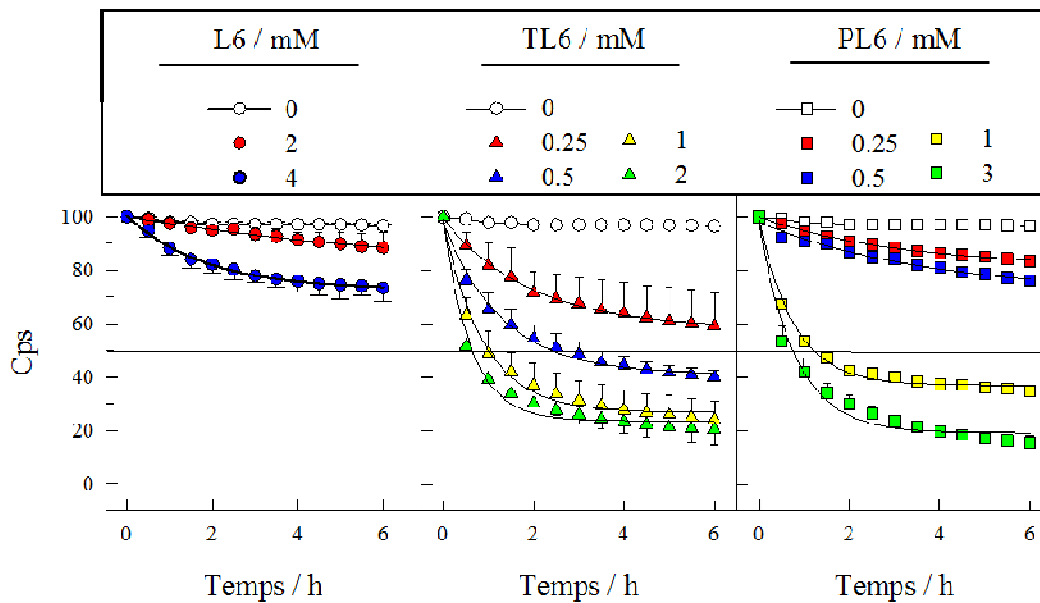


Figura 98. Gràfics de permeabilitat dels agregats mixtes SPC/compostos FL6. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punt mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

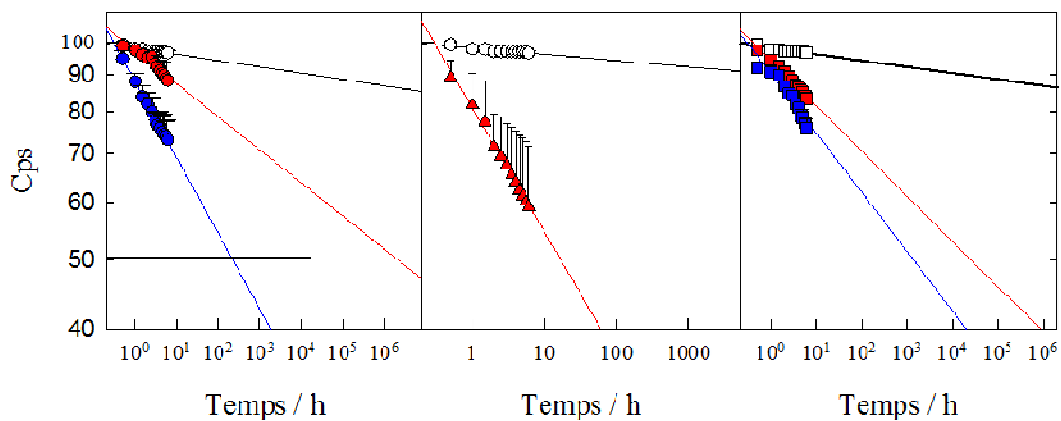


Figura 99. Representacions doble logarítmiques emprades per obtenir el $t_{1/2}$ en el sistemes poc permeables a la piranina. La llegenda és la mateixa que la de la Figura 98. Els punt mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

La comparació dels $t_{1/2}$ (Figura 100) indica que l'alteració de les propietats barrera de la membrana fosfolipídica té lloc en el següent ordre: TL2 > PL2 >> L2.

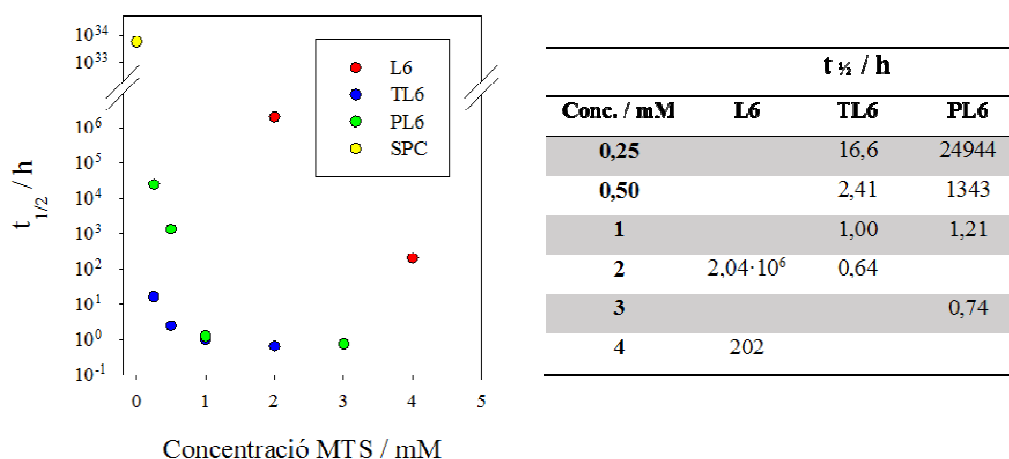


Figura 100. Representació dels $t_{1/2}$ en funció de la concentració de tensioactiu en sistemes mixtes SPC/tensioactiu FL6. A la taula es mostren els valors de $t_{1/2}$ obtinguts amb les diferents formulacions.

4.2.2.6. VOLUM ENCAPSULAT DELS AGREGATS MIXTES SPC/MTS

Els resultats obtinguts per a la determinació de volum encapsulat per als sistemes mixtes SPC/tensioactius FL6 es mostren a la Figura 101. Per a qualsevol dels compostos d'aquesta família, els sistemes mixtes a baixa concentració presenten un major volum encapsulat que els liposomes purs d'SPC, fet que pot ser explicat per la menor quantitat de bicapes dels agregats mixtes en comparació amb liposomes MLVs. El màxim volum encapsulat per als sistemes mixtes és $2,4 \pm 0,3$ l solució/mol lípid per als sistemes SPC/L6 3:1 mM/mM; $2,8 \pm 0,1$ l solució/mol lípid per als sistemes SPC/TL6 3:1 mM/mM; i $2,4 \pm 0,5$ l solució/mol lípid per als sistemes SPC/PL6 3:0,5 mM/mM.

A partir d'aquest valor màxim, en augmentar la concentració de compost el volum encapsulat disminueix fins a arribar a un valor crític a partir de la qual és zero. El lligand L6 mostra aquest límit a una concentració de 8 mM, valor coherent amb els resultats de DLS, donat que a partir d'aquest punt únicament es detecten sistemes nanomètrics. En el cas del complex TL6, el volum encapsulat esdevé zero a partir d'una concentració de 3 mM, valor a partir del qual, com s'ha vist, primer s'obtenen nanoagregats i, posteriorment, agregats micromètrics. I pel que fa al complex PL6 no es detecta volum encapsulat a partir de la concentració 6 mM de complex.

Cal destacar que als sistemes mixtes SPC/TL6 i SPC/PL6 amb elevades concentracions de complex no es detecta volum encapsulat tot i que les mesures mitjançant DLS i les imatges de cryo-TEM posen de manifest la presència de sistemes de mida gran.

Resultats

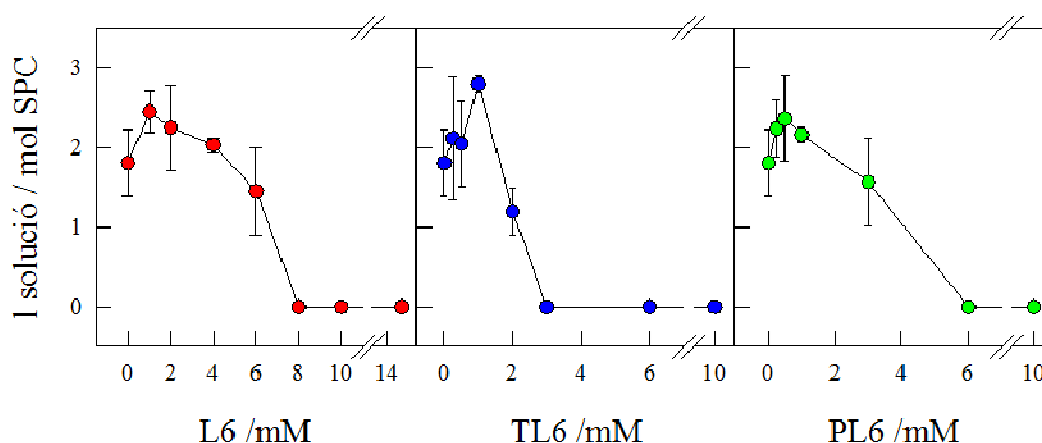


Figura 101. Volum encapsulat dels agregats mixtes formats per SPC i compostos FL6. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

4.2.2.7. POTENCIAL Z

Els valors de potencial Z determinats per als sistemes mixtes SPC/tensioactius FL6 (Figura 102), al igual que els seus compostos homòlegs de cadena més curta, esdevenen més negatius que el dels liposomes purs (-18 mV), un comportament lògic si es té en compte la càrrega negativa del grup sulfonat dels tensioactius.

Com s'observa, es detecten canvis de tendència als valors de potencial Z en funció de la concentració dels tensioactius, canvis que poden relacionar-se amb el tipus d'agregat present a cada mostra. Així doncs, als sistemes mixtes SPC/L6 s'aprecia una tendència decreixent del potencial fins a arribar a un valor de -53 mV a una concentració d'L6 6 mM. A partir d'aquest punt, on comencen a formar-se nanoagregats, el potencial creix lleugerament.

Al complex TL6, el valor de potencial és mínim (-60 mV) a la concentració més baixa avaluada i creix gradualment en augmentar la concentració de complex fins a arribar a un valor proper al del complex pur a una concentració de 10 mM (-34 mV).

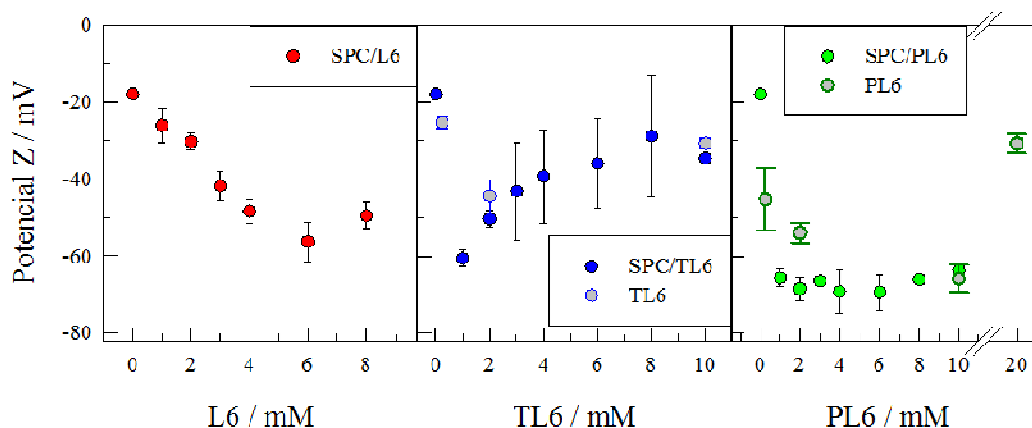


Figura 102. Potencial Z dels agregats mixtes formats per SPC i compostos FL6. La concentració d'SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

Finalment, el potencial Z dels sistemes mixtes SPC/PL6 no mostra canvis a partir del primer valor mínim assolit, situant-se a un valor d'uns -65 mV, que és també el del potencial del complex pur a una concentració de 10 mM.

4.2.2.8. ALLIBERAMENT DE CO

Assaig amb mioglobina

L'alliberament de CO per part del lligand L6 i dels MTS TL6 i PL6 s'estudià mitjançant l'assaig amb mioglobina descrit als mètodes experimentals, amb una concentració de tensioactius de 250 μ M. El lligand L6 va ser emprat com a control negatiu ja que no presenta grups carbonil a la seva estructura.

La Figura 103 mostra l'evolució de l'espectre de Mb durant la seva conversió de DesoxyMb a MbCO, en afegir els complexos carbonílics, així com la cinètica d'alliberament de CO. Els resultats indiquen que els MTS FL6 presenten temps de vida mitjana molt llargs, donat que la concentració de MbCO no arriba a 20 μ M passades 3 h des de l'addició dels MTS.

El mateix tipus d'assaig va ser emprat per a estudiar l'habilitat dels complexos TL6 i PL6 d'alliberar CO quan es troben en sistemes mixtes SPC/MTS, tant formant agregats vesiculars com nanoagregats (micel·les i/o bicel·les).

Resultats

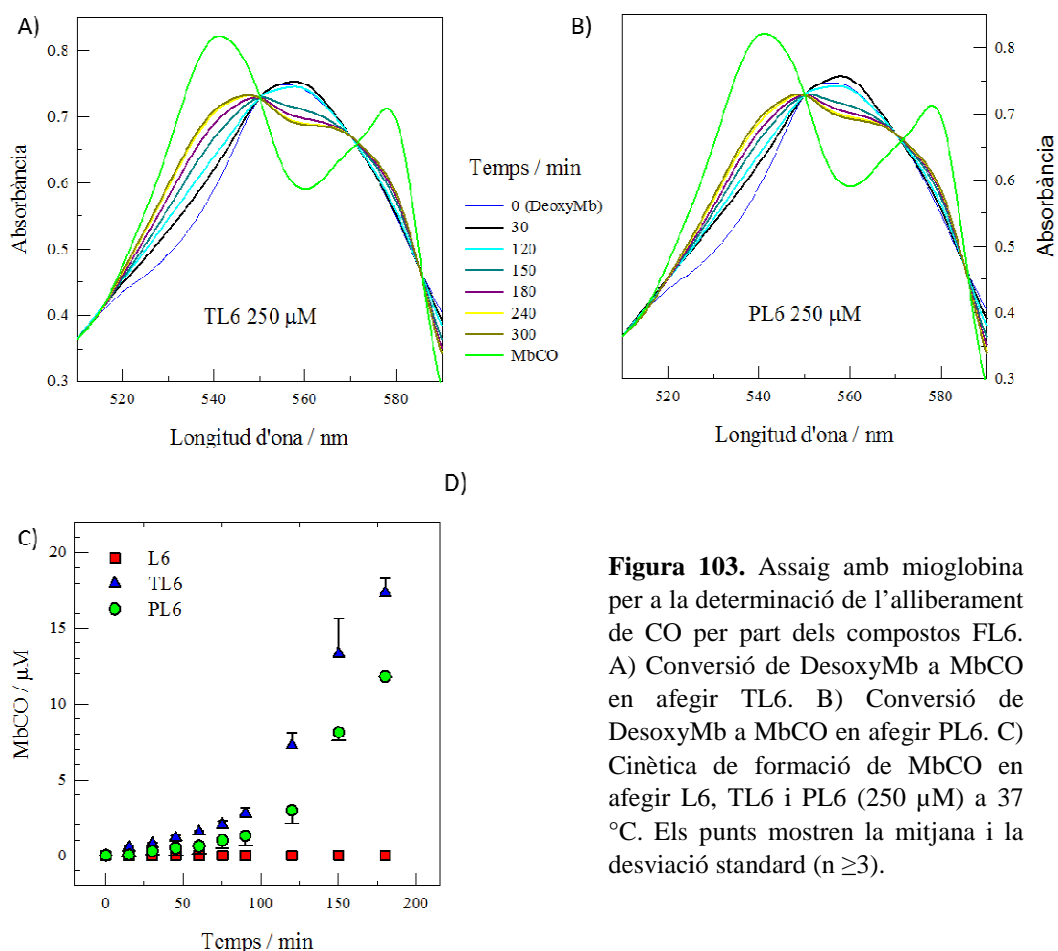


Figura 103. Assaig amb mioglobina per a la determinació de l'alliberament de CO per part dels compostos FL6. A) Conversió de DesoxyMb a MbCO en afegir TL6. B) Conversió de DesoxyMb a MbCO en afegir PL6. C) Cinètica de formació de MbCO en afegir L6, TL6 i PL6 (250 µM) a 37 °C. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard (n ≥ 3).

Consegüentment, els sistemes estudiats han estat: vesícules SPC/TL6 3:1 mM/mM; nanoagregats SPC/TL6 3:3 mM/mM; vesícules SPC/PL6 3:1 mM/mM i vesícules amb elevat contingut de complex (Ves*) SPC/PL6 3:10 mM/mM. La concentració final de cada tensioactiu a la solució d'Mb, al igual que a l'assaig amb complexos purs, va ser de 250 µM. Les cinètiques de formació d'MbCO, i per tant, d'alliberament de CO, es mostren a la Figura 104 junt amb els controls negatius de liposomes d'SPC.

Dels resultats obtinguts es pot concloure que els MTS de la família L6, tant en forma de monòmer (sistemes purs) com formant agregats mixtes amb fosfolípids en solució aquosa, tenen la capacitat d'alliberar monòxid de carboni, presentant temps de vida mitjana llargs. D'altra banda, tant als sistemes purs com als mixtes, es pot observar que el complex tetracarbonílic allibera CO més ràpidament que el complex pentacarbonílic.

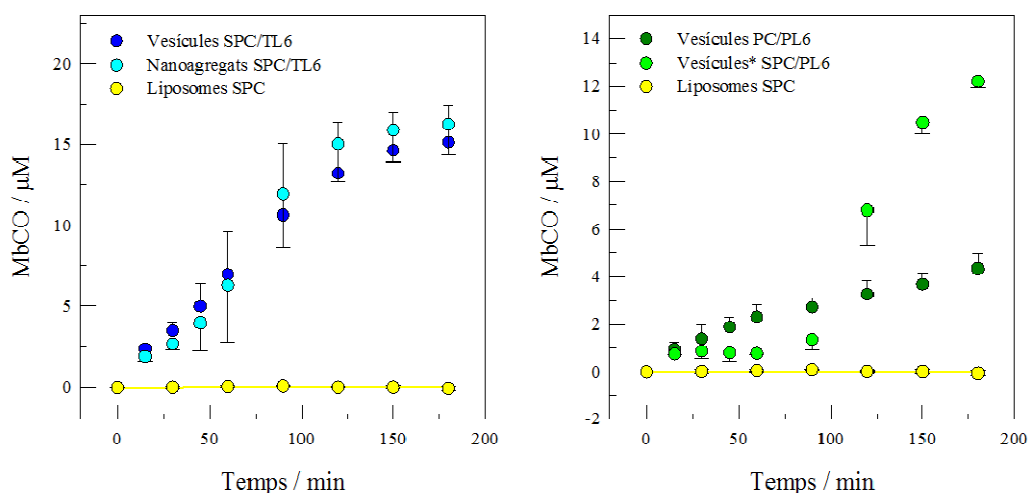


Figura 104. Cinètiques de formació d'MbCO en sistemes mixtes SPC/TL6 i SPC/PL6 formant sistemes vesiculars o nanoagregats. S'utilitzen liposomes d'SPC 3 mM com a control negatiu. La concentració de MTS va ser 250 µM. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

Determinació de l'alliberament de CO mitjançant FT-IR

En aquest apartat s'estudia el potencial dels sistemes mixtes SPC/MTS FL6 per a ser emprats com a photoCORMs. Aquesta propietat s'avalua mitjançant irradiació de les diferents formulacions amb llum UVA, a 365 nm, i visible, analitzant-se posteriorment els canvis produïts a les bandes d'IR corresponents als grups carbonils dels complexos, alhora que s'observa l'evolució de les bandes a l'espectre UV-VIS.

A les Figures 105 i 106 es mostra, respectivament, l'evolució dels espectres d'IR i UV-VIS en funció del temps d'irradiació per a un sistema SPC/TL6 de nanoagregats (SPC/TL6 10:10 mM/mM), i un sistema SPC/PL6 vesicular (SPC/PL6 30:10 mM/mM).

Tal i com es pot apreciar a la Figura 105 A), el complex TL6 presenta canvis significatius a les bandes corresponents als grups carbonils centrades a 2017 cm^{-1} , 1918 cm^{-1} i 1898 cm^{-1} . Pel que fa al complex PL6, es produeixen canvis a les bandes centrades a 2070 cm^{-1} i 1941 cm^{-1} (Figura 106 A). Els espectres dels sistemes mixtes mantinguts a la foscor, emprats com a control negatiu, no van mostrar canvis durant 5 h, posant de manifest que els complexos són estables en solució aquosa, com a mínim, durant aquest període de temps. A les Figures 105 B) i 106 B) s'aprecien els canvis als espectres d'UV-VIS durant el procés d'irradiació de les mostres.

Resultats

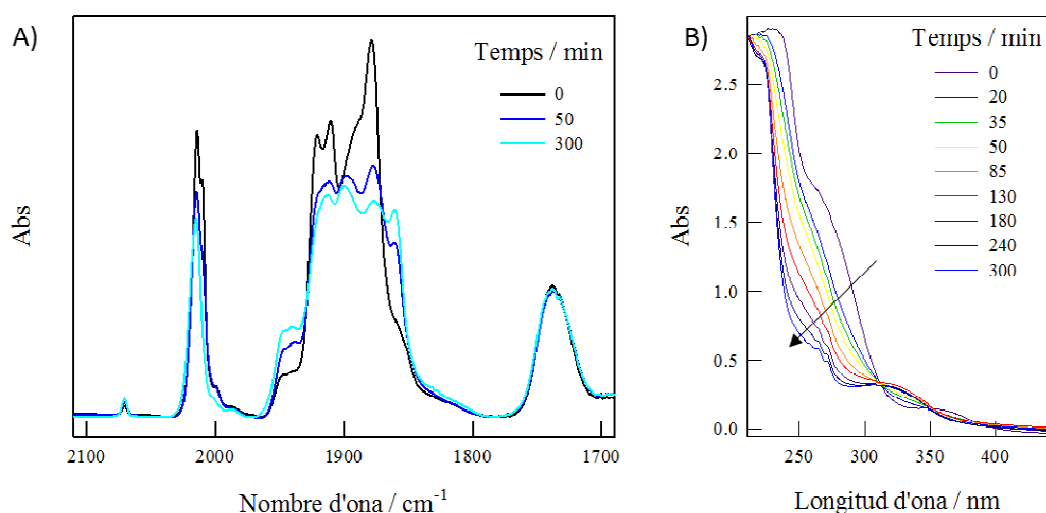


Figura 105. Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS de nanoagregats SPC/TL6 10:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ($\lambda_{\text{màx}} = 365$ nm).

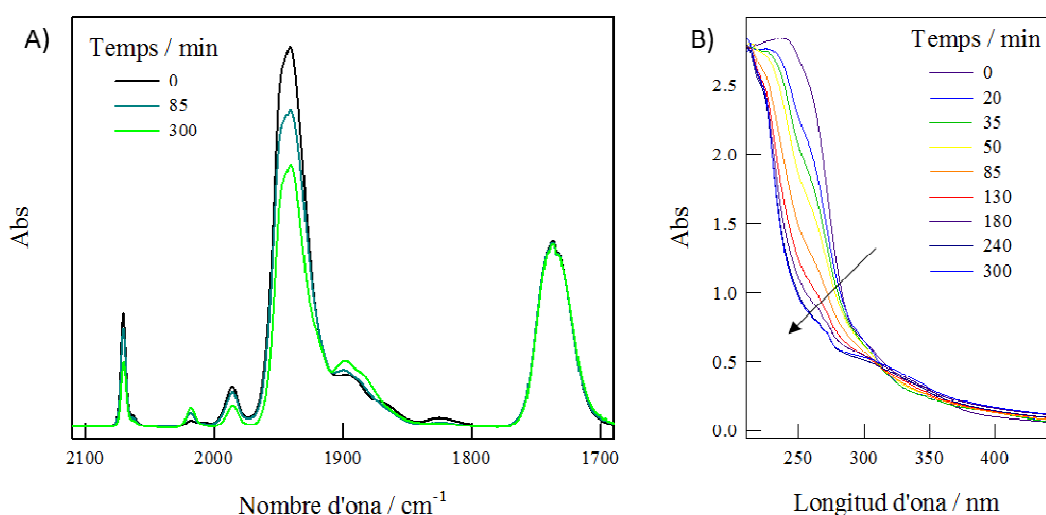


Figura 106. Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS d'agregats vesiculars SPC/PL6 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ($\lambda_{\text{màx}} = 365$ nm).

L'alliberament de CO per part dels MTS d'aquesta família té lloc també en irradiar les mostres amb llum visible. En no trobar-se diferències apreciables entre els diferents tipus d'agregats (vesiculars o nanomètrics) les dades s'han tractat de forma conjunta. La Figura 107 mostra la variació del percentatge d'àrea normalitzada corresponent als pics més característics dels grups carbonils per cada complex: 2017 cm⁻¹ i 2070 cm⁻¹ per TL6 i PL6 respectivament. Els sistemes estudiats són: sistemes mixtes SPC/TL6 3:1 (vesiculars) i 3:3 (nanoagregats) mM/mM (Figura 107 A)) i sistemes mixtes SPC/PL6 3:1 mM/mM (vesiculars) i 3:10 (vesiculars (ves*)) mM/mM (Figura 107 B)), irradiats

amb llum UVA o amb llum visible. Es pot apreciar com l'alliberament de CO, tot i tenir lloc en tots dos casos, és major en irradiar amb UVA.

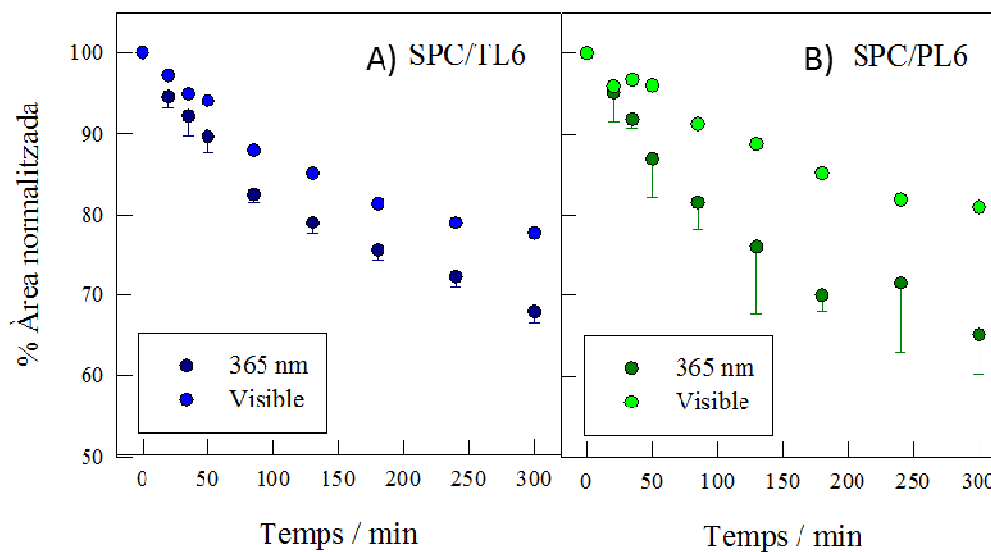


Figura 107. Representació del % d'àrea normalitzada per la banda més característica de cada complex en irradiar amb llum UVA o llum visible (A) sistemes mixtes PC/TL6 i (B) sistemes mixtes PC/PL6.

En relació als espectres UV-VIS, els canvis observats es poden avaluar a partir de la disminució de l'absorbància a 275 nm. A la Figura 108 es mostra la variació per nanoagregats SPC/TL6 10:10 mM/mM i agregats vesiculars SPC/PL6 30:10 mM/mM, en ser irradiats amb UVA. Es pot observar com el valor d'absorbància decreix més en el cas del complex tetracarbonílic, d'acord amb els resultats mitjançant FTIR que mostraven un alliberament de CO més ràpid per part d'aquest compost.

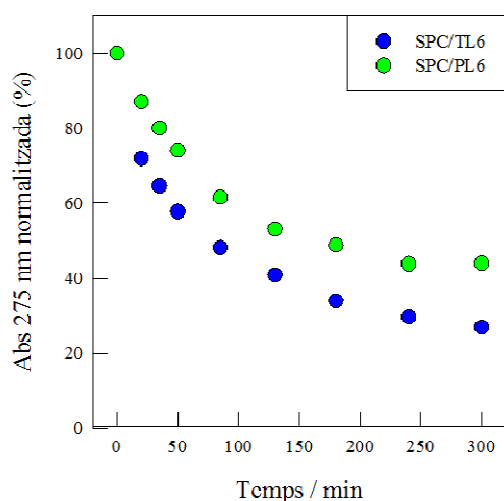


Figura 108. Variació de l'absorbància a 275 nm (expressada en percentatge respecte el valor inicial) de nanoagregats SPC/TL6 10:10 mM/mM i agregats vesiculars SPC/PL6 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ($\lambda = 365$ nm).

Resultats

4.2.2.9. TOXICITAT

Els resultats de l'assaig amb XTT per als MTS FL6 es mostren a la Figura 109. S'observa que els metal·losomes obtinguts amb TL6 o PL6 no presenten toxicitat a cap concentració dins l'ampli rang avaluat (50-1000 μM). Per contra, el complex TL6, lliure o formant nanoagregats, resulta nociu a partir de concentració 100 μM i el complex PL6, lliure o en sistemes vesiculars amb elevada proporció de complex, ves*, (SPC/PL6 3:10 mM/mM) és més tòxic el TL6, amb una concentració màxima no tòxica de 50 μM .

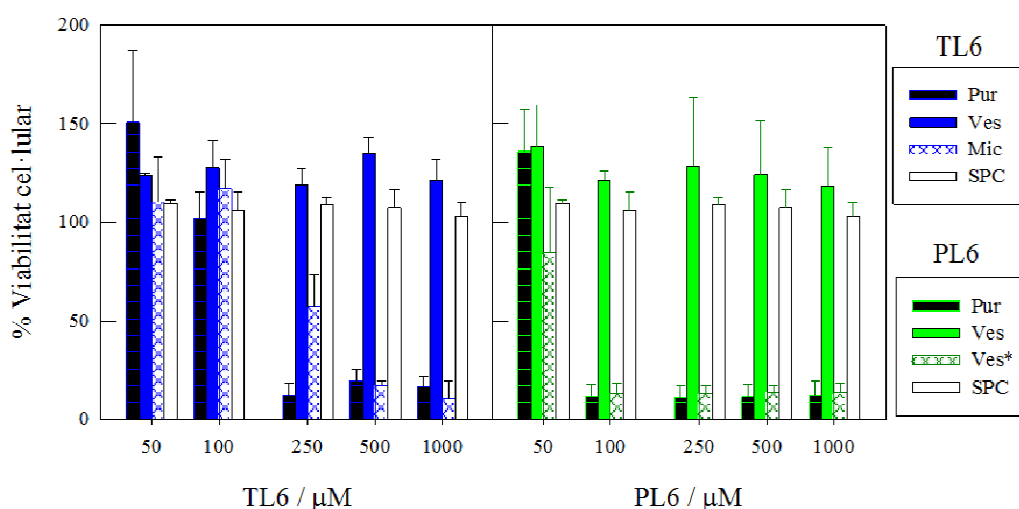


Figura 109. Percentatge de viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig amb XTT, en fibroblasts humans, en funció de la concentració d'MTS i del tipus d'agregat. Les barres mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 4$).

4.2.2.10. PREPARACIÓ DE SISTEMES MIXTES SPC/MTS MITJANÇANT TÈCNiques DE MICROFLUÍDICA

El principal objecte de l'estada a la universitat d'Strathclyde, a Glasgow, ha estat aplicar metodologies basades en la microfluídica per tal de preparar agregats híbrids SPC/MTS, en concret els complexos TL6 i PL6. A partir de les respostes a les combinacions de factors detallades a l'apartat 3.3.4. de materials i mètodes, s'han obtingut les corresponents superfícies ajustades als paràmetres significatius d'un model polinòmic complet de segon ordre (Figures 110-114 i Taules 26-35).

Els valors de la mida dels liposomes formats per SPC (sense cap MTS) mitjançant tècniques de microfluídica en variar les condicions de flux total de dissolvents, TFR, i la relació entre els dos medis líquids (dissolvent orgànic i aigua), FRR, es mostren a la

taula 26 i 27 pel cas del metanol i etanol respectivament. A la Figura 110 A), que correspon al resultat obtingut quan el dissolvent orgànic emprat és el MeOH, s'observa que l'únic factor significatiu és la proporcions fase orgànica/fase aquosa (FRR), de manera que entre els valors 1 i 5 el diàmetre dels liposomes varia entre els 45 nm i 19 nm respectivament. En canvi, quan el dissolvent orgànic és l'EtOH (Figura 110 B)) s'obtenen liposomes amb mides situades entre els 800 i 1000 nm per a una FRR 1, mentre que en augmentar la proporció de fase aquosa el seu diàmetre decreix bruscament fins a arribar a valor mínim situat entre els 30-50 nm per un FRR 5. En alguns punts d'aquesta zona, l'ajust matemàtic de la superfície proporciona valors negatius, fet pel qual en ells la superfície s'ha forçat al valor mínim experimental obtingut.

MeOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1			44,7 ± 16,7			
2		30,7 ± 3,29		27,6 ± 0,08		
3	30,7 ± 2,98		27,8 ± 6,38		31,0 ± 16,0	
4		24,3 ± 4,64		18,3 ± 0,74		
5			18,6 ± 6,48			
Diàmetre = 28,71 + 5,86 · FRR; r ² = 0,42 ; error standard = 8,40						

Taula 26. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats d'SPC 3 mM obtinguts utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

EtOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	787 ± 97,8		790 ± 241		1017 ± 509	
2		66,8 ± 16,4		31,2 ± 0,93		
3	89,6 ± 44,1		27,9 ± 3,65		32,9 ± 3,29	
4		52,9 ± 33,1		37,3 ± 6,13		
5	51,3 ± 13,1		30,1 ± 5,40		29,1 ± 0,64	
Diàmetre = 6,18 - 178 · TFR + 107 · FRR ² ; r ² = 0,80; error standard = 171						

Taula 27. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats d'SPC 3 mM obtinguts utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

Resultats

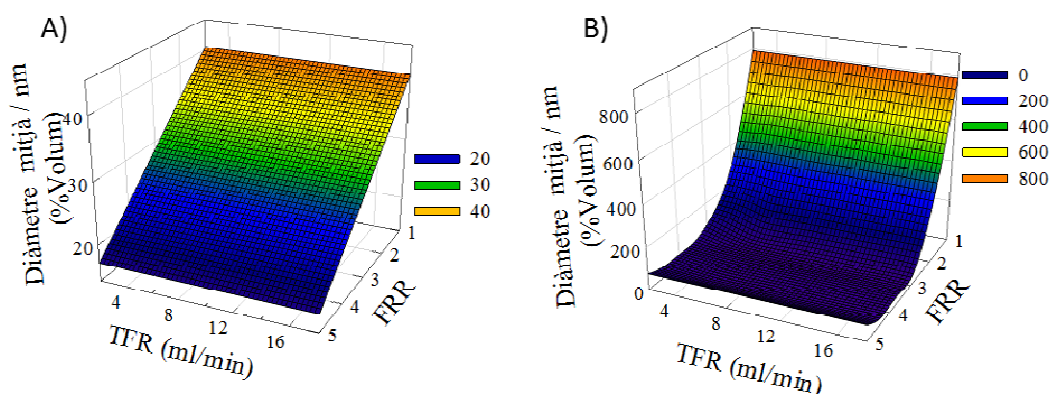


Figura 110. Superfícies de resposta del diàmetre mitjà en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). A) SPC 3 mM utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic i B) SPC 3 mM utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic.

Quan s'incorpora TL6 a les formulacions en una proporció SPC/TL6 3:1 mM/mM i el dissolvent orgànic emprat és MeOH, s'obtenen agregats molt petits, amb un diàmetre que oscil·la entre els 35 i els 10 nm en funció de l'FRR (Taula 28, Figura 111 A)). Ara bé, és possible obtenir agregats de mida gran, entre 600-800 nm, si s'utilitza EtOH com a fase orgànica amb un FRR 1, tot i que en augmentar la fase aquosa el diàmetre torna a ser petit arribant-se a obtenir de nou nanoagregats (Taula 29, Figura 111 B)).

MeOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	27,2 ± 1,06					
2	34,7 ± 8,54		35,5 ± 6,34			
3	33,0 ± 4,81	38,4 ± 4,52		21,9 ± 2,44		
4	26,2 ± 1,69			4,07 ± 0,83		
5	10,9 ± 4,51					
Diàmetre = 29,7-5,65·FRR -2,98·TFR -2,84·FRR ² ; r ² = 0,60; error standard= 7,79						

Taula 28. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/TL6 3:1 mM/mM obtinguts utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

EtOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR		2	6	10	14	18
1		893 ± 507		615 ± 223		780 ± 553
2			55,4 ± 33,7		28,9 ± 1,67	
3		41,2 ± 4,12		18,9 ± 4,52		32,0 ± 5,66
4			22,1 ± 1,71		23,5 ± 7,21	
5		28,9 ± 2,23		10,3 ± 2,93		24,5 ± 7,39
		Diàmetre = -0,23+1,93·TFR ² +0,16·FRR·TFRy; r ² = 0,73; error standard= 178				

Taula 29. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/TL6 3:1 mM/mM obtinguts utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

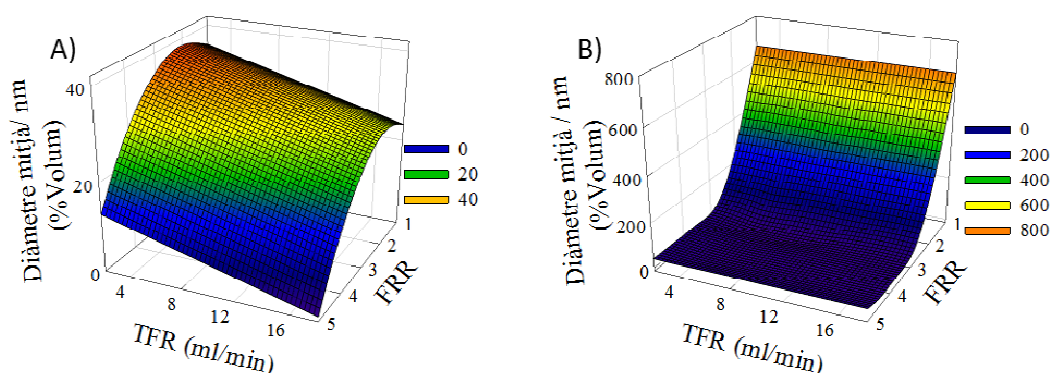


Figura 111. Superfícies de resposta per a la determinació del diàmetre mitjà en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). A) SPC/TL6 3:1 mM/mM utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic i B) SPC/TL6 3:1 mM/mM utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic.

Quan la proporció SPC/TL6 és 3:3 mM/mM i el dissolvent orgànic el MeOH, els agregats obtinguts segueixen la tendència dels sistemes mixtes SPC/TL6 3:1 mM/mM, però en aquest cas es detecten nanoagregats a una FRR 4 (Taula 30, Figura 112 A)), mentre que la mida dels agregats obtinguts amb EtOH i FRR 1 varia entre els 1400-1900 nm, uns valors molt més grans que els del cas anterior (Taula 31, Figura 112 B)).

Resultats

MeOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	49,9 ± 2,60		30,4 ± 0,9		64,4 ± 0,21	
2		27,1 ± 0,94		28,8 ± 2,85		
3	37,7 ± 9,30		26,4 ± 5,54		23,4 ± 2,75	
4		3,39 ± 0,01		3,39 ± 0,10		
5	26,8 ± 2,91		4,22 ± 0,80		2,96 ± 0,01	

Diàmetre = $19,3 - 8,53 \cdot \text{FRR} - 2,35 \cdot \text{TFR} + 3,58 \cdot \text{TFR}^2 - 2,51 \cdot \text{FRR} \cdot \text{TFR}$;
 $r^2 = 0,87$; error standard = 6,44

Taula 30. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; $n \geq 2$) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/TL6 3:3 mM/mM obtinguts utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

EtOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	1866 ± 1315		1557 ± 149		1417 ± 69,8	
2		56,8 ± 1,99		40,9 ± 2,06		
3	45,7 ± 10,8		25,2 ± 4,59		25,0 ± 2,42	
4		37,6 ± 6,05		22,9 ± 0,53		
5	30,3 ± 0,42		2,82 ± 0,10		2,81 ± 0,29	

Diàmetre = $-186 - 254 \cdot \text{FRR} + 147 \cdot \text{TFR} + 83,2 \cdot \text{TFR}^2$; $r^2 = 0,87$; error standard = 6,44

Taula 31. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; $n \geq 2$) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/TL6 3:3 mM/mM obtinguts utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

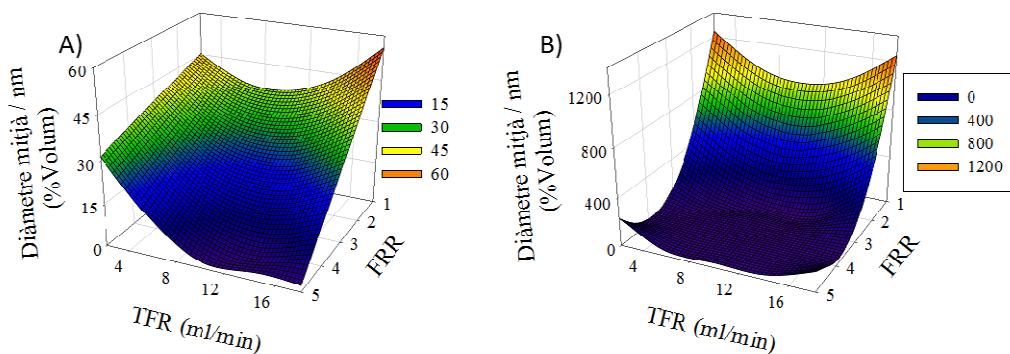


Figura 112. Superfícies de resposta per a la determinació del diàmetre mitjà en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). A) SPC/TL6 3:3 mM/mM utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic i B) SPC/TL6 3:3 mM/mM utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic.

Pel que fa als sistemes mixtes SPC/PL6, quan la proporció és 3:1 mM/mM s'obtenen agregats entre 40 i 10 nm en passar de FRR 1 a 5 emprant MeOH (Taula 32, Figura 113 A)). Mentre que amb EtOH a FRR 1 es detecten agregats micromètrics, la mida dels quals disminueix en augmentar la quantitat d'aigua, i que arriben uns 20 nm de diàmetre a una FRR 5 (Taula 33, Figura 113 B)). Ara bé, també és possible obtenir agregats entre 60-150 nm amb valors d'FRR situats entre 2 i 3 quan el flux total és baix (2-6 ml/min).

MeOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	42,6 ± 0,01		32,4 ± 0,60		28,0 ± 0,91	
2		21,6 ± 2,48		18,0 ± 1,76		
3	33,9 ± 8,72		8,69 ± 1,87		6,06 ± 1,97	
4		13,3 ± 1,93		4,74 ± 0,09		
5	46,6 ± 3,97		8,24 ± 1,31		9,88 ± 7,11	
Diàmetre = -8,23-3,89·FRR -6,24·TFR+2,98·FRR ² +2,92·TFR ² -1,38·FRR·TFR; r ² = 0,89; error std=5,01						

Taula 32. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/PL6 3:1 mM/mM obtinguts utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

EtOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR	2	6	10	14	18	
1	1033 ± 357		653 ± 141		986 ± 292	
2		65,8 ± 21,1		42,0 ± 8,17		
3	148 ± 62,0		27,5 ± 2,47		22,3 ± 4,74	
4		26,2 ± 4,48		26,2 ± 11,4		
5	68,0 ± 12,1		18,8 ± 2,43		20,6 ± 1,52	
Diàmetre = -61,2-181·FRR +103·FRR ² +38,8·TFR ² ; r ² = 0,83; error standard= 160						

Taula 33. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/PL6 3:1 mM/mM obtinguts utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

Resultats

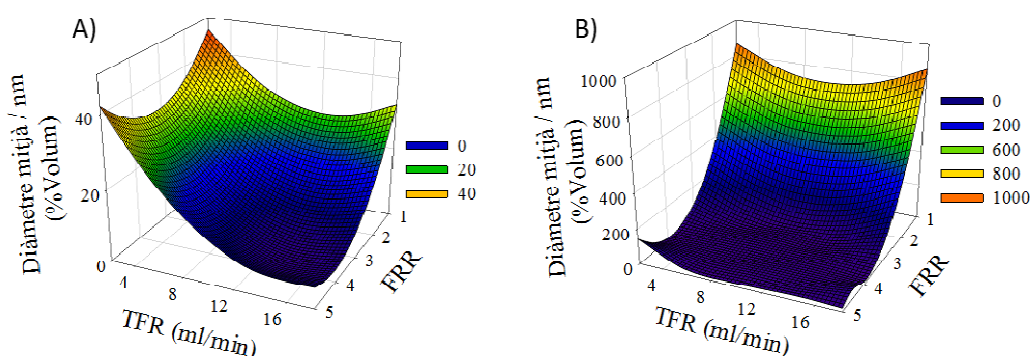


Figura 113. Superfícies de resposta per a la determinació del diàmetre mitjà en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). A) SPC/PL6 3:1 mM/mM utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic i B) SPC/PL6 3:1 mM/mM utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic.

El fet d'augmentar la proporció de complex (sistema SPC/PL6 3:3 mM/mM) fa que tot i seguir la mateixa tendència, els diàmetres en general siguin inferiors als obtinguts en el cas anterior, amb menys complex (Taules 34-35, Figura 114).

MeOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR		2	6	10	14	18
1		126 ± 47,2		36,4 ± 0,31		38,8 ± 0,70
2			41,5 ± 0,01		22,9 ± 1,24	
3		48,0 ± 7,80		11,2 ± 7,04		8,29 ± 3,49
4			13,3 ± 2,91		16,6 ± 15,4	
5		61,4 ± 0,71		8,37 ± 1,73		6,45 ± 3,24
Diàmetre = 7,29-9,85·FRR -13,2·TFR+5,22·FRR ² +6,62·TFR ² ; r ² = 0,80; error standard=15,6						

Taula 34. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/PL6 3:3 mM/mM obtinguts utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la

EtOH		Diàmetre mitjà (% volum) (nm)				
		TFR (ml / min)				
FRR		2	6	10	14	18
1		870 ± 450		303 ± 67,1		930 ± 454
2			56,1 ± 26,7		39,9 ± 1,09	
3		73,3 ± 31,7		4,19 ± 0,95		23,6 ± 11,5
4			12,8 ± 0,27		6,11 ± 2,60	
5		29,7 ± 9,15		7,80 ± 1,95		12,1 ± 0,97
Diàmetre = -96,7-139·FRR+78,3·FRR ² +49,8·TFR ² ; r ² = 0,69; error std=188						

Taula 35. Variació del diàmetre mitjà (mitjana ± std; n ≥ 2) d'agregats per un sistema mixt d'SPC/PL6 3:3 mM/mM obtinguts utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). La superfícies de resposta que d'ells es deriven i les característiques de l'ajust es mostren a la part inferior de la taula.

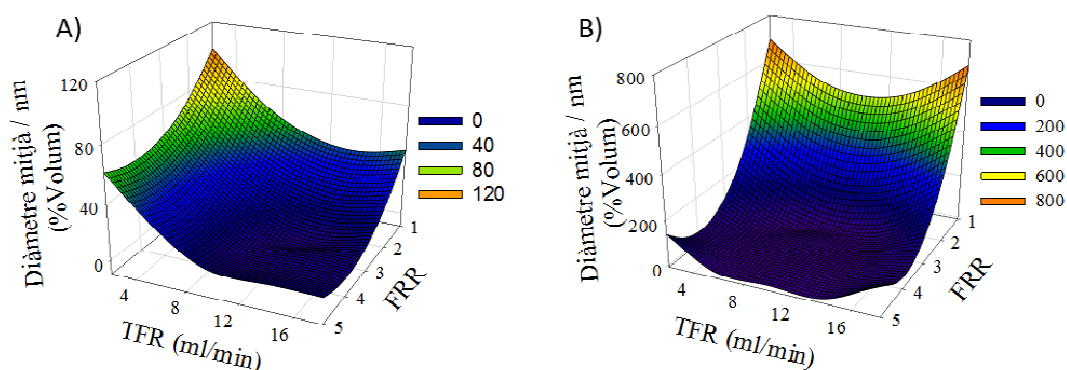


Figura 114. Superfícies de resposta per a la determinació del diàmetre mitjà en funció del flux total (TFR) i el flux proporcional entre fase aquosa/fase orgànica (FRR). A) SPC/PL6 3:3 mM/mM utilitzant MeOH com a dissolvent orgànic i B) SPC/PL6 3:3 mM/mM utilitzant EtOH com a dissolvent orgànic.

Finalment, algunes de les formulacions preparades mitjançant microfluídica es van estudiar mitjançant cryo-TEM. Les Figures 115 i 116 mostren respectivament les imatges obtingudes per als sistemes SPC/TL6 3:3 mM/mM i SPC/PL6 3:1 mM/mM, preparades amb EtOH com a fase orgànica, amb un TFR de 10 ml/min i FRR 1. Sorprenentment, a diferència de totes els sistemes preparats a partir de films homogenis, en aquest casos s'observen sistemes multilamel·lars amb les bicapes molt properes entre si i amb un diàmetre situat entre els 500 i 800 nm.

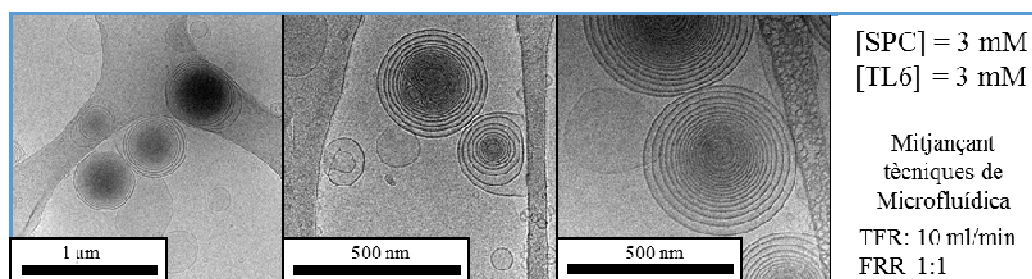


Figura 115. Fotografies de cryo-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/TL6 3:3 mM/mM en aigua preparats mitjançant tècniques de microfluídica utilitzant EtOH com a fase orgànica.

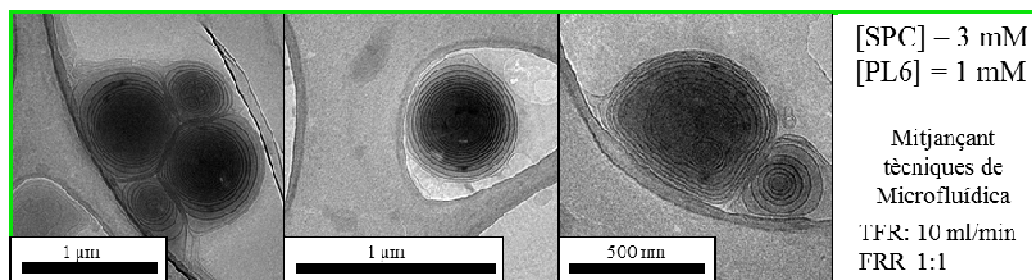


Figura 116. Fotografies de cryo-TEM dels agregats de sistemes mixtes SPC/PL6 3:1 mM/mM en aigua preparats mitjançant tècniques de microfluídica utilitzant EtOH com a fase orgànica.

Resultats

4.2.3. COMPOSTOS DE LA FAMÍLIA L10 (FL10)

Aquest apartat mostra els resultats de l'estudi de les característiques més importants dels MTS FL10, els tensioactius metàl·lics carbonílics de cadena més llarga sintetitzats en aquest treball, amb una cadena hidrocarbonada amb 10 àtoms de carboni. Malgrat no ha estat possible caracteritzar els compostos FL10 exhaustivament, aquests estudis permeten avaluar la formació d'agregats mixtes amb fosfolípids i les possibilitats dels sistemes SPC/MTS d'aquesta família per a ser utilitzats com a PhotoCORMs.

4.2.3.1. DETERMINACIÓ DE LA CMC

La cmc dels tensioactius metàl·lics FL10 es determina en aquest apartat mitjançant espectroscòpia de fluorescència. La Figura 117 mostra els espectres de fluorescència normalitzats a diferents concentracions dels complexos TL10 i PL10. Com es pot observar, hi ha canvis poc intensos en la forma dels espectres en funció de la concentració, canvis que, a més, estan parcialment emmascarats per la banda Raman de l'aigua que, quan l'excitació és a 305 nm, apareix a 340 nm. És per aquest motiu que, en la mesura del possible, el quocient d'intensitats s'ha calculat emprant longituds d'ona allunyades de la interferència.

Quan es representa el quocient de fluorescència entre dues longituds d'ona (Figura 117 C) i Taula 36) s'observa un canvi brusc de pendent a 0,37 i 0,44 mM pel complexos TL10 i PL10 respectivament. Aquests valors són més alts que els de les cmc determinades per tensiometria, tot i que es mantenen en el mateix ordre de magnitud. La longitud d'ona d'excitació, els màxims d'emissió triats per fer la relació d'intensitats i el valor de cmc determinats per a cada tensioactiu, així com els obtinguts en treballs anteriors per tensiometria,^{46, 123} es troben resumits a la Taula 36.

Resultats

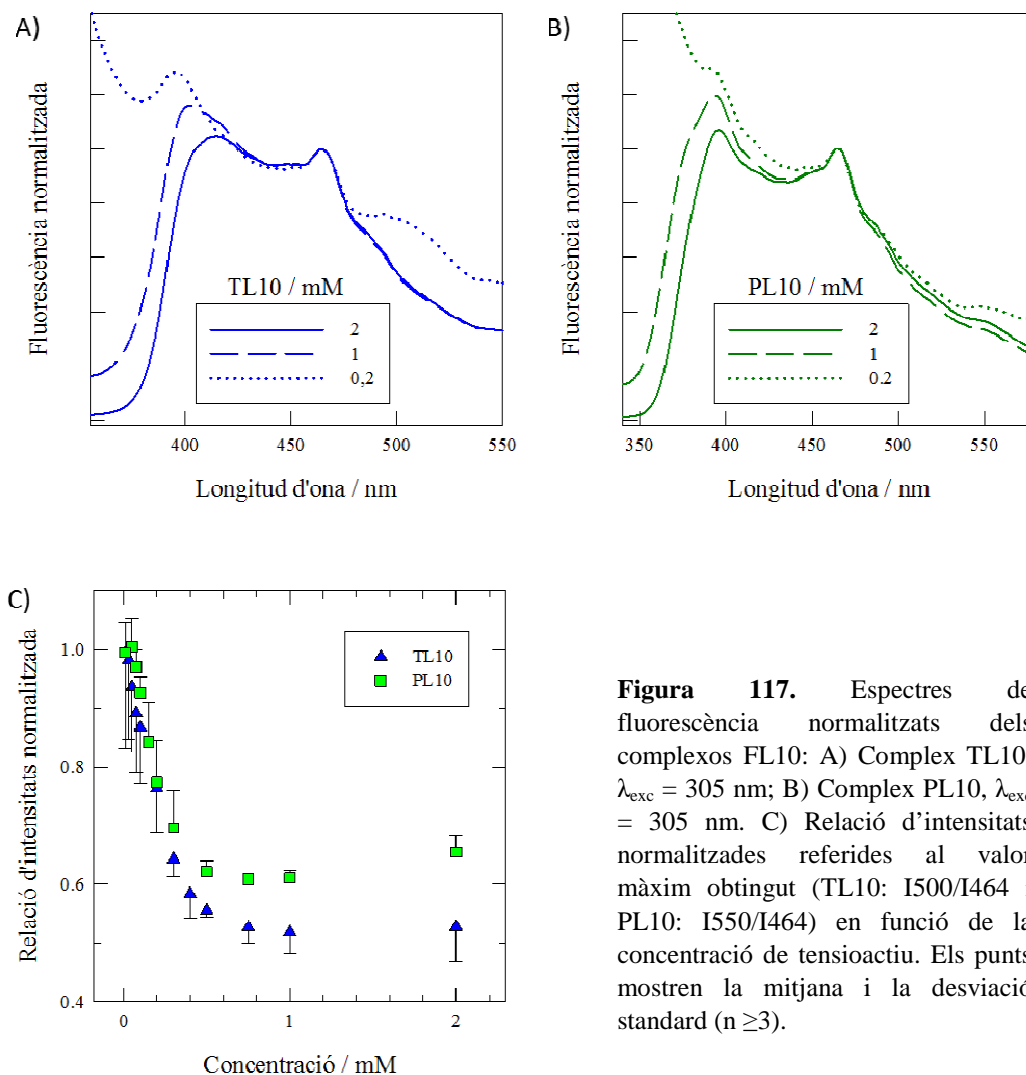


Figura 117. Espectres de fluorescència normalitzats dels complexos FL10: A) Complex TL10, $\lambda_{exc} = 305$ nm; B) Complex PL10, $\lambda_{exc} = 305$ nm. C) Relació d'intensitats normalitzades referides al valor màxim obtingut (TL10: I500/I464 i PL10: I550/I464) en funció de la concentració de tensioactiu. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 3$).

	$\lambda_{exc} / \text{nm}$	Relació d'intensitats	cmc (mM) Fluorescència	cmc (mM) Tensiometria
TL10	305	I500 / I464	0,37	0,15
PL10	305	I550 / I464	0,44	0,28

Taula 36. Longitud d'ona d'excitació, màxims d'emissió triats per al càlcul de la relació d'intensitats i valor de cmc dels complexos FL10 determinada mitjançant fluorescència i tensiometria.

4.2.3.2. PROPIETATS TENSIOACTIVES. SOLUBILITZACIÓ DE LIPOSOMES

La Figura 118 mostra el diàmetre mitjà, determinat mitjançant DLS, dels agregats obtinguts en addicionar concentracions creixents dels complexos TL10 i PL10 a liposomes amb una mida aproximada de 100 nm. Els resultats, determinats com a mínim 72 h després de l'addició del tensioactiu, mostren que la mida dels liposomes es manté pràcticament constant fins i tot quan la concentració de cada MTS se situa força més enllà de la seva cmc: 0,37 mM pel complex TL10 i 0,44 mM pel complex PL10 (valors marcats amb fletxes a la Figura 118). Per tant, els liposomes no són solubilitzats fins i tot a concentracions d'MTS més de deu vegades per sobre de la seva cmc. Complementàriament es determina l'absorbància dels agregats a 600 nm (gràfic inserit de la Figura 118) que augmenta lleugerament de forma lineal, fins a uns valors màxims de 0,2 i 0,5 per al PL10 i TL10 respectivament.

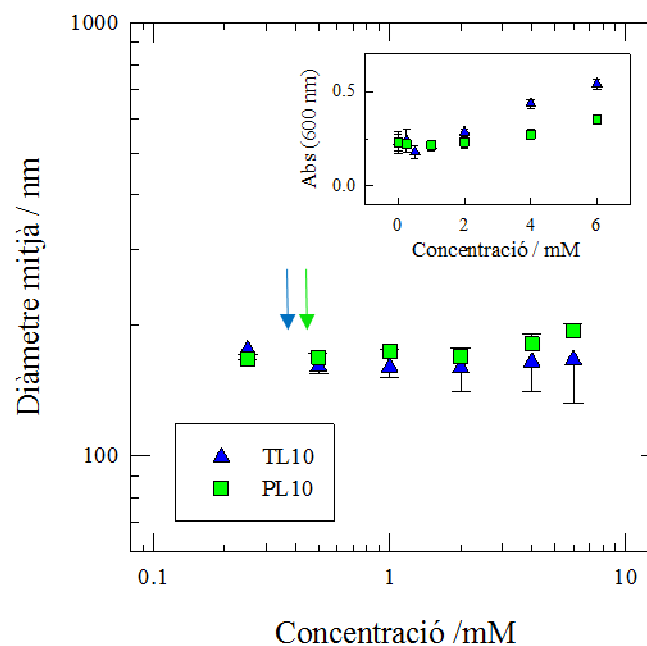


Figura 118. Diàmetre mitjà de les mesclures de liposomes (SPC 3 mM) amb concentracions creixents dels complexos TL10 i PL10. Les fletxes indiquen la cmc de cada MTS. Gràfic inserit: absorbància a 600 nm. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

Resultats

4.2.3.3. DETERMINACIÓ DE LA MIDA D'AGREGATS MITJANÇANT ESPECTROSCÒPIA DE DLS

L'espectroscòpia de DLS s'utilitza en aquest apartat per tal de determinar la mida dels agregats obtinguts a partir de dispersions aquoses dels complexos FL10 purs així com d'agregats obtinguts a partir de sistemes mixtes SPC/TL10 o SPC/PL10. Tal i com es pot observar a la Figura 119 el complex TL10 en solució aquosa forma agregats presumiblement vesiculars, la mida dels quals és independent de la concentració. S'obtenen dues poblacions d'agregats, corresponent aproximadament el 80 % a estructures amb diàmetre situat al voltant dels 600 nm, mentre que el 20 % restant té un diàmetre proper als 100 nm.

Pel que fa als sistemes mixtes d'aquest complex amb fosfolípid, estan constituïts per agregats de mida lleugerament superior als obtinguts amb el complex pur, d'aproximadament una micra de diàmetre, valor que resulta independentment de la proporció SPC/TL10, observant-se també en aquest cas una petita població de mida inferior, d'uns 100 nm. En arribar a la proporció màxima de MTS apareix una petita població d'agregats d'aproximadament 5 μm situats, per tant, al límit de detecció de l'aparell. El resultat és que el diàmetre mitjà dels agregats és manté constant per les diferents concentracions d'MTS assajades.

Complementàriament, els resultants obtinguts mitjançant l'absorbància a 600 nm mostren com el seu valor decreix abruptament en passar de liposomes purs al sistema mixt SPC/TL10 3:1 mM/mM, que conté la mínima quantitat d'MTS emprada en l'estudi. A partir d'aquesta relació, augmenta paulatinament en augmentar la concentració de complex.

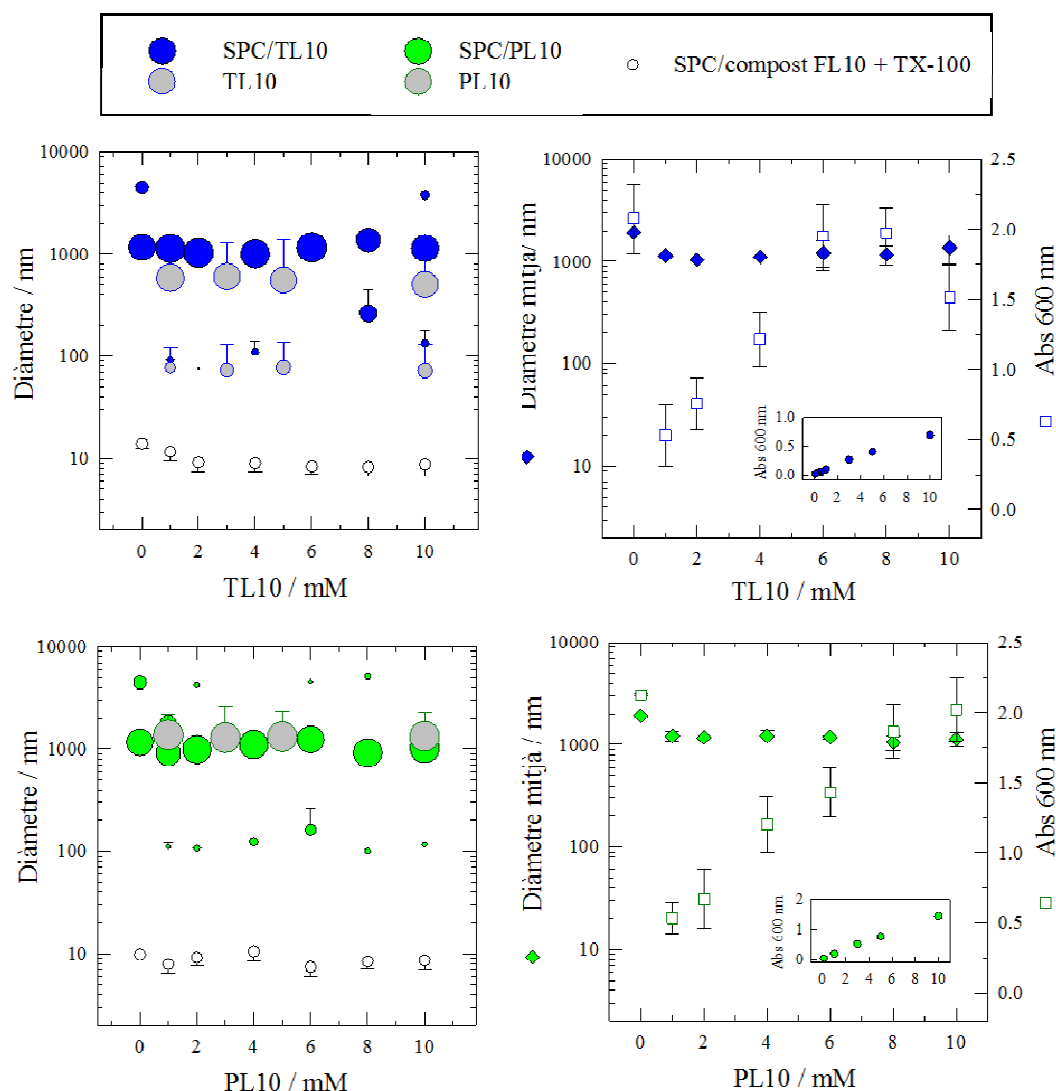


Figura 119. Distribució de mida de poblacions (la mida del cercle indica el percentatge de cada població), diàmetre mitjà i valor d'absorbància a 600 nm per sistemes mixtes SPC/tensioactiu en funció de la concentració de complexos FL10. Gràfics inserits: absorbància dels complexos TL10 i PL10 purs (l'eix de coordenades es correspon amb el de la figura en el que es troba inserit). La concentració de SPC és 3 mM en tots els casos. Els punts mostren la mitjana i la desviació standard ($n \geq 2$).

El comportament del complex PL10 resulta molt similar al del seu anàleg tetracarbonílic. En aquest cas, però, el complex PL10 pur en solució aquosa forma només agregats una mica majors, que oscil·len al voltant d'1 μm , i la mida dels quals resulta independent de la concentració de complex. Els sistemes mixtes SPC/PL10, tal i com es pot observar a la Figura 119, formen agregats amb un diàmetre situat al voltant d'una micra, com en el cas del complex PL10 pur, però ara també es detecten dues petites poblacions més. La menor, que comprèn entre el 5-10 % dels agregats, té una mida aproximada d'uns 100 nm, mentre la mida de la segona se situa en valors propers al límit superior de detecció de l'aparell. D'altra banda, el valor d'absorbància

Resultats

evoluciona com en el cas del TL10. Inicialment, en incorporar-se la mínima quantitat de PL10, hi ha una disminució abrupta del seu valor, que tot seguit augmenta gradualment en augmentar també la quantitat del MTS en els agregats mixtes.

4.2.3.4. ALLIBERAMENT DE CO

En aquest apartat s'estudia la capacitat del complexos FL10 per a alliberar CO en ser irradiats amb llum UVA, centrada a 365 nm, mitjançant FT-IR tal i com ha estat descrit pels complexos de cadena més curta (FL2 i FL6). Aquesta propietat es determina espectrofotomètricament seguint el canvis a les bandes característiques dels grups carbonils dels MTS estudiats.

Determinació de l'alliberament de CO mitjançant FTIR

A les Figures 120 i 121 es mostren, respectivament, l'evolució dels espectres d'IR i UV-VIS en funció del temps d'irradiació amb UVA de sistemes que formen agregats vesiculars, amb les relacions SPC/TL10 30:10 mM/mM i SPC:PL10 30:10 mM/mM.

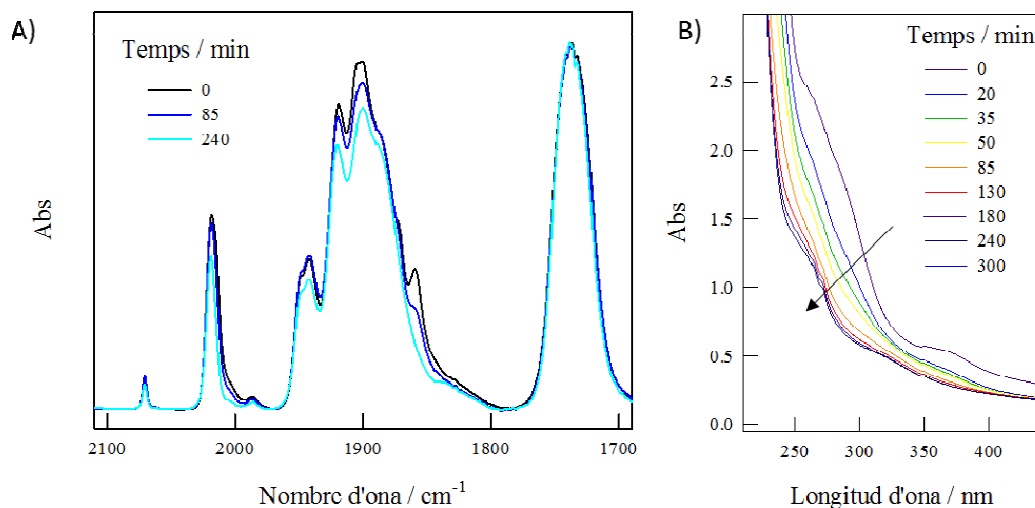


Figura 120. Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS d'agregats vesiculars SPC/TL10 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ($\lambda_{\text{màx}} = 365$ nm).

Com es pot apreciar, hi ha canvis a les bandes d'infraroig dels grups carbonils del complex TL10 centrades a 2018 cm⁻¹, 1919 cm⁻¹ i 1900 cm⁻¹ com a resultat de l'alliberament de CO durant el procés d'irradiació (Figura 120 A)). El mateix efecte s'observa en el complex PL10, en el que es produeixen canvis significatius a les bandes corresponents als seus grups carbonílics centrades a 2071 cm⁻¹ i 1942 cm⁻¹ (Figura 121

A)). Paral·lelament, els espectres d'UV-VIS dels dos complexos corroboren l'efecte de la irradiació UVA sobre ells, donant lloc a canvis importants en els espectres (Figura 120 B) i 121 B)).

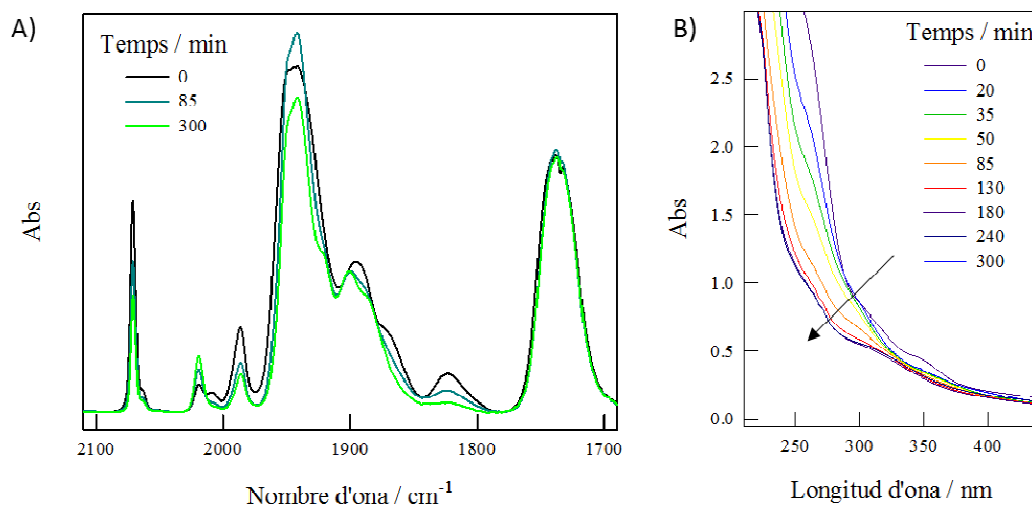


Figura 121. Evolució dels espectres (A) d'IR i (B) UV-VIS d'agregats vesiculars SPC/PL10 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA ($\lambda_{\text{màx}}=365$ nm).

La variació del percentatge d'àrea normalitzada dels pics més característics per a cada complex, 2018 cm^{-1} i 2071 cm^{-1} per TL10 i PL10 respectivament, es mostra a la figura 122. La disminució d'aquestes bandes posa de manifest que aquests dos compostos són capaços d'alliberar CO en ser irradiats, i que ho fan amb unes cinètiques d'alliberament molt semblants.

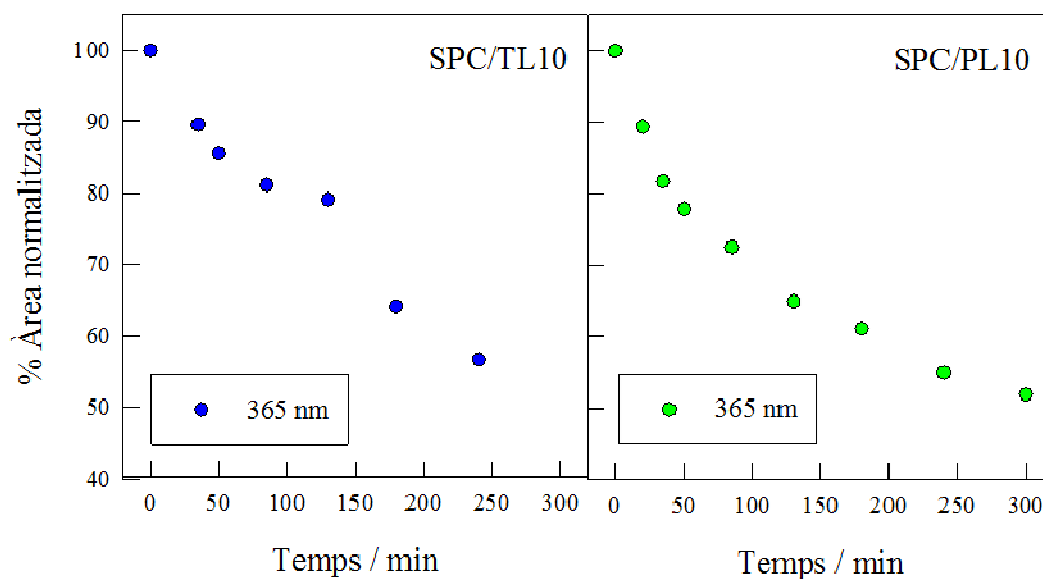


Figura 122. Representació del % d'àrea normalitzada per la banda més característica de cada complex en irradiar amb llum UVA (A) sistemes mixtes SPC/TL10 i (B) sistemes mixtes SPC/PL10.

Resultats

Finalment, els canvis observats als espectres UV-VIS se segueixen mitjançant la variació del valor d'absorbància a 275 nm, que es representa normalitzada respecte del valor inicial a la Figura 123. En ella s'aprecia un decaïment paral·lel a l'observat a les bandes característiques dels grups carbonils dels complexos mitjançant FTIR.

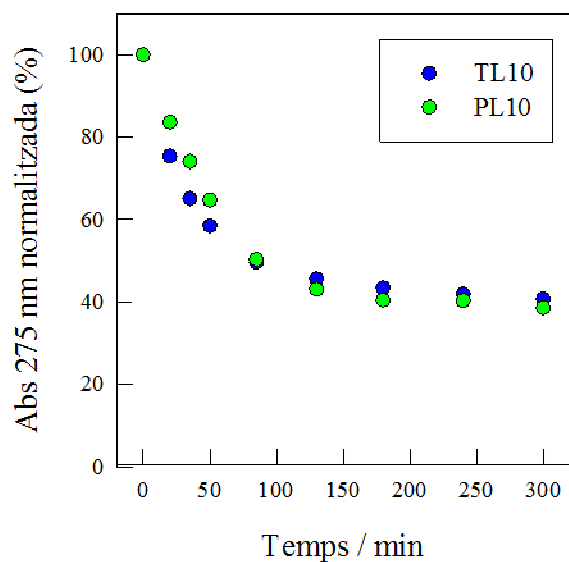


Figura 123. Variació de l'absorbància a 275 nm (expressada en percentatge respecte el valor inicial) d'agregats vesiculars SPC/TL10 i SPC/PL10 30:10 mM/mM en ser irradiats amb llum UVA (λ_{\max} = 365 nm).

5. DISCUSSIÓ

5.1. SÍNTESI I CARACTERITZACIÓ DELS TENSIOACTIUS

Durant el desenvolupament d'aquest treball s'ha sintetitzat una família de tres membres de fosfines tensioactives amb diferent longitud de la cadena alquílica, amb 2, 6 i 10 àtoms de carboni. Aquestes fosfines han estat el punt de partida per a la preparació de dues famílies de metal·lotensioactius carbonílics de molibdè en ser coordinades als fragments $\{\text{Mo}(\text{CO})_4\}$ i $\{\text{Mo}(\text{CO})_5\}$. El procediment sintètic, tant per lligands com per MTS, ja havia estat descrit en treballs anteriors.¹²³ No obstant, en aquests treballs es sintetitzaren petites quantitats de producte, de l'ordre de mil·ligrams, i donat que per a la realització d'aquesta Tesi Doctoral es requerien quantitats de productes més elevades, de l'ordre de grams, alguns dels procediments sintètics han estat modificats i fins i tot ha estat necessari desenvolupar noves vies de síntesi.

El procediment sintètic descrit per a l'obtenció del precursor de la fosfina L10 ($\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$) presentava certes dificultats donat que, tot i ajustar les condicions de reacció per obtenir majoritàriament el producte halosulfonat, s'obtenia una proporció elevada de producte disulfonat, el qual podia separar-se del producte desitjat però després d'un tediós procés de purificació. Així doncs, aquest procediment s'ha optimitzat reduint molt el temps de purificació i presentant alhora un estalvi econòmic. La modificació més important ha estat augmentar el volum de dissolvent orgànic a la mescla bifàsica de reacció de manera que el producte desitjat s'extreu pràcticament pur de la fase orgànica i el subproducte disulfonat queda a la fase aquosa. Així, s'obté el producte halosulfonat pur, alhora que el producte dihalogenat de partida, afegit en gran excés, es fàcilment recuperable i reutilitzable. La síntesi de les fosfines tensioactives es va dur a terme tal i com estava descrit, modificant lleugerament el procés de recristal·lització. Aquest procés, que es duu a terme en metanol bullent, s'optimitza afegint uns mil·lilitres d'aigua desionitzada al metanol, afavorint l'eliminació de sal amb la conseqüent millora del procés de purificació.

Respecte la síntesi dels metal·lotensioactius, pels complexos TL_n es va seguir el procediment presentat al treball d'E. Parera,¹²³ adaptat del procés publicat al 1978 per a l'obtenció de complexos $[\text{Mo}(\text{CO})_4\text{L}_2]$, on L eren fosfines neutres, amb modificacions al medi de reacció tenint el compte la naturalesa iònica dels lligands fosfina L_n utilitzats

Discussió

en aquest treball.¹³⁹ De fet, es va seguir el mètode descrit per a l'obtenció de $[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{TPPTS})_2]$ ¹⁴⁰ optimitzant les condicions per obtenir el producte amb major puresa.

Pels complexos PLn , en canvi, es va desenvolupar una nova via de síntesis. Al treball d'E. Parera la síntesis dels complexos PLn , portada a terme per reacció directa de $\text{Mo}(\text{CO})_6$ amb el lligand Ln , requeria un excés molt gran de reactiu de partida ($\text{Mo}(\text{CO})_6$) respecte el lligand fosfina (relació molar 10:1), temperatura elevada (80 °C); temps de reacció molt llarg (15 h); i un procés de purificació llarg i tediós. En la present Tesi Doctoral es proposa un nou mètode per obtenir els MTS PLn basat en la preparació a temperatura ambient de l'intermedi $[\text{Mo}(\text{CO})_5(\text{CH}_3\text{CN})]$ a partir de $\text{Mo}(\text{CO})_6$ per decarbonilació amb Me_3NO i subseqüent reacció amb el lligand fosfina Ln . Aquesta nova via proporciona el producte desitjat amb nivells de puresa similars al mètode anterior però evitant l'excés de $\text{Mo}(\text{CO})_6$ i l'elevada temperatura de reacció, obtenint el producte amb un temps de reacció relativament curt (3 h) i amb un fàcil procés de purificació.

Els lligands Ln i els metal·lotensioactius que d'aquests se'n deriven, TLn i PLn , es van obtenir amb bons rendiments i elevada puresa. Les propietats dels agregats en solució aquosa dels compostos purs, així com de sistemes mixtes amb SPC es discuteixen a continuació.

Una de les característiques del tensioactius és la seva capacitat d'autoagregar-se en superar la cmc. La seva determinació pot dur-se a terme per un gran nombre de mètodes essent la tensiometria un dels més emprats, ja que no suposa l'addició de cap substància al medi que conté la molècula estudiada. En abordar la caracterització dels tensioactius que s'han sintetitzat, es va partir de la hipòtesi de que els canvis en l'entorn de les molècules causats per la seva agregació/desagregació podrien veure's reflectits als seus espectres de fluorescència. Conseqüentment, s'ha dut a terme un mètode alternatiu a la tensiometria fonamentat en l'anàlisi dels espectres de fluorescència de suspensions dels compostos FL2, FL6 i dels MTS FL10 obtingudes mitjançant dilucions consecutives d'una inicial. Com en el cas de la tensiometria, la metodologia descrita no suposa la presència de cap sonda, de manera que s'aprofita la fluorescència intrínseca de les substàncies indicades deguda als grups fenils que contenen.

En comparar els resultats obtinguts amb aquesta tècnica respecte els obtinguts per tensiometria descrits a la literatura⁴⁶ (Taula 37) s'observa que en el cas dels compostos de cadena més curta (FL2) els valors de cmc són equivalents. Ara bé, pels compostos FL6 i els MTS FL10 els valors obtinguts per fluorescència s'allunyen en diferent grau, per excés, dels de tensiometria. Aquesta circumstància s'atribueix al fet que aquesta tècnica presenta limitacions a mesura que el valor de la cmc esdevé més petita, donat que els espectres de les mostres més diluïdes es veuen alterats per la presència de la banda d'emissió Raman de l'aigua que, a les longituds d'ona d'excitació, 250 nm pels lligand i 305 nm pels complexos, apareix centrada a 275 i 340 nm.

	cmc F	cmc T		cmc F	cmc T		cmc F	cmc T
	(mM)	(mM)		(mM)	(mM)		(mM)	(mM)
L2	14	14	L6	4,3	4,0	L10	-	0,5-1,2
TL2	2,0	2,0	TL6	1,2	0,8	TL10	0,37	0,15
PL2	2,0	1,9	PL6	1,6	1,2	PL10	0,44	0,28

Taula 37. Concentració micel·lar crítica dels compostos sintetitzats en aquest treball determinada per fluorescència (cmc F) o per tensiometria (cmc T).⁴⁶

En referència als valors de cmc obtinguts, per qualsevol de les dues tècniques, destaca el fet que els dels MTS són marcadament inferiors als dels seus lligands de partida, fet que ja havia estat descrit amb anterioritat, i que posa de manifest que l'efecte de complexació del metall als lligands tensioactius incrementa la seva tendència a l'autoagregació. D'altra banda, excepte per la família L2, els valors de cmc dels compostos tetracarbonílics són inferiors als dels seus anàlegs pentacarbonílics, fet que es relaciona amb la major quantitat de cadenes hidrocarbonades en el primer cas. Ara bé, la variació observada no és gaire intensa, fet que explicaria que no s'observi quan el nombre de CH₂ passa de 2 a 4 en el cas dels complexos de la família L2.

En comparar entre famílies de compostos es pot constatar la disminució de la cmc en augmentar la longitud de la cadena alquílica, fenomen que ja ha estat àmpliament descrit per altres compostos amb anterioritat.^{124, 141, 142, 143} Aquest fenomen és degut a l'increment en les atraccions hidrofòbiques entre tensioactius en augmentar la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Discussió

No obstant, tot i que els valors de cmc obtinguts per fluorescència són lleugerament més alts als obtinguts per tensiometria, aquesta tècnica representa un bon mètode per a la seva determinació.

D'altra banda, mitjançant DLS i *cryo*-TEM es posa de manifest que en preparar suspensions dels compostos en solució aquosa a concentracions per sobre de la cmc s'obtenen agregats supramoleculars. Pel lligand L2, les dades DLS indiquen que la mida dels agregats obtinguts és independent de la concentració, al voltant d' 1 μm , mentre que pels complexos TL2 i PL2 s'obtenen agregats de mida més gran en augmentar la concentració. Mitjançant *cryo*-TEM s'obtenen imatges d'aquests sistemes que evidencien la formació d'estructures vesiculars, com ja s'havia vist en treballs anteriors amb aquests compostos.¹²³ Les dades obtingudes mitjançant SAXS estan d'acord amb els resultats de DLS i *cryo*-TEM donat que tant pel lligand, com pels dos MTS FL2, el millor ajust de les corbes de dispersió correspon a sistemes vesiculars. A més, els resultats de SAXS indiquen que, degut a la rigidesa i el gran volum dels complexos, l'empaquetament a la part hidrofòbica de les membranes dista molt de ser compacte i que aquestes dificultats d'empaquetament fa que les membranes presentin certa rugositat.

D'altra banda, els compostos FL6 purs en solució aquosa, al igual que els compostos FL2 s'agreguen espontàniament donant lloc a agregats supramoleculars la mida dels quals, exceptuant el lligand L6 que mostra una lleugera variabilitat, és independent de la concentració del tensioactiu. La formació de sistemes vesiculars es corrobora amb les imatges obtingudes mitjançant *cryo*-TEM, on s'observen majoritàriament sistemes LUVs per al lligand L6 i MVVs per al complex PL6. Al complex TL6 també es detecta la presència de vesícules tot i que no es correspon gaire amb els resultats de DLS, donat que presenten valors de diàmetre inferiors als esperats. Aquest fet és degut probablement a que els agregats de mida més gran queden retinguts en el procés de *blotting*.

Finalment, a la família de compostos de cadena més llarga, FL10, els complexos purs a valors de concentració per sobre de la seva cmc s'agreguen en solució donant lloc bàsicament a agregats de mida micromètrica independentment de la concentració de complex. Pel complex TL10 es detecta també una petita població d'agregats d'aproximadament 100 nm de diàmetre.

Una altra característica dels tensioactius és la seva capacitat de disgregar sistemes, que pot ser avaluada, per exemple, determinant la seva actuació sobre liposomes. A determinades concentracions de tensioactiu l'estructura de les bicapes lipídiques resulta alterada fins al punt de destruir-les. Aquesta solubilització acaba donant com a resultat micel·les mixtes formades per molècules de fosfolípid i de tensioactiu. Un exemple és el tensioactiu utilitzat en aquest treball com a control positiu per estudiar el fenomen de solubilització de liposomes, l'SDS, les propietats tensioactives del qual ja han estat descrites extensament.^{144, 145, 146} Tal i com s'observa a l'apartat 4.2.1.2. (Fig 56), l'SDS és un tensioactiu d'acció lenta¹⁴⁷ que és capaç de solubilitzar els liposomes en 24 h. Aquest efecte es pot observar a les mesures de diàmetre mitjançant DLS, on es passa de tenir sistemes vesiculars de 100 nm a nanoagregats. Per contra, en addicionar qualsevol dels compostos sintetitzats en el transcurs d'aquesta Tesi Doctoral, exceptuant el complex TL6, els resultats de DLS indiquen que el diàmetre dels liposomes es manté constant, fins i tot a concentracions de tensioactiu marcadament superiors a la seva cmc. Els resultats de DLS es veuen complementats amb les mesures de densitat òptica a 600 nm, que oscil·len al voltant de 0,2 unitats d'absorbància, un valor que es correspon al que s'obté amb liposomes purs (sense els tensioactius). No obstant, als MTS FL10 el valor d'absorbància a 600 nm augmenta lleugerament (de 0,2 a 0,5) quan la concentració del MTS augmenta fins 6 mM (Fig. 118), un increment que s'explica pel color dels propis complexos. Per tant, aquest fet posa de manifest que els compostos indicats tenen molt poca capacitat solubilitzant.

Així doncs, deixant de banda el complex TL6, els compostos sintetitzats en aquest treball no s'insereixen a la bicapa dels liposomes en tot el rang de concentracions estudiat i, com a mínim, durant 72 h. Per tant, la seva distribució en el medi aquós està afavorida respecte a la que representa la inserció en la membrana dels liposomes. En la determinació de la cmc per fluorescència del lligand L2 (Figura 55) s'observa una segona transició al voltant de 2 mM que pot ser deguda a la formació d'agregats pre-micel·lars. Aquestes agrupacions podrien ser la forma preferent del tensioactiu que retardarien la seva inserció a les membranes a concentracions per sota de la cmc. Alternativament, per sobre la cmc els tensioactius tampoc s'insereixen, ja que la seva tendència és a autoagregar-se formant vesícules. No obstant quan es preparen sistemes mixtes SPC/tensioactiu per hidratació d'un film homogeni, el mètode emprat obvia la barrera energètica i s'obtenen els sistemes més estables energèticament.

Discussió

Ara bé, com ja ha estat dit, el complex TL6 mostra un comportament marcadament diferent a la resta de compostos. Els resultats de DLS mostren que en afegir el complex a concentracions per sobre de la seva cmc el diàmetre dels liposomes decreix fins a obtenir-se nanoagregats d'uns 10 nm a les relacions molars SPC/TL6 3:4 i 3:6 mM/mM. Aquests resultats són congruents amb les mesures d'absorbància, on els valors decreixen un ordre de magnitud, des de 0,2 en el cas dels liposomes purs, fins a 0,02 a les relacions molars indicades anteriorment. Paral·lelament, en aquest rang de concentracions, els sistemes mixtes SPC/TL6 obtinguts per hidratació d'un film homogeni mixt, presenten valors de diàmetre situats al voltant de 10 nm. Les imatges de *cryo*-TEM d'aquests agregats mostren estructures circulars d'uns 15 nm de diàmetre i estructures lineals de la mateixa mida (Apartat 4.2.2.4.), que són coherents amb sistemes bicel·lars (es tractaria, per tant, de bicel·les vistes frontalment o de costat). En tot cas, són unes estructures que no s'aprecien en els altres sistemes mixtes, pel que la capacitat solubilitzant del TL6 podria estar relacionada amb la seva capacitat de formar bicel·les. El fet de que la mida dels agregats obtinguts a partir del sistema mixt per hidratació d'un film homogeni o per addició de complex TL6 a liposomes sigui equivalent (diàmetres entre 8 i 12 nm), indicaria que, en el rang de concentracions indicat, el complex TL6 solubilitza els liposomes generant bicel·les.

Sorprenentment, en augmentar la quantitat d'MTS per sobre de la relació SPC/TL6 3:6, s'observa mitjançant DLS un pronunciat augment del diàmetre dels agregats, que arriba a ser de l'ordre del micrometre. El valor d'absorbància també incrementa el seu valor, fins a 1,6, fet que està d'acord amb la formació d'agregats supramoleculars grans. A més, per DLS no s'observen liposomes de 100 nm, fet que confirma que durant el procés el tensioactiu els solubilitza, formant-se així estructures nanomètriques, i que en augmentar de nou la concentració de TL6 el sistema evoluciona i formar agregats de mida similar a les obtingudes a partir d'un film homogeni mixt. Per tant, el complex TL6 té la capacitat de solubilitzar els liposomes quan la relació SPC/TL6 se situa entre 3:4 i 3:6 mM/mM. Per sota del valor inferior el MTS no interacciona de forma notable amb els liposomes, mentre que a relacions majors forma de nou estructures micromètriques.

5.2. PROPIETATS DELS AGREGATS MIXTES D'SPC, LLIGANDS I MTS

Caracterització fisicoquímica

En aquest apartat es discuteixen les propietats dels agregats mixtes formats pels lligands, i el complexos que se'n deriven, amb l'SPC, uns agregats obtinguts per hidratació de films homogenis.

Diverses tècniques independents indiquen que l'estructura dels sistemes mixtes SPC/FL2 ve determinada per la proporció fosfolípid/tensioactiu. Pel que fa a DLS, en tots els compostos d'aquesta família s'observa la formació sistemes vesiculars a concentracions baixes de tensioactiu fins a arribar a una concentració crítica de tensioactiu a partir de la qual només es detecten nanoagregats. Aquest punt crític es dona a 4, 3 i 10 mM per al L2, TL2 i PL2 respectivament (Figura 57), uns valors que no es correlacionen amb les corresponents ~~valor de~~ cmc. Aquesta disminució progressiva de mida dels agregats obtinguts en augmentar la concentració de tensioactiu és indicativa de la inserció dels tensioactius a la membrana lipídica, un fenomen que, com ja s'ha vist, no té lloc quan els tensioactius s'addicionen a suspensions de liposomes. Són resultats que concorden clarament amb els valors d'absorbància a 600 nm, que decreixen en funció de la concentració de tensioactiu paral·lelament als valors de diàmetre mesurats per DLS. Cal destacar que en passar de sistemes MLVs d'SPC purs al primer sistema mixt estudiat (relació SPC/FL2 3:1 mM/mM) el valor d'absorbància es veu reduït notablement, pràcticament a la meitat del valor inicial, mentre que els resultats de DLS mostren valors de diàmetre similars. Aquest fet s'explica a través de les imatges de microscòpia òptica, en les que als sistemes MLVs d'SPC es detecta una gran quantitat d'agregats de mida gran que queden fora del límit de detecció de l'aparell de DLS. Les imatges de *cryo*-TEM d'aquests sistemes mixtes també concorden amb els de les tècniques ja comentades, de manera que als sistemes mixtes SPC/FL2 amb baixa concentració de tensioactiu es detecten sistemes vesiculars. I pel que fa als sistemes mixtes amb concentració de tensioactiu més elevada, denoten la presència de nanoagregats, tal i com mostren les mesures de diàmetre de DLS.

Resulta especialment rellevant que els agregats mixtes SPC/FL2 siguin estables durant més de 15 dies a 4 °C i a temperatura ambient, i que en ser diluïts dos ordres de magnitud mantinguin l'estructura inicial, com mínim, durant 24 hores, tal i com o

Discussió

demostren el resultat de les Figures 57 i 59. Aquest fet representa un enorme avantatge en front d'utilitzar els compostos purs ja que els seus agregats són inestables termodinàmicament i en ser diluïts per sota de la seva cmc es desagreguen. Això faria que en ser introduïts a l'organisme es trobessin, al poc temps, en forma monòmer, diluint-se i essent susceptibles de ser degradats abans d'arribar al lloc on es vol produir un efecte farmacològic. En canvi, els sistemes mixtes amb SPC són estables i mantenen la seva estructura front la dilució. A més, presenten tots els beneficis dels liposomes, de manera poden ser derivatitzats amb la intenció de fer-los arribar al lloc diana. D'altra banda, els metal·losomes permeten, a més, incorporar un fàrmac hidrofílic al seu interior. Per suplir l'increment de permeabilitat degut a la inserció dels tensioactius, els metal·losomes podrien preparar-se afegint colesterol, una molècula que impermeabilitza les membranes. A més, la presència dels grups sulfonats presents als complexos permetria decorar els agregats amb substàncies que estableixin unions amb aquest grup, com ara el quitosan, una substància mucoadhesiva.

Els resultats obtinguts en la determinació del volum encapsulat concorden perfectament amb les dades de DLS i les imatges de *cryo*-TEM. Pel tres compostos d'FL2 el major volum encapsulat es dona al sistema amb menor proporció de compost (SPC/L2 3:2,5 mM/mM; SPC/TL2 3:0,5 mM/mM i SPC/PL2 3:2 mM/mM) que correspon al sistema vesicular mixt de mida més gran obtingut. Destaca el fet que el volum encapsulat d'aquests sistemes (5,7; 6,3; i 5,2 l solució/mol lípid per sistemes mixtes amb L2, TL2 i PL2 respectivament) és molt superior al determinat per sistemes MLVs d'SPC pur (1,8 l solució/mol lípid). Aquest fet és degut a que els sistemes mixtes SPC/tensioactiu FL2, tal i com s'ha vist a les imatges de *cryo*-TEM, tot i ser MVVs, no presenten gaires bicapes i aquestes es troben força distanciades entre si, un fet que es pot explicar per les repulsions causades per la càrrega negativa dels grups sulfonats dels compostos. Aquest fet es corrobora amb les dades de potencial Z que mostren valors marcadament més negatius en incorporar qualsevol dels compostos estudiats. En augmentar la proporció de tensioactiu el volum encapsulat disminueix de forma coherent amb la disminució de mida observada, fins a arribar a un valor de concentració on el volum encapsulat és nul, que es correspon a la zona on, mitjançant DLS i *cryo*-TEM, només es detecten nanoagregats, un resultat coherent amb l'existència de sistemes micel·lars/bicel·lars. Aquesta dicotomia en les característiques dels agregats segons formin vesícules i

nanoagregats també s'observa en els estudis de potencial Z, ja que hi ha un clar canvi de tendència en el seu valor en passar de sistemes vesiculars a nanoagregats (Figura 69).

Com s'ha pogut comprovar, a partir de la hidratació d'una pel·lícula fina homogènia mixta d'SPC i dels compostos FL2 es formen estructures mixtes on el lligand L2 i els complexos TL2 i PL2 s'incorporen a la bicapa lipídica. Aquest fet, tenint en compte les diferències morfològiques entre l'SPC i els diferents compostos FL2, hauria de fer augmentar la permeabilitat en comparació a liposomes. Dit d'una altra manera, la inserció dels compostos a la bicapa faria que aquesta fos menys compacta i per tant, més permeable. Els resultats de permeabilitat a la piranina en els sistemes mixtes SPC/FL2 que formen estructures vesiculars constaten aquesta hipòtesi. Els sistemes esdevenen més permeables a mida que s'augmenta la concentració de tensioactiu i les dades indiquen que l'alteració de les propietats barrera de la membrana fosfolipídica té lloc en el següent ordre: TL2 > PL2 >> L2. El complex tetracarbonílic és més voluminós que el pentacarbonílic i aquest més que el lligand fosfina, de manera que la seva inserció en la membrana podria causar zones d'empaquetament irregular, que seria tant més inestable (i permeable) com més voluminosa la molècula inserida.

Però l'alteració de la permeabilitat també pot explicar-se per una via alternativa. Diversos estudis posen de manifest que la inserció d'alcohols o àcids grassos a les bicapes lipídiques provoca fenòmens d'interdigitació,^{148, 149} Aquest fenomen, que consisteix en un empaquetament inusual a la regió de les cadenes alquíliques (Figura 124) altera significativament les propietats de la membrana (entre elles el seu gruix),¹⁵⁰ i per tant, la seva permeabilitat.¹⁵¹ En aquest sentit, la inserció dels tensioactius FL2 a les membranes lipídiques podria donar lloc a aquesta ordenació, fent que els agregats mixtes augmentin la seva permeabilitat concomitantment amb la proporció de tensioactiu. Una tècnica que podria donar llum sobre la manera en la que el FL2 modifiquen les bicapes és el SAXS, pel que en un futur esperem tenir resultats al respecte

Discussió

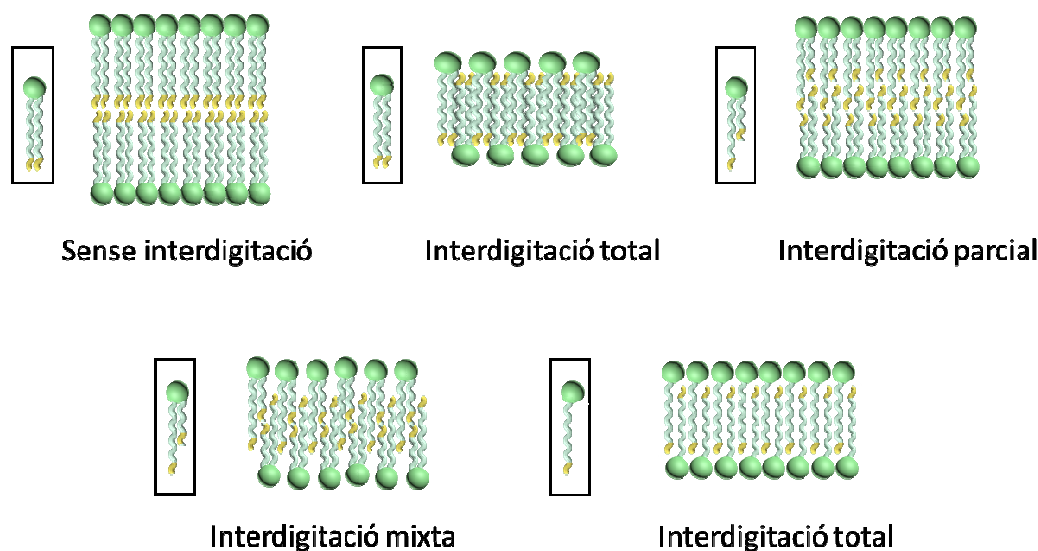


Figura 124. Representació esquemàtica dels diferents tipus d'interdigitació.

El fet d'augmentar la longitud de la cadena i passar dels compostos FL2 als FL6, fa que els nous sistemes mixtes presentin diferències significatives respecte el grup anterior.

Com en el cas de la FL2, els sistemes mixtes SPC/FL6 també formen diferents tipus d'agregats en funció de la proporció fosfolípid/tensioactiu, però ara la coordinació d'un o dos lligands fosfina al centre metàl·lic resulta determinant en quant al tipus d'agregat que es forma. En primer lloc, els resultats de DLS, absorbància (Fig. 92) i volum encapsulat indiquen que el lligand L6 dona lloc a sistemes vesiculars a concentracions baixes de tensioactiu i, en superar un valor de concentració crític (10 mM), només origina nanoagregats. D'altra banda, la inserció del lligand L6 a la membrana lipídica provoca un augment de la permeabilitat respecte liposomes purs en un grau similar al detectat als sistemes mixtes SPC/L2 (Figures 67 i 100). Per tant, globalment el lligand L6 té un comportament similar al dels metal·lotensioactiu amb cadenes hidrocarbonades amb 2 àtoms de carboni.

Contràriament, les mateixes tècniques indiquen que els sistemes mixtes amb el compost tetracarbonílic, TL6, presenten diversos tipus d'agregació. De nou, diverses tècniques independents (Figures 92 i 95) indiquen que a concentracions baixes de metal·lotensioactiu s'obtenen sistemes vesiculars, MVVs i LUVs, la mida dels quals decreix paulatinament en augmentar la concentració de complex. Però entre 3 i 4 mM de TL6 es formen nanoagregats de 10-15 nm de diàmetre. A diferència dels sistemes

analitzats fins ara, les imatges de *cryo*-TEM en aquest rang de concentració mostren tant estructures lineals com circulars d'uns 15 nm de llargada i diàmetre respectivament, que són compatibles amb l'existència de bicel·les. Per tant, podem afirmar que en les condicions indicades les mescles SPC/TL6 constitueixen unes estructures que no són capaces de formar la FL2 i, com es veurà, cap altre metal·lotensioactiu del present treball.

La formació de sistemes bicel·lars amb fosfolípids i tensioactius és un fenomen que ha estat descrit en nombroses publicacions.¹⁵² Les bicel·les es formen quan lípids de cadena llarga, que formen bicapes, són mesclats amb determinats tensioactius (o lípids de cadena curta) amb unes proporcions i condicions concretes. En aquest cas es formen agregats on els dos components es troben espacialment separats, de manera que les molècules de lípid formen una bicapa i les de tensioactiu es col·loquen envoltant el contorn d'aquesta (Figura 125).

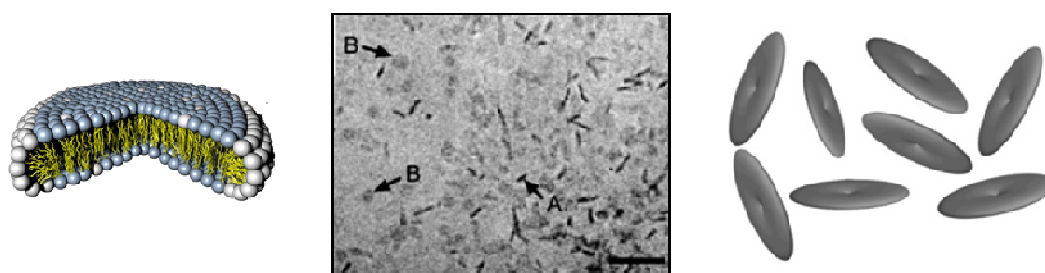


Figura 125. Representació esquemàtica d'una bicel·la i imatge *cryo*-TEM d'un sistema que conté bicel·les. Les fletxes marquen els sistemes bicel·lars (A) observats de costat (estructures lineals) i (B) observats des de dalt (forma circular). Imatge de *cryo*-TEM obtinguda al treball de Dürr *et al.*¹⁵²

En comparar les imatges obtingudes per *cryo*-TEM pel sistema mixt SPC/TL6 3:3 mM/mM (Figura 95) amb les imatges al treball de Dürr *et al.* i tenint en compte les diferències estructurals entre SPC i el complex TL6, podem concloure que els agregats obtinguts en les proporcions SPC/TL6 3:3 i 3:4 mM/mM són compatibles amb sistemes bicel·lars on les molècules d'SPC formen una bicapa que és envoltada de molècules de TL6, que la tanquen perimetralment.

Als sistemes mixtes amb major proporció de TL6, amb concentracions per sobre de 6 mM, els resultats de DLS indiquen la presència d'agregats supramoleculars de mida micromètrica. No obstant, no és possible visualitzar els agregats del sistema mixt

Discussió

SPC/TL6 3:10 mM/mM mitjançant *cryo*-TEM. Complementàriament s'observa que el valor d'absorbància en aquest punt és marcadament superior a la resta de sistemes mixtes, arribant a un valor proper al d'MLVs d'SPC, fet que indica la formació d'agregats supramoleculars de mida gran. Per tant, en aquest cas les tres tècniques proporcionen resultats aparentment contradictoris però que, realment, el que són és complementaris. Els agregats de mida gran detectats mitjançant l'absorbància queden fora del límit de detecció de l'aparell de DLS i són retinguts al paper de filtre al procés de *blotting* a la preparació de la reixeta per *cryo*-TEM. La microscòpia òptica permet corroborar aquest fet, ja que a les imatges obtingudes pel sistema SPC/TL6 3:10 mM/mM s'observen agregats amb forma de bastons de mida gran, entre 5-10 μm (Fig 96).

Als complexos TLn, la disposició dels grups fosfina i sulfonat en els lligands $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$, coordinats al fragment metàl·lic $\{\text{Mo}(\text{CO})_4\}$, permet establir una analogia amb les característiques d'agregació dels tensioactius bolamfífils. Aquest tipus de tensioactius, a diferència dels geminals, són molècules que contenen dos grups polars units per una cadena hidrofòbica (Figura 126).¹⁵³ Determinats estudis posen de manifest que aquest tipus de tensioactius en solució aquosa poden formar sistemes vesiculars,¹⁵⁴ estructures tubulars,¹⁵⁵ estructures fibroses,¹⁵⁶ i estructures helicoidals.¹⁵⁷ En una publicació de Yan *et al.*¹⁵⁸ es posa de manifest la formació de diferents tipus d'agregats en un sistema mixt bolamfífil/amfífil en funció de la proporció de compostos. En aquest sentit, els sistemes mixtes SPC/TL6, que poden considerats com metal·lotensioactius bolamfífils, amb una longitud de la cadena hidrocarbonada relativament llarga, donen lloc a una gran varietat d'agregats en funció de la proporció SPC/TL6.

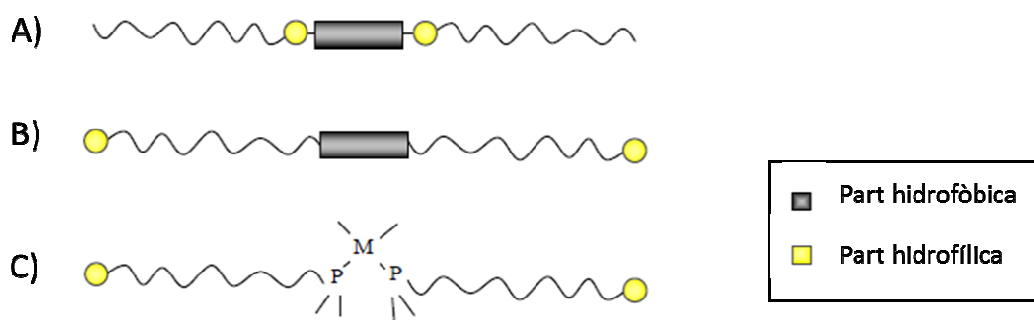


Figura 126. Representació esquemàtica de A) un tensioactiu geminal; B) tensioactiu bolamfífil; i C) metal·lotensioactiu TLn.

D'entre els agregats vesiculars dels sistemes mixtes SPC/FL6, els que presenten major volum encapsulat corresponen a les proporcions 3:1 mM/mM de mesclades SPC/L6 i SPC/TL6, i 3:0,5 mM/mM per SPC/PL6, amb 2,5, 2,8 i 2,4 l solució/mol lípid respectivament. Els valors obtinguts per a aquest paràmetre en funció de la concentració d'MTS es correlacionen amb el tipus d'agregat determinat per DLS. Així, al lligand L6, el volum encapsulat és màxim a la proporció d'SPC/L6 3:1 mM/mM i a partir d'aquest valor decreix amb el diàmetre i a partir de 8 mM, zona on només es detecten nanoagregats per DLS, el volum encapsulat és nul. Als sistemes mixtes d'SPC amb complex TL6, el valor d'aquest paràmetre es veu reduït a la meitat en passar del sistema SPC/TL6 3:1 mM/mM al 3:2 mM/mM congruentment amb el canvi de mida d'un sistema a l'altre. En arribar a la proporció 3:3 mM/mM s'observa que no hi ha volum encapsulat, com era d'esperar donat que amb aquesta proporció molar s'obtenen agregats nanomètrics que podrien correspondre a sistemes bicel·lars. No obstant, als sistemes mixtes amb proporció elevada de complex, corresponents a agregats grans amb forma de bastons (segons les imatges de microscòpia òptica) el valor de volum encapsulat també és zero. Aquest fet és totalment compatible amb l'existència de bastons que no incorporin medi aquós al seu interior. Ara bé, en el cas d'haver-se format sistemes vesiculars grans també seria compatible amb la pèrdua de la sonda fluorescent durant la SEC, justificada per l'alta permeabilitat que el complex ocasiona a les membranes (Fig. 98).

Pel que fa als sistemes mixtes SPC/PL6, els resultats de DLS i absorptància tornen a ser parcialment contradictoris ja que mentre en el primer cas el tipus d'agregat obtingut és independent de la concentració de tensioactiu, obtenint-se sistemes vesiculars micromètrics dins de tot el rang de concentracions estudiades, en el segon es produeix un augment amb la concentració, que podria indicar un augment de la mida dels agregats. Ara bé, aquest fet s'explica per l'absorptància pròpia del complex, que presenta certa coloració. Les imatges de *cryo*-TEM dels agregats SPC/PL6 corroboren aquesta interpretació, ja que s'hi observen MVVs de mida micromètrica independentment de la concentració de metal·lotensioactiu. No obstant, les membranes de les vesícules pel sistema mixt amb més elevada concentració de complex, SPC/PL6 3:10 mM/mM (SPC/PL6 Ves*) presenten deformacions (Fig 97), fet que podria indicar que la major quantitat de complex provoca un empaquetament menys compacte de les bicapes. Les dades de permeabilitat i volum encapsulat corroboren aquest fet. Al sistema mixt

Discussió

SPC/PL6 3:10 mM/mM el volum encapsulat és zero, tot i que per *cryo*-TEM s'observen vesícules. No obstant, si es té en compte la permeabilitat i els valors de $t_{1/2}$ dels sistemes mixtes d'SPC amb PL6 (Figures 98 i 100), que mostren que un sistema mixt SPC/PL6 3:3 mM/mM perd el 50% del seu contingut en tant sols 45 min, es pot preveure que en augmentar la proporció de complex fins a la relació SPC/PL6 3:10 mM/mM la membrana serà molt més permeable. Això explicaria que malgrat s'observin vesícules per *cryo*-TEM, la determinació del volum encapsulat doni zero: l'elevada permeabilitat de les bicapes fa que el fluoròfor encapsulat surti durant la purificació dels agregats per la columna d'exclusió molecular.

Així, per qualsevol dels compostos FL6 els agregats esdevenen més permeables en augmentar la proporció de tensioactiu, i l'alteració de les propietats barrera de la membrana fosfolipídica té lloc en el següent ordre: TL6 > PL6 >> L6. Tal i com s'ha vist pels complexos de cadena més curta, el complex tetracarbonílic, en ser més voluminos, altera més la membrana lipídica que el complex pentacarbonílic, mentre que els sistemes mixtes amb el lligand L6 són els menys permeables. Addicionalment, els valors de potencial Z mostren canvis de tendència en funció de la concentració, el quals es poden correlacionar amb canvis en l'estructura d'agregats.

Els sistemes mixtes d'SPC amb els compostos d'aquesta família són estables durant més de 15 dies a 4 °C i a temperatura ambient. Pel que fa a l'efecte de la dilució, tant els sistemes vesiculars com els nanoagregats dels sistemes mixtes SPC/TL6 són estables. Aquest fet és especialment notori pel cas del sistema que forma bicelles, ja que la majoria d'aquest tipus d'agregats formats per fosfolípids de cadenes desiguals són totalment inestables front la dilució, com és el cas de les bicelles DMPC/DHPC (Figura 59).

D'altra banda, també els sistemes mixtes vesiculars d'SPC/PL6 amb baixa concentració de complex no resulten alterats quan es dilueixen. Però en augmentar la concentració de complex els agregats d'SPC/PL6 esdevenen més inestables, observant-se pel cas SPC/PL6 3:10 mM/mM una important disminució de mida amb la dilució (diàmetre inicial: ~ 700 nm, diàmetre final: ~250 nm). El sistema SPC/PL6 Ves* presenta, per tant, propietats força diferents als sistemes vesiculars amb baixa concentració de PL6.

Finalment, els resultats obtinguts amb els sistemes mixtes d'SPC amb TL10 o PL10 són compatibles amb l'existència d'una única estructura en el rang de concentracions

estudiat: les vesícules. D'acord amb DLS (Fig. 119) es formen majoritàriament agregats supramoleculars d'aproximadament d'1 µm diàmetre. Són unes estructures diferents dels MLVs d'SPC, ja que, com passa amb els compostos FL2 i FL6, l'absorbància a 600 nm decreix considerablement en passar de sistemes MLVs d'SPC al primer sistema mixt SPC/complex FL10. I l'augment d'absorbància que es produeix a concentracions majors té la seva raó en la coloració pròpia dels complexos. Aquest resultat poden explicar-se per la similitud entre la llargada dels MTS FL10 i la de les cadenes dels fosfolípids, que farien de les membranes l'empaquetament més favorable a totes les relacions SPC/FL10.

5.3. ALLIBERAMENT DE CO

L'alliberament de CO per molts dels CORMs estudiats fins al moment ve desencadenat generalment per hidròlisi de la molècula en medi aquós. La cinètica d'aquest procés influeix directament en el seu potencial ús com a agent terapèutic donat que el temps de vida mitjana del CORM, com s'ha comentat amb anterioritat, ha de ser prou llarg per permetre que el compost arribi al lloc a tractar dins l'organisme. Així, per exemple, pel CORM-3, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glicinat})]$, una de les molècules alliberadores de CO més emprades, el temps de vida mitjana és només de 3,6 min,⁸⁴ tot i que també han estat estudiats altres complexos metàl·lics, en concret una sèrie de complexos tipus $(\eta^4\text{-2-pyrone})\text{Fe}(\text{CO})_3$, amb temps de vida mitja més llargs, per sobre d'una hora.^{107, 159}

Els resultats demostren que els MTS estudiats en aquest treball presenten grups carbonílics coordinats a l'àtom metàl·lic (Mo), són solubles en aigua i estables en la foscor en medi aquós. Addicionalment, el molibdè és un metall essencial per als éssers humans a nivell de traces on forma part de molts metal·loenzims,^{160, 161} per tant, no presenta una elevada toxicitat en comparació amb altres metalls. Aquest conjunt de característiques fan d'aquests compostos uns bons candidats per a alliberar CO sota determinades condicions. La bibliografia conté força estudis amb complexos organometàl·lics de molibdè emprats com a CORMs. Un exemple és el treball de Seixas *et al.*¹⁶² on el complex $\text{fac-}[\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{histidinat})]\text{Na}$ és utilitzat com a CORM exhibint efectes terapèutics en diversos models animals. El complex estudiat presenta baixa toxicitat, i en solució aquosa i presència d'O₂ es descomposa alliberant CO en la foscor, a 37 °C. No obstant, no hi ha precedents de sistemes mixtes d'SPC amb

Discussió

metal·lotensioactius utilitzats com a CORMs, de manera que la present Tesi Doctoral proposa un innovador sistema alliberador de CO que pot tenir finalitats terapèutiques.

Els resultats d'FTIR (tant pel que fa a les bandes de la molècula com a la detecció de CO_(g) a la fase gasosa) demostren que els metal·lotensioactius són estables en solució aquosa i en la foscor durant, com a mínim, 5 h.

Les possibilitats d'aquests complexos per ser emprats com a CORMs es van avaluar inicialment mitjançant l'assaig amb mioglobina (Apartats 4.2.1.8. i 4.2.2.8.). Els assajos amb mioglobina posen de manifest que els MTS FL2 i FL6 són capaços d'alliberar CO (Fig. 71 i 103) i les seves cinètiques d'alliberament indiquen que en qualsevol de les formes estudiades (complex pur en forma monòmer o sistemes mixtes SPC/MTS) el complex tetracarbonílic allibera CO més ràpidament que el seu anàleg pentacarbonílic. En tots els casos, a més, els sistemes presenten temps de vida mitjana molt llargs.

Ara bé, diverses publicacions posen en dubte aquest mètode. Al 2012 el grup d'R. Motterlini troba importants discrepàncies en les velocitats d'alliberament de CO de dos CORMs en funció del mètode de detecció.¹⁶³ Així, per als complexos [Ru(CO)₃Cl₂]₂ (CORM-2) i [Ru(CO)₃Cl(glycinate)] (CORM-3) es detecta alliberament de CO emprant la mioglobina mentre que no se'n detecta utilitzant un elèctrode selectiu de CO. Inicialment es planteja el fet que en alguns CORMs resulti necessària la interacció amb components biològics per tal de promoure l'alliberament. No obstant, poc més tard, el grup de Poole R.K. posa de manifest en un treball que és l'agent reductor que cal afegir al medi, el ditionit sòdic, i no l'Mb, qui promou o desencadena l'alliberament de CO als CORMs.¹³⁷

Les incerteses anteriors s'han resolt en el present treball mitjançant dues metodologies que representen una novetat. D'una banda, s'ha pogut confirmar directament en fase gasosa la presència de CO (Figura 78) provinent dels metal·lotensioactius. No és un tema menor, ja que alguns CORMs el que alliberen finalment és CO₂.¹³⁸ D'altra banda, l'anàlisi per FTIR d'alíquotes de la suspensió ha permès determinar la cinètica de l'alliberament en ser irradiades les mostres (Figures 76, 107 i 122).

Una alternativa per activar l'alliberament de CO per aplicacions biològiques és mitjançant la fotoactivació. D'aquesta manera un compost metàl·lic carbonílic, estable en solució aquosa durant un període de temps prou llarg com per a arribar a la seva diana, alliberarà un (o més) equivalents de CO en ser excitat fotoquímicament. El gas

alliberat difondrà a l'organisme i la vacant generada al compost probablement sigui ocupada per una molècula de solvent per mantenir l'esfera de coordinació del complex.

El fet de poder modular l'alliberament de CO fotoquímicament resulta molt atractiu per a aquests compostos. Així doncs, mitjançant FTIR es va seguir la variació de la banda més característica dels grups carbonils de cada compost en ser irradiats. L'alliberament de CO activat fotoquímicament per la resta de compostos es va determinar només amb UVA i llum visible, donat que són les radiacions menys energètiques, i per tant més compatibles per a l'ús en humans.

Les dades obtingudes posen de manifest que els metal·lotensioactius FL2 i FL6 alliberen CO en ser irradiats a 365 nm o amb llum visible, essent més important l'alliberament amb llum UVA. Els complexos FL10 també són capaços d'alliberar CO en ser irradiats a 365 nm i, a la vista dels resultats que indiquen que en augmentar la longitud de la cadena hidrocarbonada no hi ha canvis significatius en l'alliberament de CO (Figures 76 i 107), és d'esperar que aquests compostos també siguin capaços d'alliberar CO en ser irradiats amb llum visible, una hipòtesi que queda pendent de confirmar. Els resultats obtinguts amb totes les famílies també mostren que el tipus d'agregat no influeix en la velocitat d'alliberament, pel que es pot concloure que cap dels estats d'agregació caracteritzats no modifica la seva fotosensibilitat. A la vista dels resultats, per tant, es pot concloure que tots els MTS sintetitzats en aquest treball poden ser classificats com a PhotoCORMs.

5.4. TOXICITAT

Donada la seva novetat, no hi ha literatura científica referent a la toxicitat dels metal·lotensioactius del present treball sobre cap línia cel·lular. Per aquest motiu es va avaluar aquest paràmetre mitjançant la determinació amb XTT de la viabilitat cel·lular de fibroblasts dèrmics humans en ser tractats durant 24 h amb suspensions de: a) compostos purs o, b) sistemes mixtes d'SPC/MTS en sistemes vesiculars o nanoagregats. L'assaig posa de manifest que els metal·losomes d'SPC amb compostos FL2 i FL6 no resulten tòxics a cap de les concentracions de complex estudiades (entre 50 i 1000 μM), de manera que la viabilitat cel·lular és la mateixa que la del blanc, liposomes d'SPC. Per contra, els compostos purs, formant nanoagregats, i els sistemes vesiculars amb elevada concentració de complex PL6 (ves*), presenten una toxicitat que

Discussió

és 10 i 20 vegades major a la del control pels compostos tetracarbonílics (TL2 i TL6) i pentacarbonílics (PL2 i PL6) respectivament. Es pot apreciar també que, en general, els compostos pentacarbonílics resulten més nocius que els tetracarbonílics. La concentració màxima no tòxica és de 100 μM per TL2 i TL6, purs o formant nanoagregats, i 50 μM pels MTS PL2 i PL6, purs, formant nanoagregats i als sistemes vesiculars* SPC/PL6.

Nombrosos treballs inclouen l'ús de liposomes com a transportadors de fàrmacs per molts dels avantatges que aquests comporten. Entre altres, el fet d'encapsular un compost al liposoma pot evitar els efectes secundaris del fàrmac, resultant menys tòxic el sistema amb el liposoma que el fàrmac lliure.¹⁶⁴ A més, permeten millorar la solubilitat i biodisponibilitat d'alguns fàrmacs¹⁶⁵ i produir un alliberament més controlat i sostingut del compost encapsulat.¹⁶⁶ En aquest sentit els metal·losomes haurien de presentar els mateixos avantatges amb la diferència que en aquest cas el compost amb propietats farmacològiques no es troba encapsulat sinó formant part de la bicapa lipídica o del nanoagregat.

5.5. μ -FTIR EN CULTIUS CEL·LULARS

Els resultats de l'estudi mitjançant μ -FTIR de cultius cel·lulars de fibroblasts humans tractats amb sistemes mixtes SPC/MTS en sistemes vesiculars o formant nanoagregats mostren bandes pròpies dels complexos, pel que es pot afirmar que han estat internalitzats. Per tant, la manca de toxicitat dels sistemes vesiculars no és una conseqüència d'una possible no interacció amb les cèl·lules, sinó que tot apunta cap a la ruta que segueixen els agregats una vegada han entrat en elles. En aquest sentit, els sistemes de nanoagregats deuen seguir-ne una altra, donada la seva major toxicitat (Figura 80).

D'altra banda, en les cèl·lules incubades (en la foscor) amb els metal·lotensioactius, es detecten, mitjançant l'anàlisi estadístic dels espectres, canvis en les bandes típiques de l'estructura cel·lular, uns canvis que són dependents de la dosi.

L'anàlisi mitjançant PCA i les relacions entre les bandes més rellevants a nivell biològic posen de manifest que les cèl·lules tractades amb el complex PL2 presenten més oxidació lipídica que les tractades amb el complex TL2, un fet que podria estar relacionat amb l'elevada toxicitat del complex pentacarbonílic. D'altra banda, el

quocient proteïna/lípid proporciona diferències significatives entre el control i les cèl·lules tractades en les diferents condicions, essent més evidents els canvis a concentracions elevades de complex. Aquest fet es pot explicar per la internalització dels sistemes mixtes, els fosfolípids dels quals incrementarien la banda IR dels CH₂, i es correlaciona amb l'augment del quocient A₁₉₄₃/A₁₆₆₅ (MTS/banda amida), indicatiu de l'entrada dels complexos. Contràriament, a les cèl·lules incubades amb liposomes no s'observa la disminució de la relació A₁₆₅₄/A₂₉₂₁, la qual cosa indicaria que no s'internalitzen, un fet que podria estar relacionat amb les diferències que presenten respecte als sistemes SPC/MTS, la seva mida i càrrega.

5.6. PREPARACIÓ DE SISTEMES MIXTES SPC/MTS MITJANÇANT TÈCNiques DE MICROFLUÍDICA

Els resultats dels sistemes mixtes SPC/FL6 obtinguts mitjançant tècniques de microfluídica posen de manifest que, en general, tant la concentració d'entrada com el flux total (TFR) no tenen efecte sobre la mida dels agregats formats. Ara bé, el fet de modificar el flux proporcional entre fases org/aq (FRR) afecta a la mida dels agregats obtinguts, sent de mida inferior en augmentar el flux de la fase aquosa. No obstant, el paràmetre més important a tenir en compte és l'elecció del dissolvent, donat que s'observen diferències de mida importants entre MeOH o EtOH. Un augment de la força iònica fa que la mida dels agregats sigui més gran, tot i que no és un efecte molt notable. Per tant, és possible regular, dins dels límits estudiats, la mida dels agregats a través dels factors propis de la microfluídica.

Sorprenentment, a les imatges de *cryo*-TEM pels sistemes mixtes SPC/TL6 3:3 mM/mM i SPC/PL6 3:1 mM/mM, emprant EtOH a la fase orgànica, amb TFR 10 ml/min i FRR 1:1, s'observen sistemes MLVs amb les bicapes molt properes entre si i amb un diàmetre que varia entre els 500-800 nm. És una diferència notable respecte el que s'havia observat als sistemes preparats a partir de films homogenis,

Cal tenir en compte que la presència d'EtOH al medi, un dissolvent que se sap modifica les propietats de les membranes.

6. Conclusions

En base als objectius plantejats i als resultats obtinguts, les conclusions que es poden extreure d'aquest treball es resumeixen en:

6.1. Síntesi

- S'ha sintetitzat i caracteritzat una família de fosfines tensioactives d'estructura $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ ($n = 2, 6$ i 10) i, a partir d'elles, dues famílies de metal·lotensioactius carbonílics de molibdè: $\text{cis}[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{Ln})_2]$ (TLn) i $[\text{Mo}(\text{CO})_5\text{Ln}]$ (PLn).
- El procés de síntesi del precursor halosulfonat per als compostos de cadena més llarga ($\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$) ha estat optimitzat, obtenint-se el producte de forma més pura i suposant alhora un estalvi econòmic.
- La síntesi dels compostos PLn s'ha dut a terme a partir del desenvolupament d'una nova via sintètica que proporciona els complexos amb bon rendiment i elevada puresa, millorant significativament les condicions de reacció i d'estalvi econòmic.

6.2. Caracterització dels tensioactius

- Tots els compostos sintetitzats en aquest treball formen agregats supramoleculars en solució aquosa, fet que ha estat determinat mitjançant DLS, espectroscòpies visible i de fluorescència, cryo-TEM i SAXS. Les imatges de microscòpia electrònica posen de manifest que majoritàriament s'obtenen vesícules multivesiculars, generalment de mida micromètrica.
- S'ha aprofitat la fluorescència intrínseca dels compostos per determinar la seva concentració micel·lar crítica (cmc). S'observa que la complexació del metall als lligands tensioactius incrementa la seva tendència a l'autoagregació, donat que els valors de cmc dels MTS són marcadament inferiors als dels seus lligands de partida. Addicionalment, els valors de cmc dels compostos TLn són inferiors als dels seus anàlegs PLn.
- A excepció del complex TL6, els tensioactius i metal·lotensioactius sintetitzats en aquest treball presenten poc caràcter solubilitzant, donat que en el rang de concentracions estudiats no tenen cap efecte sobre liposomes durant, com a mínim durant 72 h, fins i tot a concentracions marcadament superiors a la seva cmc.

Conclusions

- El complex TL6 es capaç de solubilitzar liposomes, originant bicel·les, a unes relacions molars SPC/TL6 3:4 i 3:6 mM/mM. En augmentar la concentració de complex per sobre del valor anterior s'obtenen agregats micromètrics.

6.3. Caracterització d'agregats mixtes SPC/tensioactiu

- D'acord amb els resultats de cryo-TEM i de les espectroscòpies de DLS, visible i de fluorescència, els sistemes mixtes SPC/FL2 i SPC/L6 obtinguts per hidratació d'un film homogeni formen diferent tipus d'agregats en funció de la proporció SPC/tensioactiu. A concentracions baixes de tensioactiu s'obtenen agregats vesiculars, la mida dels quals disminueix en augmentar la concentració de compost fins a arribar a un valor crític a partir del qual només es detecten nanoagregats.
- Els sistemes mixtes SPC/TL6 obtinguts per hidratació d'un film homogeni formen diversos tipus d'agregat en funció de la proporció SPC/TL6. A concentracions baixes de complex s'obtenen sistemes vesiculars, mentre que a les proporcions SPC/TL6 3:3 i 3:4 mM/mM es detecten agregats nanomètrics compatibles amb sistemes bicel·lars. A elevades concentracions de complex s'obtenen agregats de mida micromètrica amb forma de bastons, com s'ha constatat mitjançant microscòpia òptica.
- La mida dels agregats obtinguts pels sistemes mixtes SPC/PL6, SPC/TL10 i SPC/PL10 per hidratació d'un film homogeni és independent de la concentració de complex, obtenint-se agregats micromètrics en tot el rang de concentracions estudiat.
- Els agregats mixtes SPC/tensioactiu obtinguts són estables a 4 °C i a temperatura ambient durant, com a mínim 15 dies. I, a excepció dels sistemes SPC/PL6 (Ves*), també són estables front la dilució durant, com a mínim 24 h fins i tot a concentracions inferiors a la seva cmc. En aquest sentit, resulta notori el cas de les bicel·les SPC/TL6, ja que la majoria d'aquest tipus d'agregats formats per fosfolípids de cadenes desiguals són totalment inestables front la dilució. Els agregats SPC/PL6 (Ves*) són paricalment estables front la dilució, de manera que en diluir-los la seva mida disminueix pràcticament un terç.
- La inserció dels tensioactius a la membrana lipídica altera les seves propietats barrera de manera que els metal·losomes esdevenen més permeables en

augmentar la concentració de tensioactiu. L'alteració de les propietats barrera de la membrana fosfolipídica té lloc en el següent ordre: $TL_n > PL_n \gg L_n$ (per $n = 2$ i 6).

- Les dades de volum encapsulat i potencial Z es correlacionen amb el tipus d'agregat obtingut.

6.4. Alliberament de CO

- L'assaig de mioglobina posa de manifest que els complexos FL2 i FL6, així com els seus sistemes mixtes amb SPC són capaços d'alliberar CO presentant temps de vida mitjana molt llargs.
- L'assaig de mioglobina pot ser substituït per un altre, molt més eficaç, fonamentat en l'espectroscòpia d'IR que permet valorar la pèrdua de CO dels CORMs i l'aparició de CO en una fase gasosa en contacte amb la mostra.
- L'alliberament de CO pot ser modulats fotoquímicament mitjançant radiació UVA o visible, fet que ha estat constatat mitjançant FTIR seguint la variació de les bandes característiques dels grups carbonils dels complexos.
- El tipus d'agregat no influeix en la velocitat d'alliberament de CO quan aquest es duu a terme mitjançant activació fotoquímica.
- La detecció de les bandes de vibració-rotació del CO en fase gasosa mitjançant FTIR confirma la presència del gas provinent dels metal·lotensioactius irradiats. D'aquesta manera es descarta la possibilitat de que el que s'alliberi sigui CO_2 .

6.5. Assajos en cultius cel·lulars

- Els metal·losomes no són tòxics en cap de les concentracions estudiades (fins $1000 \mu M$), mentre que els sistemes nanoagregats o els complexos purs presenten, comparativament, una toxicitat elevada.
- Els resultats de l'estudi mitjançant μ -FTIR de cultius cel·lulars de fibroblasts humans tractats amb sistemes mixtes SPC/MTS en sistemes vesiculars o formant nanoagregats mostren els complexos internalitzats.
- Es detecten canvis dependents de la dosi en les bandes típiques de l'estructura cel·lular en cultius tractats amb els complexos durant 24 hores.

Conclusions

6.5. Sistemes mixtes SPC/FL6 preparats mitjançant tècniques de microfluídica

- La concentració d'entrada i el flux total (TFR) no tenen un efecte significatiu sobre la mida dels agregats formats. No obstant, el fet de modificar el flux proporcional entre fases orgànica i aquosa (FRR) afecta a la mida dels agregats obtinguts, sent de mida inferior en augmentar la proporció de fase aquosa.
- L'elecció del dissolvent és el paràmetre més important en aquesta metodologia donat que s'observen diferències de mida importants segons s'empri MeOH o EtOH com a fase orgànica.
- Les imatges de *cryo*-TEM dels sistemes mixtes SPC/TL6 3:3 mM/mM i SPC/PL6 3:1 mM/mM obtinguts emprant EtOH com a la fase orgànica, amb TFR 10 ml/min i FRR 1, mostren sistemes MLVs, d'uns 500-800 nm de diàmetre.

6. Conclusions

Taking in account the objectives and the results obtained, the conclusions that can be drawn from this work are summarized in:

6.1. Synthesis

- It has been synthesized a family of surfactant phosphines with the structure $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ ($n = 2, 6$ i 10), and two families of molybdenum carbonyl metallosurfactants: $\text{cis}[\text{Mo}(\text{CO})_4(\text{Ln})_2]$ (TLn) i $[\text{Mo}(\text{CO})_5\text{Ln}]$ (PLn).
- The synthetic method for the compound $(\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na})$, needed for the synthesis of FL10 compounds, has been improved. The modifications carried out allow to obtain the compound pure without a difficult purification process and presenting economic advantages.
- It has been developed a new method for the synthesis of PLn compounds. The new method provides good yield and high purity compounds, and at the same time makes the process more simple and economic.

6.2. Metallosurfactant characterization

- All the compounds synthesized in this work form supramolecular aggregates in aqueous solution. This fact has been demonstrated by DLS, UV-VIS, fluorescence, *cryo*-TEM and SAXS. The electronic microscopy images show that the aggregates formed are mostly multivesicular vesicles of micrometric size.
- Inherent fluorescence of compounds has been used to determine their critical micellar concentration (cmc). The comparison between free phosphines and their respective molybdenum complexes show that cmc values are lower for complexes than their respective phosphines. Moreover, the cmc values are lower for TLn than for PLn complexes.
- With the exception of TL6 complex, the surfactants and metallosurfactants synthesized in this work present low solubilizing properties. They do not solubilize liposomes in all the concentration range studied, at least for 72 hours, even at concentrations higher than their cmc.
- TL6 solubilizes liposomes originating bicelles at the molar ratios: SPC/TL6 3:4 i 3:6 mM/mM. In incrementing the complex concentration micrometric aggregates are formed.

6.3. Mixed SPC/surfactant aggregates characterization.

- According to *cryo*-TEM and DLS, visible and fluorescence spectroscopy. SPC/FL2 and SPC/L6 mixed systems obtained by hydration of homogeneous dry films, form different type of aggregates ranging from vesicular to nanometric systems depending on the molar ratio SPC/surfactant. Upon a critical value of concentrations is only possible to detect nanoaggregates.
- SPC/TL6 mixed systems from homogeneous dry films form different type of aggregates depending on the SPC/TL6 ratio. At low concentration of complex they aggregate into vesicular systems. At the ratios SPC/TL6 3:3 and 3:4 mM/mM bicellar systems can be detected. And at high concentrations of complex supramolecular systems of micrometric size are formed, presenting rod structures as it has been visualized by optic microscopy.
- The size of SPC/PL6, SPC/TL10 and SPC/PL10 mixed systems prepared from an homogeneous dry film are independent on the SPC/surfactant ratio, showing micrometric aggregates in all the concentration range studied.
- All the obtained mixed systems are stable at 4 °C and room temperature, at least for 15 days. And, with the exception of the systems SPC/PL6 (Ves*), they are also stable upon dilution, at least for 24 hours, and after diluting below their cmc. It should be noted that bicelles are stable too, the majority of this systems are unstable upon dilution. SPC/PL6 (Ves*) systems are partially unstable, upon dilution their size decreases.
- The membrane permeability is affected by the insertion of surfactants to the lipidic membrane. The metallosomes formed are more permeable in incrementing the surfactant concentration. The barrier properties of the membrane is modified following $TL_n > PL_n \gg L_n$ (for $n = 2$ and 6).
- Encapsulated volume and Z-potential values are agree with the results obtained by DLS and *cryo*.TEM.

6.4. CO Delivery

- Myoglobin assay shows that the metallosurfactants FL2 and FL6, as their mixed systems with SPC, are able to deliver carbon monoxide (CO), and the molecules show a low CO release, having a elevated half life.
- Myoglobin assay can be replaced by a more effective method, based on infrared microscopy. This method evaluates the loss of CO by CORMs and allows to detect CO in the gaseous phase in contact with sample inside a cell.
- CO delivery can be modulated photochemically with UVA and visible light radiation. This fact has been demonstrated by following the changes in the characteristic carbonyl bands of the metallosurfactants.
- CO delivery is independent of the aggregates type (vesicular systems or nanoaggregates) when the delivery is promoted by irradiation.
- Using FTIR is possible to detect the vibrational-rotational bands of CO_(g) in the gaseous phase of a closed system in contact with a solution of MTS. Discarding the possibility of CO_{2(g)} as it has been seen for other CORMs.

6.5. Assajos en cultius cel·lulars

- Metallosomes are not toxic in all the studies range. Instead, nanoagregates or pure compounds are 10 and 20 times more toxic for TL_n and PL_n (n = 2 and 6) respectively.
- The results using μ -FTIR of human fibroblasts cells incubated for 12 hours with mixed systems SPC/MTS have been detected in cells, independently if they are forming vesicular systems or nanoaggregates.
- It's possible to detect changes in the typical absorption bands corresponding to cell structure, this changes are higher in increasing the concentration of the complex.

6.5. Myxed systems SPC/FL6 prepared using microfluidics

- The initial concentration and the total flow rate (TFR) do not possess a significant effect over the size of the aggregates formed. However, the flow rate

Conclusions

ratio between the aqueous and the organic is important. The aggregates formed become smaller in incrementing the aqueous phase.

- The most important parameter in this technique is the election of the organic solvent. Showing important changes when using EtOH instead of MeOH.
- *Cryo*-TEM of mixed systems SPC/TL6 3:3 mM/mM i SPC/PL6 3:1 mM/mM preparing using EtOH as organic solvent, with TFR 10 ml/min and FRR 1, show MLVs, of about 500-800 nm of diameter.

ANNEX . Experimental. Síntesi de compostos**A.1. Precursors halosulfonats****A.1.1. Síntesi del precursor L6 ($\text{Cl}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$).**

Per a la síntesi d'aquest compost es mesclen, a l'interior d'un baló d'1l de capacitat, 14.43 g (70.1mmol) de $\text{Br}(\text{CH}_2)_6\text{Cl}$ i 8.71 g (68.8 mmol) de Na_2SO_3 anhidre dissolts en una solució bifàsica preparada amb 320 ml d'etanol absolut i 250 ml d'aigua destil·lada. La mescla resultant es porta a reflux i es deixa reaccionar durant 4h mantenint la solució sota una agitació enèrgica. Passat aquest temps es deixa refredar la solució resultant a temperatura ambient i es transvasa a un embut d'extracció. Donat que no s'aconsegueix una bona separació de fases s'afegeixen 50 ml de CHCl_3 , s'agita vigorosament i es deixa reposar uns 15 min. Un cop les fases s'han separat, es separa la fase orgànica, situada a la part inferior i es renta la part aquosa tres vegades amb 50 ml de cloroform amb l'objectiu d'eliminar les restes de $\text{Br}(\text{CH}_2)_6\text{Cl}$. La solució resultant s'evapora a sequedat i s'obtenen 16.26 grams de sòlid blanc format per una mescla de NaBr, $\text{Cl}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$ i $\text{NaO}_3\text{S}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$. Segons l'anàlisi de l'espectre de ^1H -RMN s'estima una proporció producte monosulfonat/ producte disulfonat aproximada de 10:1.2 (Figura 32). Amb l'objectiu de separar el precursor L6 del subproducte disulfonat i el NaBr, el sòlid resultant de la reacció es recristal·litza amb etanol absolut bullent. Es dissolen els 16.26 grams en 450 ml d'etanol bullent a l'interior d'un baló, es deixa la solució agitant durant uns 15 min a ebullició per assegurar que tot el precursor L6 es trobi dissolt en solució i tot seguit es filtra en calent en un embut Büchner, d'aquesta manera el producte disulfonat, insoluble en etanol, és fàcilment separable. El filtrat es concentra fins a inici de cristal·lització i s'indueix la precipitació del $\text{Cl}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$ en un bany d'aigua i gel. Finalment es filtra amb un embut Büchner i es deixa assecar el producte al buit. S'obtenen 9.88 grams de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$, amb un rendiment del 65%.

A.1.2. Síntesi del precursor L10 ($\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$).

Per a la síntesi del precursor L10 s'introdueixen 68 g (319 mmol) de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{Cl}$ en un baló de tres boques i es dissolen en una mescla bifàsica formada per 320 ml d'etanol absolut i 70 ml d'aigua destil·lada. Es porta la solució a reflux agitant enèrgicament i tot

Annex

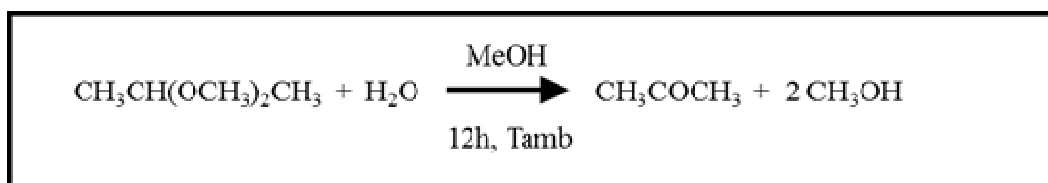
seguit s'addiciona molt lentament durant 4 hores i amb l'ajut d'un perfusor ($v = 0.3$ ml/min), una solució de 4.50 g (35.5 mmol) de Na_2SO_3 anhidre dissolts en 70 ml d'aigua destil·lada. Un cop acabada l'addició es deixa reaccionant a reflux durant 4 hores més i passat aquest temps s'espera a que la solució arribi a temperatura ambient. Llavors, la solució es transvasa a un embut, s'afegeixen 200 ml de cloroform a cada fracció i es separen les fases. Les fases orgàniques s'evaporen fins eliminar tot el dissolvent, de manera que al baló només queda un líquid, que és el $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{Cl}$ que no ha reaccionat degut al gran excés en que es trobava, i un sòlid blanc en suspensió, corresponent a $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$. Es filtra la solució, el filtrat és $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{Cl}$ que pot ser reutilitzat per reaccions posteriors i el sòlid es renta primer amb 25-50 ml de cloroform molt fred i després tres vegades amb 25-30 ml d'èter dietílic sec, obtenint-se 4.33 grams de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$. El rendiment es pot augmentar si s'extreu, mitjançant un laboriós procés, el $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$ que ha passat a la fase aquosa. Així, doncs, la fase aquosa es renta la solució tres vegades amb 25 ml de cloroform i s'evapora a sequedat, s'obtenen 8.57 grams de sòlid blanc format per NaCl i una mescla de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$ i $\text{NaO}_3\text{S}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$, essent el producte disulfonat majoritari amb una proporció estimada, segons l'anàlisi de l'espectre de ^1H -RMN, de 10:12.5. Aquest producte es recristal·litza per extreure el $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$ de la mescla. La recristal·lització es duu a terme dissolent fraccions d'aproximadament 2 grams de producte en 500 ml de etanol bullent i filtrant en calent amb un embut Büchner. El filtrat es concentra fins a inici de cristal·lització i s'indueix la precipitació amb un bany d'aigua i gel i es filtra amb un embut Büchner, obtenint-se 1.82 g de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$ entre totes les fraccions recristal·litzades. Les dues fraccions s'ajunten, s'homogeneïtzen i en total s'obtenen 6.15 grams de $\text{Cl}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$, amb un rendiment del 62 %.

A.2. Lligands fosfina

A.2.1. Síntesi dels lligands $\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ ($n = 2, 6$ i 10)

La síntesi de lligands es duu a terme sota atmosfera inert de nitrogen mitjançant tècniques Schlenck a baixa temperatura i evitant al màxim la presència d'aigua tant en reactius com en dissolvents. Els dissolvents s'assequen tal i com es troba descrit a l'apartat 3.2.1. de Material i Mètodes. Pel que fa als reactius es segueix el següent procediment: El NH_4X s'asseca primer a l'estufa, deixant-lo 24h a 80°C , i

posteriorment al buit; la PPh_3 s'asseca deixant-la 24h al buit en un bany d'aigua calenta (entre 60-70 °C) i els precursors halosulfonats s'assequen amb 2,2-dimetoxipropà segons el procediment descrit a la bibliografia¹⁶⁷ (Esquema 8).



Esquema 8: Reacció del 2,2-dimetoxipropà amb aigua.

Es prepara un bany d'acetona i neu carbònica (-78°C) i es condensen 100 ml d'amoníac a l'interior d'un Schlenck gran. S'afegeix el Na metàl·lic en petites fraccions i es dissol ràpidament donant lloc a una intensa coloració blava a la solució. La manipulació del sodi en aquest pas és molt important per tal d'evitar al màxim la seva oxidació: es fan làmines fines de Na amb l'ajut d'un corró i es mantenen dins d'un got de precipitats amb èter de petroli, dins el got es tallen les làmines en fraccions més petites i aquestes es fiquen uns segons en isopropanol per eliminar la capa d'òxid que es pot haver format mentre es manipulava i es pesen en un altre got amb èter de petroli, prèviament tarat.

Passats 15 minuts des de l'addició del Na, es comença a afegir la PPh_3 , en petites fraccions, durant 5 minuts i es deixa evolucionar 3 hores, durant les quals s'observa que la solució canvia a un color ataronjat fosc degut a la presència de difenilfosfur (PPh_2) al medi de reacció. Llavors, s'afegeix lentament el NH_4X , durant 15 minuts i en petites fraccions amb la finalitat d'eliminar l'amidur (NH_2^-) format en el pas anterior i es deixa reaccionar 10 minuts més. Amb aquesta adició la solució adquireix una intensa coloració groc-ataronjat. Transcorregut aquest temps, el precursor halosulfonat $\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{Na}$ s'afegeix en petites fraccions durant 15 minuts i acabada l'addició es deixa reaccionar durant 30 minuts més. Arribats a aquest punt es deixa d'afegir neu carbònica al bany i es deixa reposar fins l'endemà sota flux de nitrogen per tal que, en el decurs de la nit, la solució s'atemperi i s'evapori l'amoníac líquid.

Les quantitats de reactius per a la síntesis de lligands emprades en aquest treball es resumeixen a la taula 38.

Annex

Reactius	$\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$	$\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$
Na	1,33 g	1,45 g
PPh₃	7,59 g	8,26 g
NH₄X	1,55 g	1,68 g
X(CH₂)_nSO₃Na	5,85 g	8,00 g

Taula 38: Reactius emprats per a les síntesis dels lligands fosfina. (X = Br quan n=2 i X = Cl quan n = 6 i 10).

Un cop s'ha evaporat tot l'amoniac resta un sòlid blanc amb una lleugera tonalitat groga. Aquest sòlid es renta amb una mescla desgasada de 15 ml d'èter dietílic anhidre i 1 ml d'aigua destil·lada agitant durant uns minuts vigorosament, de manera que l'aigua protona les restes de difenilfosfur donant HPPH_2 , que en ser soluble en èter dietílic pot ser fàcilment extret del medi de reacció filtrant amb cànula i fent dos rentats més amb èter dietílic anhidre. El sòlid obtingut és una mescla de lligand fosfina i halur de sodi (NaX).

El procés de purificació per a l'obtenció dels lligands fosfina consisteix en recristal·litzar aquest sòlid en una mescla de metanol (a la Taula 39 es detallen els volums emprats per a cada lligand) i 5ml d'aigua. Es filtra en calent i es deixa reposar perquè cristal·litzi, procés que es pot afavorir refredant amb un bany d'aigua-gel o inclús deixant el baló al congelador fins a l'endemà. Llavors, es filtra el líquid sobrenedant, es renta amb uns mil·lilitres de metanol gelat i s'asseca el producte al buit. En tots els casos es pot fer un últim rentat amb èter dietílic anhidre per facilitar l'assecat i evitar un aspecte pastós, procés que pel cas de la fosfina L10 és necessari donat que té una tendència natural a agafar aquest tipus de consistència.

	$\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$	$\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_{10}\text{SO}_3\text{Na}$
Volum MeOH	75 ml	150 ml
Pes obtingut	7,24 g	8,12 g
Rendiment	74 %	66 %
Aspecte físic	Sòlid blanc	Sòlid blanc

Taula 39: Volum de metanol necessari per a la recristal·lització dels productes, quantitat de productes obtinguts després de la recristal·lització, rendiment i aspecte físic.

A.3. Complexos de molibdè

A.3.1. Precursor metàl·lic *cis*-[Mo(CO)₄(pip)₂].

A.3.1.1 Síntesi del precursor metàl·lic *cis*-[Mo(CO)₄(pip)₂].

S'introdueixen 5.09 g de Mo(CO)₆ i 30 ml d'heptà sec en un baló. Es prepara una solució formada per 10.89 g de piperidina dissolts en 30 ml del mateix dissolvent que s'afegeix sobre la suspensió anterior. La mescla es porta a reflux i es deixa reaccionar durant 4 h sota atmosfera inert de nitrogen per evitar la presència d' humitat al medi de reacció i s'acoba un *bubbler* amb oli de silicona per no generar sobrepressió al sistema. Al principi es pot veure una petita quantitat de Mo(CO)₆ que resta insoluble en la solució, però es dissol ràpidament en pujar la temperatura. Passats uns 15 minuts la solució comença a adquirir una coloració groga i a aparèixer un sòlid groc en suspensió. Passat el temps de reacció es filtra en calent per eliminar del complex [Mo(CO)₅(pip)] que es pugui haver format com a subproducte i es renta el sòlid tres vegades amb 15 ml d'heptà fred. Llavors, el sòlid s'asseca al buit, de manera que les possibles restes de piperidina lliure s'eliminen (¹H-RMN de piperidina en metanol-d₄ (ppm): δ=2.88 (m), 4H; δ=1.61 (m), 6H). S'obtenen 6.93 g de *cis*-[Mo(CO)₄(pip)₂], un sòlid de color groc intens, amb un rendiment del 95 %.

A temperatura ambient el precursor metàl·lic no és estable i descomposa amb facilitat. Ara bé, si es guarda el complex completament sec en un vial ben segellat, sota atmosfera inert de N₂(g) i al congelador, a -30°C, es pot conservar en perfecte estat durant un llarg període de temps (> 2 anys).

A.3.2. Complexos TLn (*cis*-[Mo(CO)₄(Ln)₂]) (n = 2, 6 i 10).

A.3.2.1. Síntesi de complexos TLn (*cis*-[Mo(CO)₄(Ln)₂]) (n = 2, 6 i 10).

Sota atmosfera inert de nitrogen es dissol, per una banda, el lligand fosfina (Ph₂P(CH₂)_nSO₃Na) en metanol sec i desgasat en un matràs Schlenck. Per un altre banda, es prepara una solució de precursor metàl·lic (*cis*-[Mo(CO)₄(pip)₂]) en THF sec i desgasat en les mateixes condicions que l'anterior. Llavors, s'addiciona la solució del lligand fosfina sobre la del precursor metàl·lic molt lentament amb l'ajut d'una cànula. Inicialment, el complex metàl·lic es dissol ràpidament en THF donant lloc a una solució nítida de color groc intens, però en uns instant comença a adquirir una tonalitat

Annex

ataronjada la qual reverteix al groc inicial en entrar en contacte amb l'altre solució. Acabada l'addició, es deixa evolucionar la reacció sota atmosfera inert, a temperatura ambient i resguardada de la llum durant 3h per al complex TL2 i 4h per als complexos de cadena més llarga (TL6 i TL10) . Durant tota la reacció la solució es manté nítida i amb la mateixa coloració, la percepció de terbolesa al medi seria indicatiu de presència d'aigua, un factor que cal evitar al màxim. Passat el temps de reacció, s'evapora la solució a sequedat al buit per eliminar el dissolvent i les restes de piperidina lliure, donant lloc a un oli de color marró.

El cru de reacció es dissol en el mínim volum de metanol sec i desgasat i es filtra en una columna de celita sota atmosfera de nitrogen. El filtrat es concentra fins que comença a precipitar (aproximadament fins la meitat del volum inicial) i s'addiciona lentament èter dietílic sec i desgasat fins que la precipitació és completa. El precipitat es separa del medi retirant el dissolvent amb cànula, es renta tres vegades amb 15 ml d'èter dietílic sec i desgasat i s'asseca al buit.

Les quantitats necessàries de reactius i dissolvents emprats per a la síntesi de cada complex *cis*-[Mo(CO)₄(Ln)₂] (n = 2, 6 i 10), així com els pesos obtinguts, rendiment i aspecte físic es resumeixen a la Taula 40.

	<i>cis</i> -[Mo(CO) ₄ (L2) ₂]	<i>cis</i> -[Mo(CO) ₄ (L6) ₂]	<i>cis</i> -[Mo(CO) ₄ (L10) ₂]
Ph₂P(CH₂)_nSO₃Na	2,38 g	2,24 g	1,63 g
Volum MeOH (a)	200 ml	150 ml	150 ml
<i>cis</i> -[Mo(CO) ₄ (pip) ₂]	1,40 g	1,05 g	0,70 g
Volum THF	200 ml	150 ml	100 ml
Volum MeOH (b)	15-20 ml	20-25 ml	50 ml
Pes obtingut	2,65 g	2,50 g	1,56 g
Rendiment	84 %	82 %	77 %
Aspecte físic	Sòlid groc pàlid	Sòlid groc pàlid	Sòlid groc

Taula 40. Quantitats necessàries de reactius i dissolvents (MeOH (a): per a la síntesi; MeOH (b): per a la recristal·lització) emprats en la síntesi dels complexos *cis*-[Mo(CO)₄(Ln)₂] (n = 2, 6 i 10), quantitat de producte obtingut de cada complex, rendiment i aspecte físic.

A.3.3. Complexos P_n ([Mo(CO)₅L_n] (n = 2, 6 i 10).

A.3.3.1. Síntesi de complexos P_n ([Mo(CO)₅L_n] (n = 2, 6 i 10).

En un matràs Schlenck i sota atmosfera inert de nitrogen es prepara una suspensió formada per Me₃N=O·2H₂O i Mo(CO)₆, amb un excés molar del 20 % sobre l'anterior, dissolts en una solució 1:1 CH₂Cl₂/MeCN (dissolvents secs i desgasats). Es deixa evolucionar el sistema durant 1.5 h sota atmosfera de nitrogen, a temperatura ambient i resguardat de la llum. La solució, inicialment transparent, adquireix una tonalitat groga intensa al cap de 30 minuts. Passat el temps de reacció, s'addiciona lentament el lligand fosfina (Ph₂P(CH₂)_nSO₃Na) en metanol sec i desgasat. La fosfina es troba en un 10 % de defecte molar respecte l'òxid de trimetilamina. Acabada l'addició es deixa reaccionar durant 1.5 h més. Un cop finalitzat el procés es filtra la solució amb celita i el filtrat s'evapora a sequedat.

El producte resultant es recristal·litza dissolent-lo en el mínim volum de metanol sec i desgasat, centrifugant i evaporant el sobrenedant a sequedat.

Les quantitats necessàries de reactius i dissolvents emprats per a la síntesi de cada complex Mo(CO)₅L_n (n = 2, 6 i 10), així com els pesos obtinguts, rendiment i aspecte físic es resumeixen a la Taula 41.

	Mo(CO) ₅ L ₂	Mo(CO) ₅ L ₆	Mo(CO) ₅ L ₁₀
Me ₃ N=O·2H ₂ O	0,64 g	0,38 g	0,51 g
Mo(CO) ₆	1,83 g	1,10 g	1,46 g
CH ₂ Cl ₂ /MeCN (1:1)	25 ml	15 ml	20 ml
Ph ₂ P(CH ₂) _n SO ₃ Na	1,64 g	1,16 g	1,78 g
MeOH (a)	50 ml	50 ml	60 ml
MeOH (b)	25 ml	25 ml	30-40 ml
Pes obtingut	2,42 g	1,29 g	2,39 g
Rendiment	85 %	68 %	86 %
Aspecte físic	Sòlid marró	Sòlid marró	Sòlid marró

Taula 41. Quantitats necessàries de reactius i dissolvents (MeOH (a): per a la síntesi; MeOH (b): per a la recristal·lització) emprats en la síntesi dels complexos Mo(CO)₅L_n (n = 2, 6 i 10), quantitat de producte obtingut de cada complex, rendiment i aspecte físic.

Referències

- ¹ Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525-1568.
- ² Bangham, A.D.; Horne, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, 8, 660-668.
- ³ Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Weissmann, The Action of Steroids and Streptolysin S on the Permeability of Phospholipid Structures to Cations. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 253-259.
- ⁴ Hicks, M.; Gebicki, J.M. Microscopic studies of fatty acid vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **1977**, 20, 243-252.
- ⁵ Gebicki, J.M.; Hicks, M. Preparation and properties of vesicles enclosed by fatty acid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1976**, 16, 142-160.
- ⁶ Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, 1, 147-168.
- ⁷ Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature* **2005**, 4, 145-160.
- ⁸ Andresen, T.L.; Simon S. Jensen, S.S.; Jørgensen, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog. Lipid Res.* **2005**, 44, 68-97.
- ⁹ Al-Jamal, W.T.; Kostarelos, K. Construction of nanoscale multicompartiment liposomes for combinatory drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2007**, 331, 182-185.
- ¹⁰ Papahadjopoulos, D.; Kimelberg, H.K. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins. *Prog. Surf. Sci.* **1973**, 141-149.
- ¹¹ Gradzielski, M. Vesicles and vesicle gels-structure and dynamics of formation. *J. Phys.: Condens. Matter* **2003**, 15, R655-R697.
- ¹² Šegota, S.; Težak, Đ. Spontaneous formation of vesicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 121, 51-75.
- ¹³ Andrieux, K.; Forte, L.; Lesieur, S.; Paternostre, M.; Ollivon, M.; Grabielle-Madelmont, C. Insertion and partition of sodium taurocholate into egg phosphatidylcholine vesicles. *Pharm Res.* **2004**, 21, 1505-1516.
- ¹⁴ Correia, R.F.; Viseu, M.I.; Prazeres, T.J.V.; Martinho, J.M.G. Spontaneous vesicles, disks, threadlike and spherical micelles found in the solubilization of DMPC liposomes by the detergent DTAC. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, 379, 56-63.
- ¹⁵ Goedheijt, M-S.; Hanson, B.E.; Reek, J.N.H.; Kamer, P.C.J.; van Leeuwen, P.W.N.M. Accelerated Biphase Hydroformylation by Vesicle Formation of Amphiphilic Diphosphines. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1650-1657.
- ¹⁶ Polyzos, A.; Hughes, A.B.; Christie, J.R. Catalysis of Aryl Ester Hydrolysis in the Presence of Metallomicelles Containing a Copper(II) Diethylenetriamine Derivative. *Langmuir* **2007**, 23, 1872-1879.
- ¹⁷ Hovland, R.; Gløgaard, C.; Arne J. Aasen, A.J.; Klaveness, J. Preparation and in vitro evaluation of a novel amphiphilic GdPCTA-[12] derivative; a micellar MRI contrast agent. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 644-647.
- ¹⁸ Accardo, A.; Tesauro, D.; Aloj, L.; Pedone, C.; Morelli, G. Supramolecular aggregates containing lipophilic Gd(III) complexes as contrast agents in MRI. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2193-2213.
- ¹⁹ Glen W. Walker, G.W.; Geue, R.J.; Sargeson, A.M.; Behmb, C.A. Surface-active cobalt cage complexes: synthesis, surface chemistry, biological activity, and redox properties. *Dalton Trans.* **2003**, 2992-3001.
- ²⁰ Yam, V.W.W.; Li, B.; Zhu, N. Synthesis of Mesoporous Silicates with Controllable Pore Size Using Surfactant Ruthenium(II) Complexes as Templates. *Adv. Matter* **2002**, 14, 719-722.
- ²¹ Iida, M.; Inoue, M.; Tanase, T.; Takeuchi, T.; Sugibayashi, M.; Ohta, K. Formation of Thermotropic and Lyotropic Liquid Crystals of Bis(N-alkylethylenediamine)silver(I) Nitrate. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 19, 3920-3937.
- ²² Cardinaels, T.; Ramaekers, J.; Driesen, K.; Nockemann, P.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Goderis, B.; Binnemans, K. Thermotropic Ruthenium(II)-Containing Metallomesogens Based on Substituted 1,10-Phenanthroline Ligands. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 2490-2499.
- ²³ Terasaki, N.; Akiyama, T.; Yamada, S. Structural Characterization and Photoelectrochemical Properties of the Self-Assembled Monolayers of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)-Viologen Linked Compounds Formed on the Gold Surface. *Langmuir* **2002**, 18, 8666-8671.
- ²⁴ Tse, C.W.; Lam, L.S.M.; Man, K.Y.K.; Wong, W.T.; Chan, W.K. Synthesis and Characterization of Random and Block Copolymers with Pendant Rhenium Diimine Complexes by Controlled Radical Polymerization. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 1292-1308.

- ²⁵ Chu, B.W.K.; Yam, V.W.W. Synthesis, Characterization, Langmuir-Blodgett Film-Forming Properties, and Second-Harmonic-Generation Studies of Ruthenium(II) Complexes with Long Hydrocarbon Chains. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 3324-3329.
- ²⁶ Gameiro, P.; Maia, A.; Pereira, E.; de Castro, B. Bis-(4-methyl-4 ϕ -pentyl-2,2'-bipyridyl)(dicyano)iron(II): a versatile solvatochromic solvation probe. *Trans. Met. Chem.* **2000**, 25, 283-286.
- ²⁷ Gameiro, P.; Pereira, E.; Garcia, P.; Breia, S.; Burgess, J.; de Castro, B. Derivatives of Bis(2,29-bipyridyl)dicyanoiron(II) with Long Alkyl Chains. Versatile Solvatochromic Probes that Form Metalloaggregates in Water-Rich Media. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 11, 2755-2761.
- ²⁸ Dwars, T.; Paetzold, E.; Oehme, G. Reactions in Micellar Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7174-7199.
- ²⁹ Hay, R.W.; Govan, N.; Parchment, K.E. A metallomicelle catalysed hydrolysis of a phosphate triester, phosphonate diester and O-isopropyl methylfluorophosphonate (Sarin). *Inorg. Chem. Commun.*, **1998**, 1, 228-231.
- ³⁰ Bhattacharya, S.; Snehalatha, K.; George, S.K. Synthesis of Some Copper(II)-Chelating (Dialkylamino)pyridine Amphiphiles and Evaluation of Their Esterolytic Capacities in Cationic Micellar Media. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 27-35.
- ³¹ Kimura, E.; Hashimoto, H.; Koike, T. Hydrolysis of Lipophilic Esters Catalyzed by a Zinc(II) Complex of a Long Alkyl-Pendant Macrocyclic Tetraamine in Micellar Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10963-10970.
- ³² Shakya, R.; Hindo, S.S.; Wu, L.; Allard, M.M.; Heeg, M.J.; Hratchian, H.P.; McGarvey, B.R.; da Rocha, S.R.P.; Verani, C.N. Archetypical Modeling and Amphiphilic Behavior of Cobalt(II)-Containing Soft-Materials with Asymmetric Tridentate Ligands. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 9808-9818.
- ³³ Hyeon, T.; Chung, Y.; Park, J.; Lee, S.S.; Kim, Y.W.; Park, B.H. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Cobalt Ferrite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 6831-6833.
- ³⁴ Aiad, I.A.; Badawi, A.M.; El-Sukkary, M.M.; El-Sawy, A.A.; Adawy, A.I. Synthesis and Biocidal Activity of Some Naphthalene-Based Cationic Surfactants. *J. Surfactants Deterg.* **2012**, 15, 223-234.
- ³⁵ Walker, G. W.; Geue, R.J.; Sargeson, A.M.; Behm, C.A. Surface-active cobalt cage complexes: synthesis, surface chemistry, biological activity, and redox properties. *Dalton Trans.* **2003**, 2992-3001.
- ³⁶ Ghirlanda, G.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Toffoletti, A. Amphiphilic Copper(II) Complexes Modeled after the Metal-Complexation Subunit of Bleomycin Antibiotics. *Langmuir* **1998**, 14, 1646-1655.
- ³⁷ Griffiths, P.C.; Fallis, I.A.; Willock, D.J.; Paul, A.; Barrie, C.L.; Griffiths, P.M.; Williams, G.M.; King, S.M.; Heenan, R.K.; Görgl, R. The Structure of Metallomicelles. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2022-2028.
- ³⁸ Griffiths, P.C.; Fallis, I.A.; Chuenpratoom, T.; Watanesk, R. Metallosurfactants: Interfaces and micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, 122, 107-117.
- ³⁹ Griffiths, P.C.; Fallis, I.A.; James, C.; Morgan, I.R.; Brett, G.; Heenan, R.K.; Schweins, R.; Grillo, I.; Paul, A. Structure-property relationships in metallosurfactants. *Soft Matter* **2010**, 6, 1981-1989.
- ⁴⁰ Le Moigne, J.; Simon, J. A New Type of Surfactant. The Annelides. Characterization of Organized Metal Ion Assemblies Obtained by Cationic Complexation at the Micelle Subsurface. *J. Phys. Chem.* **1980**, 84, 170-177.
- ⁴¹ Bowers, J.; Amos, K.E.; Bruce, D.W. Surface and Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Ru(II) Metallosurfactants: Effect of Chain Number and Orientation on the Aggregation of [Ru(bipy)₂(bipy')]₂Cl₂ Complexes. *Langmuir* **2005**, 21, 5696-5706.
- ⁴² Danks, M.J.; Jarvis, H.B.; Nowotny, M.; Zhou, W.; Maschmeyer, T.; Bruce, D.W. High-activity heterogeneous catalyst prepared in one step from the mesophases of metallosurfactants. *Catal. Lett.* **2002**, 82, 95-98.
- ⁴³ Holbrey, J.D.; Tiddy, G.J.T.; Bruce, D.W.J. Amphiphilic Terpyridine Complexes of Ruthenium and Rhodium displaying Lyotropic Mesomorphism. *Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 11, 1769-1774.
- ⁴⁴ Fua, H.; Li, M.; Chena, J.; Zhanga, R.; Jianga, W.; Yuana, M.; Chena, H.; Li, X. Application of a new amphiphilic phosphine in the aqueous biphasic catalytic hydroformylation of long chain olefins. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2008**, 292, 21-27.
- ⁴⁵ Schreuder Goedheijt, M.; Hanson, B.E.; Reek, J.N.H.; Kamer, P.C.J.; van Leeuwen, P.W.N.M. Accelerated Biphasic Hydroformylation by Vesicle Formation of Amphiphilic Diphosphines. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1650-1657.
- ⁴⁶ Parera, E.; Comelles, F.; Barnadas, R.; Suades, J. Formation of vesicles with an organometallic amphiphile bilayer by supramolecular arrangement of metal carbonyl metallosurfactants. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4460-4462.

- ⁴⁷ Valls, E.; Solsona, A.; Suades, J.; Mathieu, R.; Comelles, F.; López-Iglesias, Synthesis and Characterization of New Amphiphilic Phosphines and Palladium Metallosurfactants. *Organometallics* **2002**, *21*, 2473-2480.
- ⁴⁸ Menger, F.M.; Keiper, J.S. Gemini surfactants. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1906-1920.
- ⁴⁹ Qiu, L-G.; Jiang, X.; Gu, L-N.; Hu, G. Gemini metallomicellar catalysis: Hydrolysis of p-nitrophenyl picolinate catalyzed by Cu(II) and Ni(II) complexes of macrocyclic ligands in gemini surfactant micelles. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *277*, 15-20.
- ⁵⁰ Solsona, A.; Suades, J.; Mathieu, R. Hydridorhodium (I) complexes with amphiphilic polyether phosphines NMR study and biphasic hydroformylation of 1-octene. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *669*, 172-181.
- ⁵¹ Santhakumar, K.; Kumaraguru, N.; Arumugham, M.N.; Arunachalam, S. Metallomicelles of Co(III) coordination complexes – Synthesis, characterization and determination of CMC values. *Polyhedron* **2006**, *25*, 1507-1513.
- ⁵² Hainfeld, J.; Furuya, F.R.; Powell, R.D. Metallosomes. *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 152-160.
- ⁵³ Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. Amphiphilic metalloaggregates: Catalysis, transport, and sensing. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2150-2165.
- ⁵⁴ Jiang, F.; Jiang, B.; Cao, Y.; Meng, X.; Yu, X.; Zeng, X. Metallomicellar catalysis Hydrolysis of phosphate monoester by Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Co(II) complexes of pyridyl ligands in CTAB micellar solution. *Colloids Surf., A* **2005**, *254*, 91-97.
- ⁵⁵ Scrimin, P.; Tecilla, T.; Tonellato, U. Metallomicelles as Catalysts of the Hydrolysis of Carboxylic and Phosphoric Acid Esters. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 161-166.
- ⁵⁶ Yan Liu, Y.; Ma, X.; Xie, J.; Liu, P.; Dai, B.; He, R. Metallomicelles of palladium(II) complexes as efficient catalysts for the Suzuki-Miyaura reaction in neat water. *Appl. Organometal. Chem.* **2013**, *27*, 494-498.
- ⁵⁷ Li, J.; Tang, Y.; Wang, Q.; Li, X.; Cun, L.; Zhang, X.; Zhu, J.; Li, L.; Deng, J. Chiral Surfactant-Type Catalyst for Asymmetric Reduction of Aliphatic Ketones in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18522-18525.
- ⁵⁸ Morsy, S.M.I.; Negm, N.A.; Badawi, A.M. Biological activities of some novel cationic metallomicelles. *Egypt. J. Chem.* **2005**, *48*, 645-651.
- ⁵⁹ Morsy, S.M.I.; Badawi, A.M.; Jajte, J.M. Biological Activity of Some Novel Cationic Germanium and Titanium Metal Based Surfactants. *Tenside Surf. Det.* **2009**, *46*, 18-23.
- ⁶⁰ Osada, K.; Cabral, H.; Mochida, Y.; Lee, S.; Nagata, K.; Matsuura, T.; Yamamoto, M.; Anraku, Y.; Kishimura, A.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. Bioactive Polymeric Metallosomes Self-Assembled through Block Copolymer-Metal Complexation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13172-13175.
- ⁶¹ Bigler, R.E.; Sgouros, G. Biological Analysis and Dosimetry for ¹⁵O-Labeled O₂, CO₂, and CO Gases Administered Continuously by Inhalation. *J. Nucl. Med.* **1983**, *24*, 431-437.
- ⁶² Wu, L.; Wang, R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 585-630.
- ⁶³ Motterlini, R.; Otterbein, L.E. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 728-743.
- ⁶⁴ Piantadosi, C.A. Biological Chemistry of Carbon Monoxide. *Antioxid. Redox. Signaling* **2002**, *4*, 259-270.
- ⁶⁵ Otterbein, L.E.; Bach, F.H.; Alam, J.; Soares, M.; Tao, L.H.; Wysk, M.; Davis, R.J.; Flavell, R.A.; Choi, A.M.K. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 422-428.
- ⁶⁶ Motterlini, R.; Sawle, P.; Hammad, J.; Mann, B.E.; Johnson, T.R.; Green, C.J.; Foresti, R. Vasorelaxing effects and inhibition of nitric oxide in macrophages by new iron-containing carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs). *Pharmacol. Res.* **2013**, *68*, 108-117.
- ⁶⁷ Morita, T.; Mitsialis, S.A.; Koike, H.; Liu, Y.; Kourembanas, S.J. Carbon Monoxide Controls the Proliferation of Hypoxic Vascular Smooth Muscle Cells. *Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32804-32809.
- ⁶⁸ Verma, A.; Hirsch, D.J.; Glatt, C.E.; Ronnett, G.V.; Snyder, S.H. Carbon Monoxide: A Putative Neural Messenger. *Science* **1993**, *259*, 381-384.
- ⁶⁹ Suliman, H.B.; Carraway, M.S.; Tatro, L.G.; Piantadosi, C.A. A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 299-308.
- ⁷⁰ Lee, S.J.; Ryter, S.W.; Xu, J.F.; Nakahira, K.; Kim, H.P.; Choi, A.M.; Kim, Y.S. Carbon Monoxide Activates Autophagy via Mitochondrial Reactive Oxygen Species Formation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *45*, 867-873.

- ⁷¹ Nakao, A.; Kimizuka, K.; Stolz, D.B.; Neto, J.S.; Kaizu, T.; Choi, A.M.K.; Uchiyama, T.; Zuckerbraun, B.S.; Nalesnik, M.A.; Otterbein, L.E.; Murase, N. Carbon Monoxide Inhalation Protects Rat Intestinal Grafts from Ischemia/Reperfusion Injury. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 1587–1598.
- ⁷² Nakao, A.; Toyokawa, H.; Tsung, A.; Nalesnik, M.A.; Stolz, D.B.; Kohmoto, J.; Ikeda, A.; Tomiyama, K.; Harada, T.; Takahashi, T.; Yang, R.; Fink, M.P.; Morita, K.; Choi, A.M.K.; Murase, N. Ex Vivo Application of Carbon Monoxide in University of Wisconsin Solution to Prevent Intestinal Cold Ischemia/Reperfusion Injury. *Am. J. Transplant.* **2006**, *6*, 2243–2255.
- ⁷³ Gorman, D.; Drewry, A.; Huang, Y.L.; Sames, C. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* **2003**, *187*, 25–38.
- ⁷⁴ Romão, C.C.; Blättler, W.A.; Seixas, J.D.; Bernardes, G.J.L. Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3571–3583.
- ⁷⁵ Rochette, L.; Cottin, Y.; Zeller, M.; Vergely, C. Carbon monoxide: Mechanisms of action and potential clinical implications. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *137*, 133–152.
- ⁷⁶ Durante, W.; Johnson, F.K.; Johnson, R.A. Role of carbon monoxide in cardiovascular function. *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, *10*, 672–686.
- ⁷⁷ Matsui, T.; Iwasaki, M.; Sugiyama, R.; Unno, M.; Ikeda-Saito, M. Dioxygen Activation for the Self-Degradation of Heme: Reaction Mechanism and Regulation of Heme Oxygenase. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3602–3609.
- ⁷⁸ Poulos, T.L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3919–3962.
- ⁷⁹ Mann, B.; Motterlini, R. CO and NO in medicine. *Chem. Commun.* **2007**, 4197–4208.
- ⁸⁰ Halilovic, A.; Patil, K.A.; Bellner, L.; Marrazzo, G.; Castellano, K.; Cullaro, G.; Dunn, M.W.; Schwartzman, M.L. Knockdown of Heme Oxygenase-2 Impairs Corneal Epithelial Cell Wound Healing. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 1732–1740.
- ⁸¹ Cabrales, P.; Tsai, A.P.; Intaglietta, M. Hemorrhagic shock resuscitation with carbon monoxide saturated blood. *Resuscitation* **2007**, *72*, 306–318.
- ⁸² Motterlini, R.; Sawle, P.; Bains, S.; Hammad, J.; Alberto, R.; Foresti, R.; Green, C.J. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB J.* **2005**, *19*, 284–286.
- ⁸³ Motterlini, R.; Clark, J.E.; Foresti, R.; Sarathchandra, P.; Mann, B.E.; Green, C.J. Carbon Monoxide Releasing Molecules. Characterization of Biochemical and Vascular Activities. *Circ. Res.* **2002**, *90*, 17–24.
- ⁸⁴ Johnson, T.R.; Mann, B.E.; Teasdale, I.P.; Adams, H.; Foresti, R.; Green, C.J.; Motterlini, R. Metal carbonyls as pharmaceuticals? [Ru(CO)₃Cl(glycinate)], a CO-releasing molecule with an extensive aqueous solution chemistry. *Dalton Trans.* **2007**, 1500–1508.
- ⁸⁵ Foresti, R.; Hammad, J.; Clark, J.E.; Johnson, T.R.; Mann, B.E.; Friebe, A.; Green, C.J.; Motterlini, R. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 453–460.
- ⁸⁶ Pitchumony, T.S.; Spingler, B.; Motterlini, R.; Alberto, R. Derivatives of Sodium Boranocarbonate as Novel CO-Releasing Molecules (CO-RMs). *Chimia* **2008**, *62*, 277–279.
- ⁸⁷ Pitchumony, T.S.; Spingler, B.; Motterlini, R.; Alberto, R. Syntheses, structural characterization and CO releasing properties of boranocarbonate [H₃BCO₂H]- derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4849–4854.
- ⁸⁸ Antony, L.A.P.; Slanina, T.; Šebej, P.; Solomek, T.; Klán, P. Fluorescein Analogue Xanthene-9-Carboxylic Acid: A Transition-Metal-Free CO Releasing Molecule Activated by Green Light. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4552–4555.
- ⁸⁹ Peng, P.; Wang, C.; Shi, Z.; Johns, V.K.; Ma, L.; Oyer, J.; Copik, A.; Igarashia, R.; Liao, Y. Visible-light activatable organic CO-releasing molecules (PhotoCORMs) that simultaneously generate fluorophores. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6671–6674.
- ⁹⁰ Hasegawa, U.; van der Vlies, A.J.; Simeoni, E.; Wandrey, C.; Hubbell, J.A. Carbon Monoxide-Releasing Micelles for Immunotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273–18280.
- ⁹¹ Schatzschneider, U. Novel lead structures and activation mechanisms for CO-releasing molecules (CORMs). *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1638–1650.
- ⁹² Romanski, S.; Kraus, B.; Guttentag, M.; Schlundt, W.; Rücker, H.; Adler, A.; Neudörfl, J.M.; Alberto, R.; Amslinger, S.; Schmalz, H.G. Acyloxybutadiene tricarbonyl iron complexes as enzyme-triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs): a structure–activity relationship study. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 13862–13875.
- ⁹³ Romanski, S.; Stamellou, E.; Jaraba, J.T.; Storz, D.; Krämer, B.K.; Hafner, M.; Amslinger, S.; Schmalz, H.G.; Yard, B.A. Enzyme-triggered CO-releasing molecules (ET-CORMs): Evaluation of biological activity in relation to their structure. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *65*, 78–88.

- ⁹⁴ Botov, S.; Stamellou, E.; Romanski, S.; Guttentag, M.; Alberto, R.; Neudörfl, J.M.; Yard, B.; Schmalz, H. G. Synthesis and Performance of Acyloxy-diene-Fe(CO)₃ Complexes with Variable Chain Lengths as Enzyme-Trigged Carbon Monoxide Releasing Molecules. *Organometallics* **2013**, *32*, 3587-3594.
- ⁹⁵ Schatzschneider, U. PhotoCORMs: Light-triggered release of carbon monoxide from the coordination sphere of transition metal complexes for biological applications. *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *374*, 19-23.
- ⁹⁶ Rimmer, R.D.; Pierri, A.E.; Ford, P.C. Photochemically activated carbon monoxide release for biological targets. Toward developing air-stable photoCORMs labilized by visible light. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 1509-1519.
- ⁹⁷ Farrer, N.J.; Salassa, L.; Sadler, P.J. Photoactivated chemotherapy (PACT): the potential of excited-state d-block metals in medicine. *Dalton Trans.* **2009**, 10690-10701.
- ⁹⁸ Szaciłowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647-2694.
- ⁹⁹ Brancaleon, L.; Moseley, H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.* **2002**, *17*, 173-186.
- ¹⁰⁰ Rimmer, R.D.; Richter, H.; Ford, P. A Photochemical Precursor for Carbon Monoxide Release in Aerated Aqueous Media. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1180-1185.
- ¹⁰¹ Zhang, W.Q.; Atkin, A.J.; Fairlamb, I.J.S.; Whitwood, A.C.; Lynam, J.M. Synthesis and Reactivity of Molybdenum Complexes Containing Functionalized Alkynyl Ligands: A Photochemically Activated CO-Releasing Molecule (PhotoCO-RM). *Organometallics* **2011**, *30*, 4643-4654.
- ¹⁰² Niesel, J.; Pinto, A.; Peindy N'Dongo, H.W.; Merz, K.; Ott, I.; Gust, R.; Schatzschneider, U. Photoinduced CO release, cellular uptake and cytotoxicity of a tris(pyrazolyl)methane (tpm) manganese tricarbonyl complex. *Chem. Commun.* **2008**, 1798-1800.
- ¹⁰³ Meister, K.; Niesel, J.; Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N.; Schmidt, D.A.; Havenith, M. Label-Free Imaging of Metal-Carbonyl Complexes in Live Cells by Raman Microspectroscopy. *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 3310-3312.
- ¹⁰⁴ Pfeiffer, H.; Rojas, A.; Niesel, J.; Schatzschneider, U. Sonogashira and "Click" reactions for the N-terminal and side-chain functionalization of peptides with [Mn(CO)₃(tpm)]⁺-based CO releasing molecules (tpm = tris(pyrazolyl)methane). *Dalton Trans.* **2009**, 4292-4298.
- ¹⁰⁵ Pierri, A.E.; Huang, P.J.; Garcia, J.V.; Stanfill, J.G.; Chui, M.; Wu, G.; Zheng, N.; Ford, P.C. A photoCORM nanocarrier for CO release using NIR light. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2072-2075.
- ¹⁰⁶ Pierri, A.E.; Pallaoro, A.; Wu, G.; Ford, P.C. A Luminescent and Biocompatible PhotoCORM. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18197-18200.
- ¹⁰⁷ Kretschmer, R.; Gessner, G.; Görls, H.; Heinemann, S.H.; Westerhausen, M. Dicarboxyl-bis(cysteamine)iron(II): A light induced carbon monoxide releasing molecule based on iron (CORM-S1). *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 6-9.
- ¹⁰⁸ Kottelat, E.; Zobi, F. Visible Light-Activated PhotoCORMs. *Inorganics* **2017**, 24-43.
- ¹⁰⁹ Mede, R.; Klein, M.; Claus, R.A.; Kriek, S.; Quickert, S.; Görls, H.; Neugebauer, U.; Schmitt, M.; Gessner, G.; Heinemann, S.H.; Popp, J.; Bauer, M.; Westerhausen, M. CORM-EDE1: A Highly Water-Soluble and Nontoxic Manganese Based photoCORM with a Biogenic Ligand Sphere. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 104-113.
- ¹¹⁰ Della Ventura, G.; Bellatreccia, F.; Marcelli, A.; Cestelli Guidi, M.; Piccinini, M.; Cavallo, A.; Piochi, M. Application of micro-FTIR imaging in the Earth sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2039-2049.
- ¹¹¹ Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 9-23.
- ¹¹² Whitesides, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, *442*, 368-373.
- ¹¹³ Barnadas-Rodríguez, R.; Sabés, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *Int. J. Pharm.* **2001**, *213*, 175-186.
- ¹¹⁴ Li, M.; Morales, H.H.; Katsaras, J.; Kučerka, N.; Yang, Y.; Macdonald, P.M.; Nieh, M.P. Morphological Characterization of DMPC/CHAPSO Bicellar Mixtures: A Combined SANS and NMR Study. *Langmuir* **2013**, *29*, 15943-15957.
- ¹¹⁵ Marshall Steward, J.C. Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 10-14.
- ¹¹⁶ Clement, N.R.; Gould, J.M. Pyranine (8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a Probe of Internal Aqueous Hydrogen Ion Concentration in Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1981**, *20*, 1534-1538.
- ¹¹⁷ Hermida, L. Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral. *Tesi Doctoral* **2006**.

- ¹¹⁸ Barnadas-Rodríguez, R.; Cladera, J. Steroidal Surfactants: Detection of Premicellar Aggregation, Secondary Aggregation Changes in Micelles, and Hosting of a Highly Charged Negative Substance. *Langmuir* **2015**, *31*, 8980–8988.
- ¹¹⁹ Barnadas-Rodríguez, R.; Estelrich, J. Photophysical Changes of Pyranine Induced by Surfactants: Evidence of Premicellar Aggregates. *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 1972–1982.
- ¹²⁰ Matsuoka, K.; Moroi, Y. Micelle formation of sodium deoxycholate and sodium ursodeoxycholate. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1580*, 189–199.
- ¹²¹ Atkin, A. J.; Lynam, J.M.; Moulton, B.E.; Sawle, P.; Motterlini, R.; Boyle, N.M.; Pryce, M.T.; Fairlamb, I.J.S. Modification of the deoxy-myoglobin/carbonmonoxy-myoglobin UV-vis assay for reliable determination of CO-release rates from organometallic carbonyl complexes. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 5755–5761.
- ¹²² Adolf Vyskočil, A.; Viau, C. Assessment of Molybdenum Toxicity in Humans. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 185–192.
- ¹²³ Parera, E. Micel·les i vesícules metàl·liques a partir de noves fosfines tensioactives. Influència de la coordinació en les propietats d'agregació dels lligands tensioactius. *Tesi Doctoral* **2009**.
- ¹²⁴ Parera, E.; Comelles, F.; Barnadas, R.; Suades, J. New Surfactant Phosphine Ligands and Platinum(II) Metallosurfactants. Influence of Metal Coordination on the Critical Micelle Concentration and Aggregation Properties. *Langmuir* **2010**, *26*, 743–751.
- ¹²⁵ Darensbourg, D. J.; Ewen, J. A. Kinetics of displacement of dimethyl sulfide from cis- and trans-dichlorobis(dimethyl sulfide)platinum(II) by heterocyclic amines in 1,2-dimethoxyethane. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 4168–4177.
- ¹²⁶ Darensbourg, D. J.; Brown, T. L. Infrared intensities of the carbonyl stretching modes and electronic spectra of substituted molybdenum carbonyls. *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 959–966.
- ¹²⁷ Larpent, C.; Patin, H. Hydrosoluble transition-metal coordination compounds of triphenylphosphine m-trisulfonate. *Appl. Organomet. Chem.* **1987**, *1*, 529–534.
- ¹²⁸ Calvo, E.; Bravo, R.; Amigo, A.; Gracia-Fadrique, J. Dynamic surface tension, critical micelle concentration, and activity coefficients of aqueous solutions of nonyl phenol ethoxylates. *Fluid Phase Equilib.* **2009**, *282*, 14–19.
- ¹²⁹ Sifaoui, H.; Lugowska, K.; Domańska, U.; Modaressi, A.; Rogalski, M. Ammonium ionic liquid as modulator of the critical micelle concentration of ammonium surfactant at aqueous solution: conductimetric and dynamic light scattering (DLS) studies. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *314*, 643–650.
- ¹³⁰ Paillet, S.; Grassl, B.; Desbrières, J. Rapid and quantitative determination of critical micelle concentration by automatic continuous mixing and static light scattering. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *636*, 236–241.
- ¹³¹ Zhang, X.; Jackson, J.K.; Burt, H.M. Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1996**, *31*, 145–50.
- ¹³² Hara, K.; Kuwabara, H.; Kajimoto, O.; Bhattacharyya, K. Effect of pressure on the critical micelle concentration of neutral surfactant using fluorescence probe method. *J. Photochem. Photobiol., A* **1999**, *124*, 159–162.
- ¹³³ Azum, N.; Rub, M.A.; Asiri, A.M.; Bawazeer, W.A. Micellar and interfacial properties of amphiphilic drug–non-ionic surfactants mixed systems: Surface tension, fluorescence and UV–vis studies. *Colloids Surf., A* **2017**, *522*, 183–192.
- ¹³⁴ Helenius, A.; McCaslin, D.R.; Fries, E.; Tanford, C. Properties of Detergents. *Methods Enzymol.* **1979**, *56*, 734–749.
- ¹³⁵ Parera, E.; Marín-García, M.; Pons, R.; Comelles, F.; Suades, J.; Barnadas-Rodríguez, R. Supramolecular Arrangement of Molybdenum Carbonyl Metallosurfactants with CO-Releasing Properties. *Organometallics* **2016**, *35*, 484–493.
- ¹³⁶ Atkin, A.J.; Williams, S.; Sawle, P.; Motterlini, R.; Lynama, J.M.; Fairlamb, I.J.S. μ -2-Alkyne dicobalt(0)hexacarbonyl complexes as carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): probing the release mechanism. *Dalton Trans.* **2009**, 3653–3656.
- ¹³⁷ McLean, S.; Mann, B.; Poole, R.K.; Sulfite species enhance carbon monoxide release from CO-releasing molecules: Implications for the deoxymyoglobin assay of activity. *Anal. Biochem.* **2012**, *427*, 36–40.
- ¹³⁸ Chaves-Ferreira, M.; Albuquerque, I.S.; Matak-Vinkovic, D.; Coelho, A.C.; Carvalho, S.M.; Saraiva, L.M.; Romão, C.C.; Bernardes, G.J.L. Spontaneous CO Release from Ru^{II}(CO)₂-Protein Complexes in Aqueous Solution, Cells, and Mice. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1172–1175.
- ¹³⁹ Darensbourg, D.J.; Kump, R.L. A Convenient Synthesis of cis-Mo(CO)₂L₂ Derivatives (L = Group 5A Ligand) and a Qualitative Study of Their Thermal Reactivity toward Ligand Dissociation. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2680–2682.

- ¹⁴⁰ Darensbourg, D.J.; Bischoff, C.J. Water-Soluble Organometallic Compounds. 3. Kinetic Investigations of Dissociative Phosphine Substitution Processes Involving Water-Soluble Group 6 Metal Derivatives in Miscible Aqueous/ Organic Media. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 47-53.
- ¹⁴¹ Mao, G.; Tsao, Y.; Tirrell, M.; Davis, T. Monolayers of Bolaform Amphiphiles: Influence of Alkyl Chain Length and Counterions. *Langmuir* **1994**, *10*, 4174-4184.
- ¹⁴² Jungnickel, C.; Łuczak, J.; Ranke, J.; Fernández, J.F.; Müller, A.; Thoming, J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids Surf., A* **2008**, *316*, 278-284.
- ¹⁴³ Yoshimura, T.; Kusano, T.; Iwase, H.; Shibayama, M.; Ogawa, T.; Kurata, H. Star-Shaped Trimeric Quaternary Ammonium Bromide Surfactants: Adsorption and Aggregation Properties. *Langmuir* **2012**, *28*, 9322-9331.
- ¹⁴⁴ López, O.; Cócera, M.; Wehrli, E.; Parra, J.L.; de la Maza, A. Solubilization of Liposomes by Sodium Dodecyl Sulfate: New Mechanism Based on the Direct Formation of Mixed Micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *367*, 153-60.
- ¹⁴⁵ Kragh-Hansen, U.; Maire, M.; Møller, J.V. The Mechanism of Detergent Solubilization of Liposomes and Protein-Containing Membranes. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2932-2946.
- ¹⁴⁶ Deo, N.; Somasundaran, P. Effects of Sodium Dodecyl Sulfate on Mixed Liposome Solubilization. *Langmuir* **2003**, *19*, 7271-7275.
- ¹⁴⁷ Deo, N.; Somasundaran, P. Mechanism of mixed liposome solubilization in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Colloids Surf., A* **2001**, *186*, 33-41.
- ¹⁴⁸ Löbbecke, L.; Cevc, G. Effects of short-chain alcohols on the phase behavior and interdigitation of phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1237*, 59-69.
- ¹⁴⁹ Mehlhorn, I.E.; Florio, E.; Barber, K.R.; Lordo, C.; Grant, C.W.M. Evidence that trans-bilayer interdigitation of glycosphingolipid long chain fatty acids may be a general phenomenon. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *939*, 151-159.
- ¹⁵⁰ Slater, J.; Huang, C.H. Interdigitated bilayer membranes. *Prog. Lipid Res.* **1988**, *27*, 325-359.
- ¹⁵¹ Zeng, J.; Smith, K.E.; Lee-Gau Chong, P. Effects of Alcohol-induced Lipid Interdigitation on Proton Permeability in L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1404-1414.
- ¹⁵² Dürr, H.N.; Soong, R.; Ramamoorthy, A. When detergent meets bilayer: Birth and coming of age of lipid bicelles. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *69*, 1-22.
- ¹⁵³ Han, F.; He, X.; Huang, J.; Li, Z. Surface Properties and Aggregates in the Mixed Systems of Bolaamphiphiles and Their Oppositely Charged Conventional Surfactants. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 5256-5262.
- ¹⁵⁴ Clary, L.; Gadras, C.; Greiner, J.; Rolland, J.P.; Santaella, C.; Vierling, P.; Gulik, A. Phase behavior of fluorocarbon and hydrocarbon double-chain hydroxylated and galactosylated amphiphiles and bolaamphiphiles. Long-term shelf-stability of their liposomes. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, *125*-137.
- ¹⁵⁵ Fuhrhop, J.H.; Spiroski, D.; Boettchert, C. Molecular Monolayer Rods and Tubules Made of α -(L-Lysine), ω -(Amino) Bolaamphiphiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1600-1601.
- ¹⁵⁶ Franceschi, S.; Viguerie, N.; Riviere, M.; Lattes, A. Synthesis and aggregation of two-headed surfactants bearing amino acid moieties. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 447-452.
- ¹⁵⁷ Nakashima, N.; Asakuma, S.; Kim, J. M.; Kunitake, T. Helical superstructures are formed from chiral ammonium bilayers. *Chem. Lett.* **1984**, 1709-1712.
- ¹⁵⁸ Yan, Y.; Huang, J.; Li, Z.; Han, F.; Ma, J. Aggregates Transition Depending on the Concentration in the Cationic Bolaamphiphile/SDS Mixed Systems. *Langmuir* **2003**, *19*, 972-974.
- ¹⁵⁹ Fairlamb, I.J.S.; Duhme-Klair, A.K.; Lynam, J.M.; Moulton, B.E.; Brien, C.T.O.; Sawle, P.; Hammad, J.; Motterlini, R. η^4 -Pyrone iron(0)carbonyl complexes as effective CO-releasing molecules (CO-RMs). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 995-998.
- ¹⁶⁰ Vyskočil, A.; Viau, C. Assessment of Molybdenum Toxicity in Humans. *J. Appl. Toxicol.* **1999**, *19*, 185-192.
- ¹⁶¹ Mendel, R.R. Cell biology of molybdenum. , *BioFactors* **2009**, *35*, 429-434.
- ¹⁶² Seixas, J.; Mukhopadhyay, A.; Santos-Silva, T.; Otterbein, L.E.; Gallo, D.J.; Rodrigues, S.S.; Guerreiro, B.H.; Gonçalves, A.M.L.; Penacho, N.; Marques, A.R.; Coelho, A.C.; Reis, P.M.; Romão, M.J.; Romão, C.C. Characterization of a versatile organometallic pro-drug (CORM) for experimental CO based therapeutics. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5985-5998.
- ¹⁶³ Desmard, M.; Foresti, R.; Morin, D.; Dagouassat, M.; Berdeaux, A.; Denamur, E.; Crook, S.H.; Mann, B.E.; Scapens, D.; Montravers, P.; Boczkowski, J.; Motterlini, R. Differential Antibacterial Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* by Carbon Monoxide-Releasing Molecules. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 153-163.

Bibliografia

¹⁶⁴ Silva, R.; Malheiros, A.L.; de Sales, E.L.; Horta, R.; de Souza, C.M.; Reis, D.C.; Rocha, B.; Amantéa, M.; Nicácio, J.; dos Santos, F.; Dantas, G.; Isaura, J.; Pires, P.; Versiani, A.; Oliveira, M.C.; Nascimento, V. Intestinal toxicity evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 106, 142-151.

¹⁶⁵ Houa, Y.; Yaoa, C.; Linga, L.; Dua, Y.; Hea, R.; Ismail, M.; Zhanga, Y.; Fub, Z.; Li, X. Novel dual VES-phospholipid self-assembled liposomes with an extremely high drug loading efficiency. *Colloids Surf., B* **2017**, 156, 29-37.

¹⁶⁶ Almeida, N.; Barreto, C.M.; Brandelli, A. Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. *Food Hydrocolloids* **2017**, 70, 1-7.

¹⁶⁷ Condom, M.; Suades, J. One step synthesis of a new asymmetric water-soluble phosphine. *Inorg. Chem. Commun.* **2005**, 8, 355-357.