



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## **Grao en Química**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Orgánulos sintéticos para la organización espacial programable de biomoléculas**

**Synthetic organelles for programmable spatial organization of biomolecules**

**Orgánulos sintéticos para a organización espacial programable de biomoléculas**

**José Manuel Pérez Martínez**

**Curso: 2021 - 2022.  
Convocatoria: Junio**

*Dirigido por el Dr. Roberto Javier Brea Fernández*

## Índice

Agradecimientos .....	I
Cronograma del plan de trabajo desarrollado .....	II
Abreviaturas.....	III
Resumen .....	V
Resumo .....	VI
Abstract.....	VII
Palabras clave/Palabras clave/Key words.....	VIII
Introducción.....	1
1.    Orgánulos naturales .....	1
2.    Orgánulos sintéticos .....	2
2.1 Estrategias para la construcción de orgánulos sintéticos.....	2
2.2 Precedentes .....	4
Objetivos.....	5
Discusión y resultados .....	6
1.    Retículo endoplasmático (RE).....	6
2.    Biomiméticos del retículo endoplasmático .....	6
3.    Síntesis de geminis .....	8
3.1 Mecanismo de reacción .....	9
4.    Autoensamblaje .....	9
4.1 Turbidimetría .....	10
4.2    Coalescencia.....	11
4.3 Microscopía .....	13
5.    Atrapado molecular .....	14
5.1 Atrapado de <i>Nile Red</i> .....	14
5.1.1 Turbidimetría.....	14
5.1.2 Ensayos de atrapamiento .....	15
5.1.3 Microscopía .....	17
5.1.4 Estudio de atrapado de <i>Nile Red</i> a diferentes concentraciones .....	19
5.1.5 Estudio de atrapado de <i>Nile Red</i> a diferentes pHs.....	20
5.2 Atrapado molecular selectivo .....	21
Conclusiones.....	23
Conclusións .....	24
Conclusions .....	25
Parte experimental .....	26
1.    Materiales y métodos.....	26
1.1 Reactivos .....	26

1.2 Instrumentación empleada.....	27
2. Procedimiento experimental.....	28
3. Metodología experimental.....	29
3.1 Disoluciones stock.....	29
3.2 Preparación de películas lipídicas ( <i>lipid films</i> ).....	29
3.3 Hidratación de películas lipídicas: Construcción de fases esponjas.....	30
3.4 Turbidimetría.....	30
3.4.1 Protocolo general.....	30
3.4.2 Turbidimetría en presencia de <i>Nile Red</i> .....	30
3.5 Ensayos de coalescencia.....	31
3.5.1 Ensayo de coalescencia con <i>Nile Red</i> .....	31
3.5.2 Ensayo de coalescencia con HPTS.....	31
3.6 Microscopía.....	31
3.6.1 Microscopía de campo claro.....	31
3.6.2 Microscopía de fluorescencia.....	31
3.7 Estudio de atrapado de <i>Nile Red</i> a diferentes concentraciones.....	32
3.8 Estudio de atrapado de <i>Nile Red</i> a diferentes pHs.....	32
Anexos.....	33
Tablas.....	33
Espectros.....	34
Espectros de RMN de C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub> .....	34
Espectros de RMN de C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> .....	35
Espectros de RMN de C <sub>8</sub> -C <sub>14</sub> .....	36
Espectro de masas de C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub> .....	37
Espectro de masas de C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> .....	37
Espectro de masas de C <sub>8</sub> -C <sub>14</sub> .....	37
Datos de densidad óptica (DO).....	38
Fotografías de microscopía.....	40
Bibliografía.....	41

## Agradecimientos

Primeramente, me gustaría darle las gracias a mi tutor Roberto Javier Brea Fernández por su inagotable paciencia para responder todas y cada una de mis preguntas, que no son pocas. Gracias por ayudarme siempre con cada una de las dificultades encontradas, por mostrarme como algo complejo puede quedar expresado de una forma sencilla y, en definitiva, por enseñarme tanto en estos meses en los que me he estresado, pero también he disfrutado y aprendido mucho.

Me gustaría dar las gracias a todos los amigos que de estos seis años de experiencia llevo conmigo. Por todos los años de trabajo duro y esfuerzo sin descanso con recompensa a veces y otras no tanto, pero siempre con risas y alguna que otra fiesta de por medio. Gracias por tolerar mis nervios, por los ratos en los sofás de arquitectura o por recordarme siempre que habían salido las notas. Gracias por estos increíbles seis años.

También me gustaría dar las gracias a mi madre, mi padre y mi hermana, por haber confiado en mí desde el principio, por permitir que pudiese cumplir mis metas, por ser el ancla que, aún estando a más de mil kilómetros, me ha permitido seguir adelante todos estos años, por sus consejos, su apoyo incondicional y porque sin ellos esto no habría sido posible. Gracias por ser la mejor familia que se puede tener.

Gracias también a la compañera de piso más cariñosa, sensible y divertida. Aquella persona con la que he tenido el placer de disfrutar y evolucionar todos estos años. Gracias Fani por enseñarme a conducir en condiciones y por estar siempre ahí.

Y, por último, pero no menos importante, gracias a mi pareja Elba, a la persona que en el momento menos esperado apareció, que me ha animado, dado consejos, relajado y ha conseguido hacerme desconectar cuando nadie más podía. Gracias por aparecer en mi vida.

## Cronograma del plan de trabajo desarrollado

	Oct.	Nov.	Dic.	En.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.
Búsqueda bibliográfica									
Trabajo experimental									
Interpretación de resultados y redacción de la memoria									
Preparación de la exposición de resultados									
Redacción de artículos									

## Abreviaturas

**°C:** Grado centígrado

**CDCl<sub>3</sub>:** Cloroformo deuterado

**CHCl<sub>3</sub>:** Cloroformo

**CH<sub>3</sub>CN:** Acetonitrilo

**DO:** Densidad óptica

**Et<sub>3</sub>N:** Trietilamina

**Et<sub>2</sub>O:** Dietil éter

**h:** Hora

**HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

**HPTS:** 8-Hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sodio

**min:** Minuto

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**MS:** Espectrometría de masas

**Nile Red:** 9-(Dietilamino)-5H-benzo[ $\alpha$ ]fenoxazina-5-ona

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**RE:** Retículo endoplasmático

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**SD:** Desviación estándar

**TFA:** Ácido trifluoroacético

**THF:** Tetrahidrofurano

**$\mu\text{L}$** : Microlitro

**$\mu\text{m}$** : Micrómetro

**$\mu\text{M}$** : Micromolar

## Resumen

Los orgánulos celulares orquestan las reacciones bioquímicas que suceden en una célula con un alto grado de precisión. Es por ello que resulta de gran interés la construcción de orgánulos sintéticos que permitan emular dichas funciones. De esta forma, se podría lograr la captación/liberación de proteínas específicas, así como controlar y acelerar transformaciones bioquímicas relevantes. En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha fabricado una nueva clase de sistemas supramoleculares basados en surfactantes zwitteriónicos (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>), los cuales presentan una gran capacidad de mimetizar eficazmente los orgánulos celulares. El estudio exhaustivo de los diferentes surfactantes ha permitido posicionar al derivado C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> como un excelente candidato para lograr una adecuada imitación de las estructuras subcelulares complejas que suponen los orgánulos naturales. Este hecho se debe fundamentalmente a que dicha molécula anfifílica se autoensambla en agua en forma de fase esponjosa (L<sub>3</sub>), la cual se asemeja en un alto grado a la compleja y dinámica estructura del RE. Cabe destacar que los sistemas de tipo L<sub>3</sub> del C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> presentan valores elevados de atrapamiento molecular a diversas concentraciones y pHs, así como selectividad en función de la polaridad del material atrapado. Este comportamiento pone de manifiesto su utilidad en múltiples aplicaciones, tales como su empleo como biorreactores, la liberación controlada de fármacos o la eliminación de contaminantes en aguas.



## Resumo

Os orgánulos celulares orquestran as reaccións bioquímicas que ocorren nunha célula cun alto grao de precisión. Por iso é de grande interese a construción de orgánulos sintéticos que permitan emular estas funcións. Deste xeito, poderíase conseguir a captación/liberación de proteínas específicas, así como controlar e acelerar as transformacións bioquímicas relevantes. Neste Traballo Fin de Grao fabricouse unha nova clase de sistemas supramoleculares baseados en surfactantes zwitteriónicos (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>), que teñen unha gran capacidade para imitar eficazmente orgánulos celulares. O estudo exhaustivo dos diferentes surfactantes permitiu que o derivado C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> se posicione como un excelente candidato para conseguir unha adecuada imitación das complexas estruturas subcelulares que supoñen os orgánulos naturais. Este feito débese fundamentalmente a que dita molécula anfifílica se autoensambla na auga en forma de fase esponxosa (L<sub>3</sub>), que se asemella moito á estrutura complexa e dinámica do RE. Cómpre sinalar que os sistemas tipo L<sub>3</sub> do C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> presentan altos valores de atrapamento molecular a varias concentracións e pHs, así como selectividade dependendo da polaridade do material atrapado. Este comportamento destaca a súa utilidade en múltiples aplicacións, como o seu uso como biorreactores, a liberación controlada de fármacos ou a eliminación de contaminantes na auga.

## Abstract

Cellular organelles orchestrate the biochemical reactions that occur in a cell with a high degree of precision. That is why the construction of synthetic organelles that allow emulating these functions is of great interest. In this way, the uptake/release of specific proteins could be achieved, as well as controlling and accelerating relevant biochemical transformations. In this Final Degree Project, a new class of supramolecular systems based on zwitterionic surfactants (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) have been fabricated, which have a great capacity to effectively mimic cellular organelles. The exhaustive study of the different surfactants has allowed the C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> derivative to be positioned as an excellent candidate to achieve an adequate imitation of the complex subcellular structures that natural organelles suppose. This is fundamentally due to the fact that this amphiphilic molecule self-assembles in water in the form of a sponge phase (L<sub>3</sub>), which closely resembles the complex and dynamic structure of the ER. It should be noted that the C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> L<sub>3</sub>-type systems show high values of molecular entrapment at various concentrations and pHs, as well as selectivity depending on the polarity of the trapped material. This behavior highlights its usefulness in multiple applications, such as its use as bioreactors, the controlled release of drugs or the elimination of contaminants in water.

## Palabras clave

Orgánulo sintético, retículo endoplasmático, surfactante, gemini, fase esponja, atrapado molecular.

## Palabras clave

Orgánulo sintético, retículo endoplasmático, surfactante, xemelgos, fase esponxa, atrapamento molecular.

## Key words

Synthetic organelle, endoplasmic reticulum, surfactant, gemini, sponge phase, molecular entrapment.

## Introducción

Las membranas biológicas son un sistema altamente dinámico y semipermeable.<sup>[3]</sup> Este hecho les permite jugar un papel clave en numerosos procesos biológicos, tales como la obtención de respuestas celulares ante estímulos externos,<sup>[16]</sup> el establecimiento de interacciones célula-célula, fagocitosis, síntesis de proteínas, producción de energía y compartimentalización de metabolitos y macromoléculas.<sup>[6]</sup> En cuanto a su composición, las membranas biológicas están formadas por numerosos lípidos y proteínas, en función de los cuales quedan determinada la estructura y propiedades físicas de estos sistemas y, por tanto, su versatilidad.

### 1. Orgánulos naturales

En los organismos eucariotas, la existencia de membranas posibilita la formación de infraestructuras ordenadas con funciones especializadas que se denominan orgánulos (Figura 1). La presencia de orgánulos es la causa fundamental de la mayor complejidad presente en las células eucariotas frente a las procariotas. Este factor diferencial conlleva múltiples ventajas asociadas. Así, por ejemplo, la presencia de orgánulos provoca el aumento del área disponible para la producción energética, logrando que el aporte energético se vea incrementado para el caso de los organismos eucariotas. Además, los orgánulos pueden servir como soporte para moléculas de membrana, facilitando así la interacción de éstas con otras presentes en el citosol.<sup>[17]</sup> Los orgánulos comprenden, entre otros, vesículas membranosas simples tales como lisosomas o vacuolas, que almacenan enzimas digestivas y sustancias de reserva o de desecho, respectivamente; mitocondrias, responsables de la respiración celular; o estructuras membranosas más complejas como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi,<sup>[14]</sup> en los que se da la mayor parte de la síntesis *de novo* de lípidos de membrana.<sup>[6]</sup>



Figura 1. Célula eucariota mostrando diferentes orgánulos celulares, los cuales posibilitan su correcto funcionamiento.

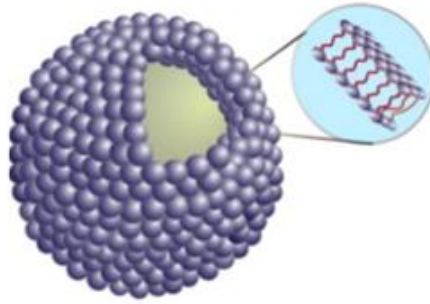
El hecho de que estas estructuras subcelulares se encuentren rodeadas de membrana posibilita la compartimentalización de biomoléculas o enzimas, las cuales, permiten llevar a cabo determinadas funciones que requieren condiciones específicas.<sup>[12]</sup> Este hecho permite, por ejemplo, que se den reacciones que requieren un ambiente hidrofóbico dentro del medio hidrofílico que constituye el citoplasma celular.<sup>[6]</sup>

## 2. Orgánulos sintéticos

La organización espacial que ofrecen los orgánulos celulares mediante compartimentalización ha despertado un especial interés a lo largo de los últimos años. Esta característica favorece la colocalización y concentración de biomoléculas, aumentando así el rendimiento de las reacciones (bio)químicas en las que se ven involucradas. Además, este hecho también permite un incremento en la regulación de procesos biológicos relevantes por establecimiento de gradientes de concentración, separación de reacciones no deseadas y control de la accesibilidad a los reactivos.<sup>[2]</sup> Los numerosos beneficios que presenta el establecimiento de compartimentos definidos ha conllevado que el intento de mimetizar sistemas organulares sea uno de los principales retos de la química biológica a lo largo de los últimos años.<sup>[15]</sup> Cabe resaltar que para imitar de manera adecuada a los orgánulos celulares naturales la membrana del orgánulo sintético deseado debería ser estable y semipermeable.

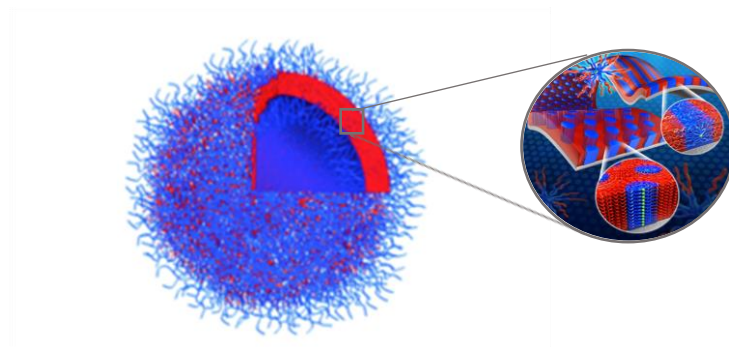
### 2.1 Estrategias para la construcción de orgánulos sintéticos

Una de las aproximaciones más empleadas para llevar a cabo la imitación de la estructura y las funciones de los orgánulos naturales es la basada en la fabricación de vesículas lamelares rodeadas de membrana (Figura 2). Teniendo en cuenta la importancia que adquiere la permeabilidad de la membrana a la hora de permitir la comunicación y el transporte de moléculas,<sup>[15]</sup> se observa como dichas vesículas presentan importantes limitaciones debido a su baja capacidad de transporte a través de la membrana lipídica. Dicha falta de permeabilidad, unida a su simple estructura, hace que las vesículas no puedan representar adecuadamente la elevada complejidad estructural y funcional de los orgánulos.<sup>[2]</sup>



*Figura 2. Vesícula formada por una membrana lipídica.<sup>[18]</sup>*

Otra de las estrategias más empleadas para la construcción de orgánulos biomiméticos hace uso de cápsulas poliméricas.<sup>[15]</sup> Muchos de estos sistemas están basados en polimersomas, los cuales están formados por la unión de bloques de copolímeros anfifílicos que rodean un interior acuoso y forman una membrana más gruesa que en el caso de los lípidos (Figura 3). Esta membrana les aporta una mayor estabilidad química y mecánica, así como una menor pérdida de los compuestos encapsulados.<sup>[8]</sup> A pesar de ser sistemas mucho más robustos que las vesículas lipídicas, presentan limitaciones considerables debido a su baja permeabilidad.<sup>[15]</sup>

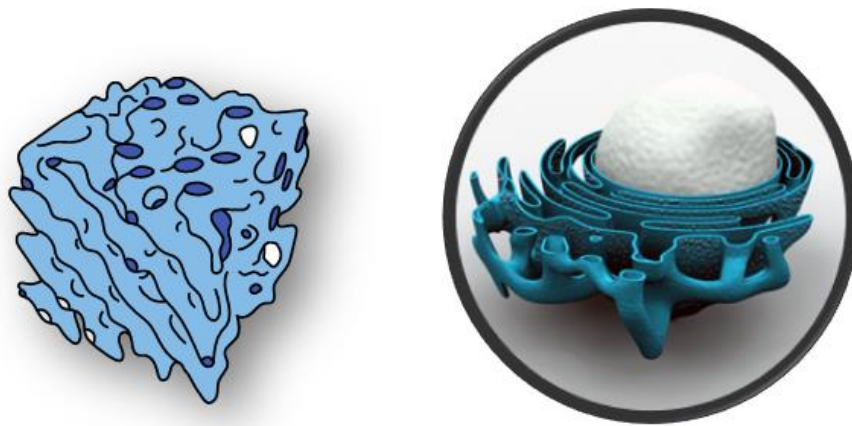


*Figura 3. Bloques de copolímeros anfifílicos unidos para formar un polimersoma.<sup>[1],[18]</sup>*

Desafortunadamente, las estrategias de fabricación de orgánulos sintéticos mencionadas anteriormente no reproducen en gran medida las características propias de los orgánulos naturales. El nivel de complejidad en lo relativo a la compartimentalización presente en distintos organismos varía, así como lo puede hacer el tamaño y la sofisticación del orgánulo en base a la recepción de un estímulo biológico.<sup>[6]</sup> Por lo tanto, no resulta sencillo la imitación de tales estructuras y, es por ello que son necesarios nuevos diseños para la construcción de compartimentos bien definidos que puedan mimetizar en gran manera los orgánulos celulares.

## 2.2 Precedentes

Durante los últimos años, el grupo de investigación Biomimetic Membrane Chemistry (BioMemChem) ha estado trabajando en la fabricación de orgánulos sintéticos basados en estructuras no lamelares de fase tipo esponja, las cuales se forman por autoensamblaje en medio acuoso de una mezcla de detergentes no iónicos y compuestos galactolipídicos de cadena sencilla.<sup>[5]</sup> En el proceso de autoensamblaje son relevantes tanto la geometría molecular como el establecimiento de enlaces de hidrógeno.<sup>[2]</sup> Los sistemas supramoleculares generados solventan así el problema de la permeabilidad previamente mencionado para otras construcciones debido a que poseen una estructura nanoporosa y una amplia superficie por la que puede tener lugar el intercambio de moléculas con el medio externo. Estos modelos lipídicos de fase esponja pueden actuar como sistemas reversibles de salvaguarda o liberación de macromoléculas controlados espaciotemporalmente por estímulos externos (luz, pH, fuerza iónica, temperatura).<sup>[5]</sup> La estructura abierta y la compleja red de canales que aporta dicho modelo hace que vislumbremos su utilización como un eficaz biomimético del retículo endoplasmático (RE) (Figura 4).



*Figura 4. Semejanza existente entre la estructura de fase tipo esponja (izquierda) y el retículo endoplasmático (derecha).*

## Objetivos

El fin del presente proyecto de investigación es el diseño, síntesis y caracterización de una nueva clase de sistemas supramoleculares capaces de mimetizar eficazmente las estructuras subcelulares complejas características de los orgánulos naturales, centrándonos fundamentalmente en el RE. Para lograr una aproximación apropiada a dichas estructuras, se llevará a cabo la construcción y estudio de un modelo lipídico de fase esponja mediante el empleo de surfactantes zwitteriónicos tipo gemelar (*geminis*). El análisis exhaustivo de los sistemas propuestos permitirá establecer sus propiedades estructurales, su rango de actuación y sus potenciales aplicaciones.



## Discusión y resultados

### 1. Retículo endoplasmático (RE)

El RE se organiza como una red enmarañada de túbulos ramificados y sacos planos interconectados entre sí, la cual se encuentra unida a la membrana externa nuclear y expandida dentro del citosol. En esta compleja estructura se puede dar la síntesis lipídica, así como la generación de proteínas de membrana y de proteínas de secreción.<sup>[6]</sup>

### 2. Biomiméticos del retículo endoplasmático

La compleja estructura del RE puede quedar mimetizada de una forma realmente importante mediante el empleo de una familia de surfactantes denominados geminis. El término gemini fue acuñado en 1991 por Menger, haciendo referencia a aquellas moléculas anfifílicas sintéticas constituidas por una cadena hidrocarbonada seguida de un grupo iónico, un espaciador, un segundo grupo iónico y otra cadena hidrocarbonada (Figura 5).<sup>[10]</sup>

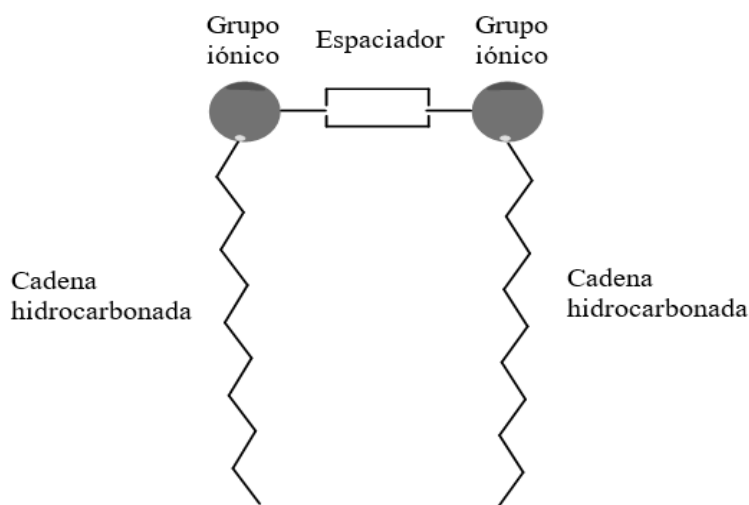


Figura 5. Estructura general de un surfactante tipo gemini.<sup>[10]</sup>

Para facilitar la descripción de estos compuestos, habitualmente se suelen nombrar como  $C_x-C_y$ , siendo  $x$  e  $y$  el número de carbonos de las cadenas hidrocarbonadas de izquierda a derecha. Dentro de la gran variedad de posibles combinaciones, cabe destacar los geminis zwitteriónicos constituidos por un grupo con carga positiva (sal de amonio cuaternaria) y otro con carga negativa (grupo fosfodiéster), separados por etileno como espaciador. Cabe resaltar que estos surfactantes presentan una alta tendencia a autoensamblarse incluso a bajas concentraciones.<sup>[13]</sup>

Por lo general, los geminis son solubles en agua, formando disoluciones opalescentes o claras. Sin embargo, existen varios ejemplos en los que se forman gotas insolubles en medio acuoso, dando lugar a lo que se conocen como coacervados. El término coacervado hace referencia a aquel tipo de disolución coloidal que resulta inmisible con su propio disolvente.<sup>[13]</sup> Estos coacervados presentan ciertas ventajas como es su rápida formación o la facilidad de intercambio de moléculas con su medio externo, a diferencia de las vesículas de membrana lipídica, las cuales deben recurrir en muchos casos a transportadores de membrana. Además, la formación de estas estructuras puede ser controlada de forma reversible mediante fosforilaciones/desfosforilaciones o temperatura. Todo ello hace de la coacervación una vía de creación de sistemas de compartimentalización altamente dinámicos.<sup>[17]</sup>

Los lípidos pueden autoensamblarse de muy distinta manera, incluyendo en forma de fases lamelares cristalinas ( $L_C$ ), fases hexagonales inversas ( $H_2$ ), fases cúbicas micelares ( $Fd3m$ ) o fases cúbicas bicontinuas (Figura 6). Dentro de las fases cúbicas bicontinuas, se encuentra la fase lipídica de tipo esponja ( $L_3$ ).<sup>[9]</sup> La mesofase lipídica que constituye la fase  $L_3$  está formada por una intrincada red tridimensional de bicapas lipídicas continuas que conforman un sistema de canales acuosos de tamaños nanométricos.<sup>[7]</sup> Cabe mencionar que esta estructura bicontinua desordenada se puede formar en base al empleo de geminis zwitteriónicos. En este caso particular, los geminis se autoensamblan de forma espontánea ante un agente inductor de coacervación, como puede ser el agua, llevando a la formación de la fase no lamelar  $L_3$ .<sup>[7][11]</sup>

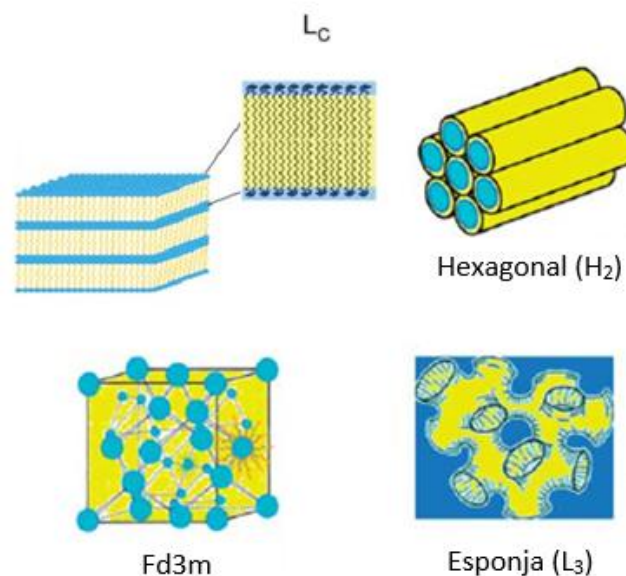


Figura 6. Representación de varios modelos de fases lipídicas.<sup>[9]</sup>

La utilización de geminis zwitteriónicos podría permitir la construcción de estructuras subcelulares complejas que mimeticen adecuadamente al RE. Es por ello que nos plantemos inicialmente la síntesis de diferentes derivados geminis y el estudio exhaustivo de su autoensamblaje en agua.

### 3. Síntesis de geminis

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la preparación de tres compuestos anfifílicos zwitteriónicos de carácter gemelar (*geminis*). Para una mayor simplificación del modelo de estudio, hemos decidido emplear una cabeza polar derivada de fosfocolina idéntica para los tres casos. En cuanto a las colas, mantuvimos una cadena hidrocarbonada constante ( $C_8$ ) y realizamos únicamente variaciones de tamaño en la otra ( $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{14}$ ). De esta forma, podríamos esclarecer de manera sencilla la relación estructura-variaciones morfológicas de los sistemas autoensamblados generados. Teniendo en cuenta estos aspectos, se sintetizaron en una sola etapa los compuestos  $C_8$ - $C_8$ ,  $C_8$ - $C_{10}$  y  $C_8$ - $C_{14}$  siguiendo el esquema sintético mostrado en la Figura 7.

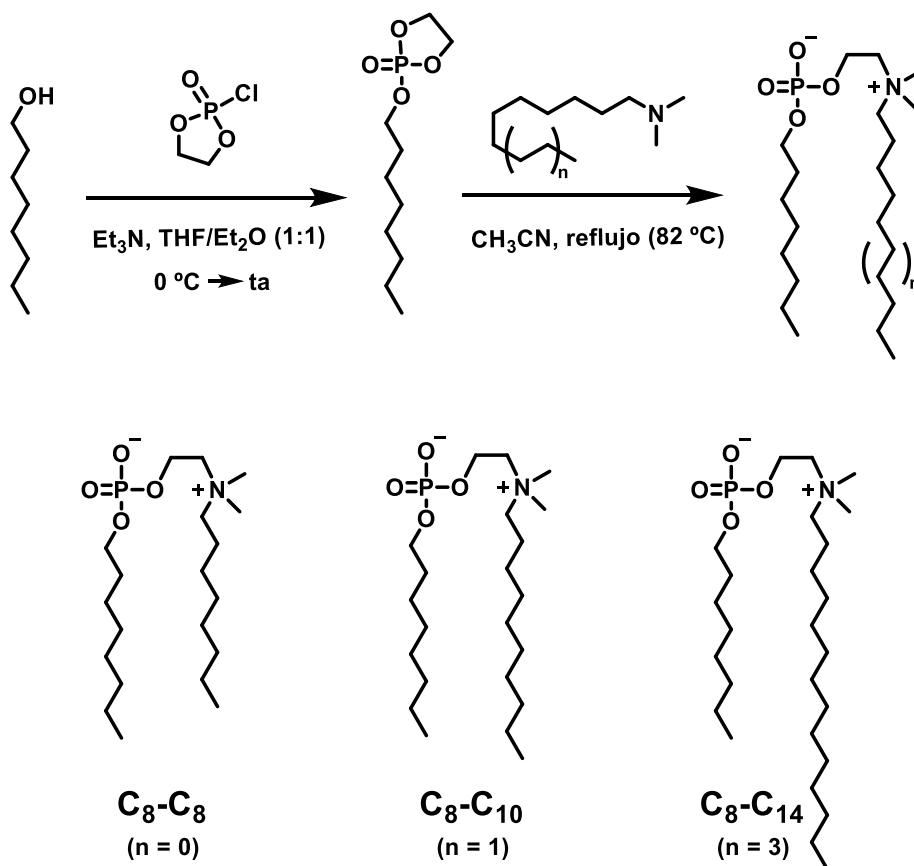


Figura 7. Esquema sintético de los geminis zwitteriónicos  $C_8$ - $C_8$ ,  $C_8$ - $C_{10}$  y  $C_8$ - $C_{14}$ .<sup>[13]</sup>

Tal y como se recoge en dicho esquema, la preparación de los anfifílicos gemelares conlleva dos pasos de reacción. En primer lugar, se trató 1-octanol con 2-cloro-1,3,2-dioxofosfolan-2-óxido, dando lugar al intermedio fosfolano-C<sub>8</sub>, el cuál se hizo reaccionar directamente con la alquil dimetilamina correspondiente para obtener el compuesto gemelar deseado.

### 3.1 Mecanismo de reacción

La formación del intermedio fosfolano-C<sub>8</sub> transcurre a través de un mecanismo de reacción basado en una sustitución nucleófila bimolecular (S<sub>N</sub>2). La posterior etapa de reacción para dar lugar a los productos finales deseados se basa en un ataque nucleófilo entre la alquil dimetilamina adecuada y el intermedio fosfolano-C<sub>8</sub> (Figura 8).

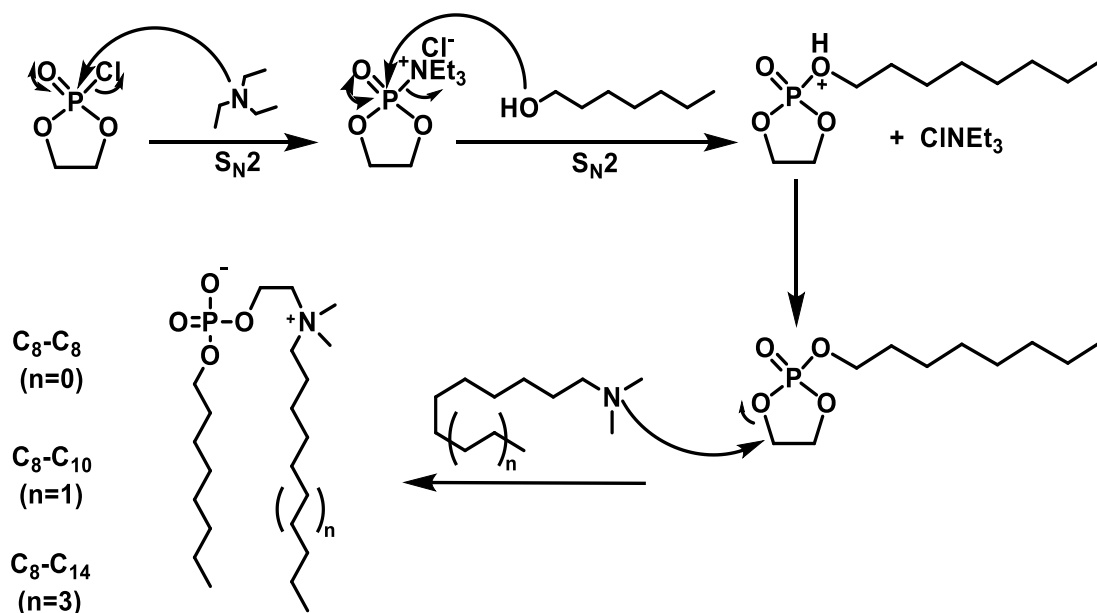


Figura 8. Mecanismo de formación de los geminis C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>.

## 4. Autoensamblaje

Una vez sintetizados los diferentes geminis zwitteriónicos, procedimos al estudio de su autoensamblaje. Para ello, empleamos diversas técnicas que nos facilitasen el estudio y la visualización de las estructuras supramoleculares resultantes de la asociación de los geminis en disolución acuosa.

#### 4.1 Turbidimetría

Una medida experimental del autoensamblaje que se llevó a cabo en los geminis bajo estudio la constituyó el ensayo de turbidimetría. Esta técnica consiste en la realización de medidas, de forma continua con el paso del tiempo, de la densidad óptica (DO) de una dispersión que contiene el surfactante.

Para ello, se prepararon inicialmente películas lipídicas (*lipid films*) finas para cada uno de los geminis previamente sintetizados. La hidratación de las películas mediante adición de agua milliQ y posterior agitación en un vórtex dio lugar a una dispersión lipídica que se monitoreó con el tiempo mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible.

Inicialmente, esperábamos que la presencia del gemini distribuido por toda la muestra ocasionase la dispersión óptica de la luz. A medida que transcurriese el tiempo, si el autoensamblaje del gemini tuviese lugar, la DO disminuiría. Este hecho sería consecuencia tanto de la presencia de un menor número de moléculas en la suspensión como de la sedimentación de los agregados obtenidos en el fondo del recipiente. Como era de aguardar, este tipo de comportamiento se observó al hidratar películas finas del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (Figura 9). Un análisis de tres muestras de dicho gemini, mostró que a lo largo de un tiempo de 8 h se produjo una continua disminución en los valores de DO recogidos a longitud de onda de 600 nm. Este resultado es consecuencia

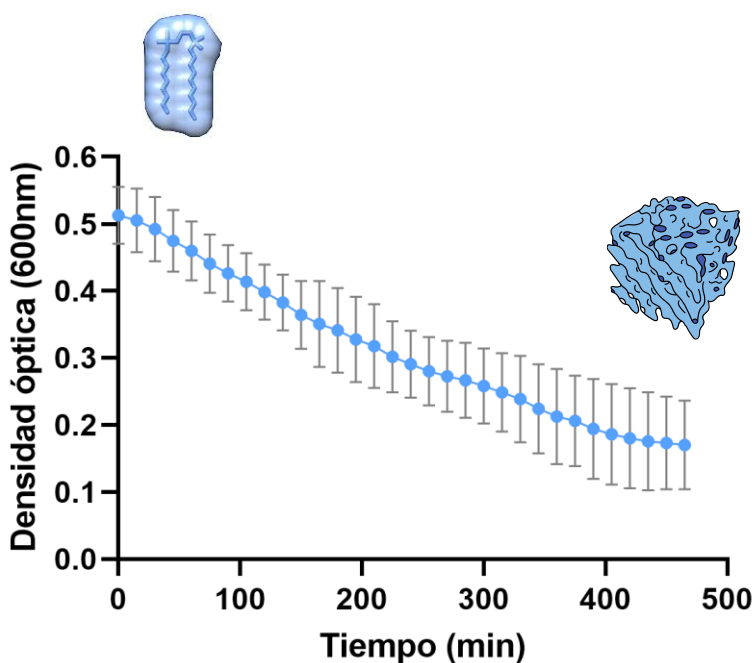


Figura 9. Estudio de turbidimetría de muestras hidratadas del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM).

fundamentalmente de la formación de agregados de tamaño considerable, los cuales tienden a depositarse en el fondo de la cubeta.

Por el contrario, el estudio turbidimétrico de las muestras resultantes de la hidratación de C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> no condujo a una disminución significativa del valor de DO (600 nm) al cabo de un tiempo de análisis análogo (8 h) al del derivado C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>. Creemos que esto puede ser debido a que ambos geminis forman agregados supramoleculares de menor tamaño (micelas, vesículas) que en el caso de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, permaneciendo así en la dispersión acuosa y no depositándose en el fondo de la cubeta.

#### 4.2 Coalescencia

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por turbidimetría, decidimos centrarnos a continuación en la visualización directa de las fases resultantes del proceso de autoensamblaje tras la coalescencia de los agregados obtenidos. Al igual que en estudios previos realizados con sistemas similares,<sup>[4]</sup> se observó que una vez hidratadas las muestras lipídicas del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, los agregados supramoleculares coalescían de forma rápida (8 h) en el fondo del recipiente (Figura 10).

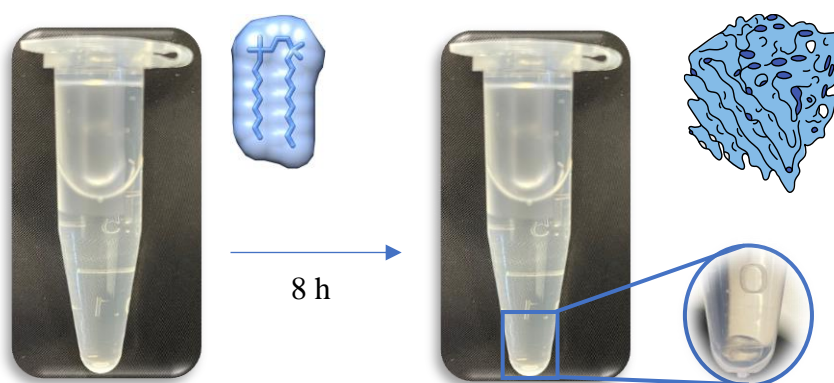
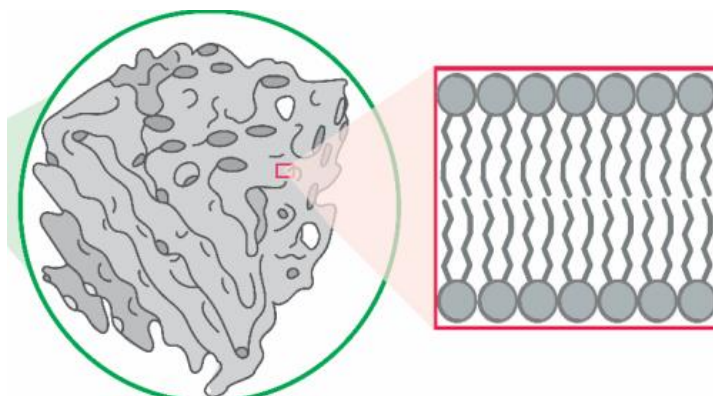


Figura 10. Estudio de coalescencia del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>.

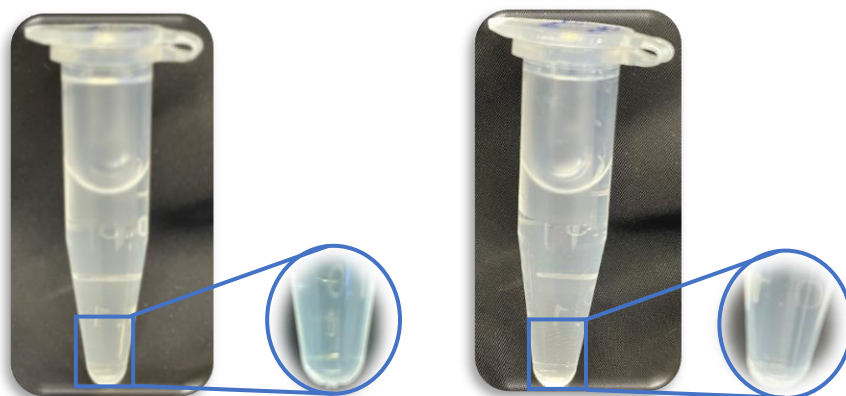
Cabe destacar que un estudio biofísico reciente realizado en colaboración entre BioMemChem y los grupos de investigación de los profesores Devaraj y Sinha de la University of California, San Diego, permitió corroborar mediante difracción de rayos X de ángulo reducido (SAXS) que, tal y como habíamos hipotetizado previamente, los agregados de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> seguían un modelo de fase esponja (L<sub>3</sub>) (Figura 11).<sup>[11]</sup> Este tipo de

mesofase estaría constituida por una red tridimensional de bicapas lipídicas continuas que mimetizarían adecuadamente la estructura del RE.



*Figura 11. Modelo propuesto para los agregados resultantes del gemini  $C_8-C_{10}$ . Bicapa de geminis, cada uno formado por una cabeza con un grupo fosfodiéster y una amina cuaternaria y dos colas hidrocarbonadas de diez y doce carbonos ( $C_{10}-C_{12}$ ). Bicapa lipídica en tres dimensiones formando canales de agua interconectados.<sup>[11]</sup>*

El estudio de los geminis  $C_8-C_8$  y  $C_8-C_{14}$  no permitió observar ningún tipo de fenómeno de coalescencia (Figura 12). Este hecho parece indicar nuevamente que las estructuras resultantes del proceso de autoensamblaje de dichas moléculas anfifílicas concuerdan más con sistemas lamelares de tipo micelar o vesicular.



*Figura 12. Estudio de coalescencia de los geminis  $C_8-C_8$  (izquierda) y  $C_8-C_{14}$  (derecha).*

Por lo tanto, fue posible comprobar la importancia de las variaciones estructurales realizadas en los geminis sintetizados debidas fundamentalmente a la introducción de una amina secundaria de distinta longitud. De este modo, mínimas variaciones en una de las cadenas carbonadas de los geminis daba lugar a un gran cambio en agregación en los mismos y, con ello, a la adquisición de diferentes estructuras supramoleculares.

### 4.3 Microscopía

Una vez observada la presencia o ausencia de las fases coalescidas, decidimos proceder al estudio de las mismas mediante microscopía óptica de campo claro. En el caso de los geminis  $C_8-C_8$  y  $C_8-C_{14}$ , se observaron numerosas poblaciones de partículas de morfología esférica con un tamaño de aproximadamente  $2\ \mu\text{m}$  (Figura 13).

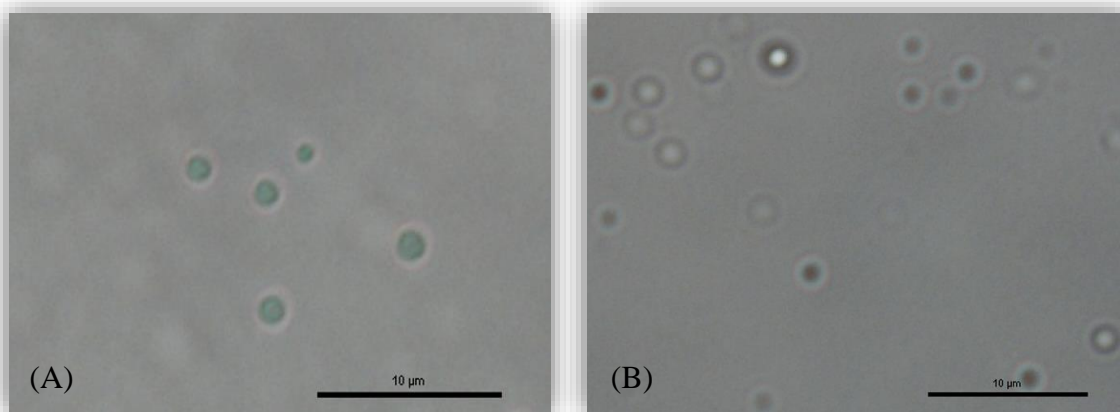


Figura 13. (A) *Dispersión del gemini  $C_8-C_8$ .* (B) *Dispersión del gemini  $C_8-C_{14}$ .*

Respecto al gemini  $C_8-C_{10}$ , se visualizaron numerosas estructuras esféricas de mayor tamaño, presentando una alta polidispersidad y llegando a alcanzar algunas de ellas dimensiones superiores a  $100\ \mu\text{m}$  (Figura 14).

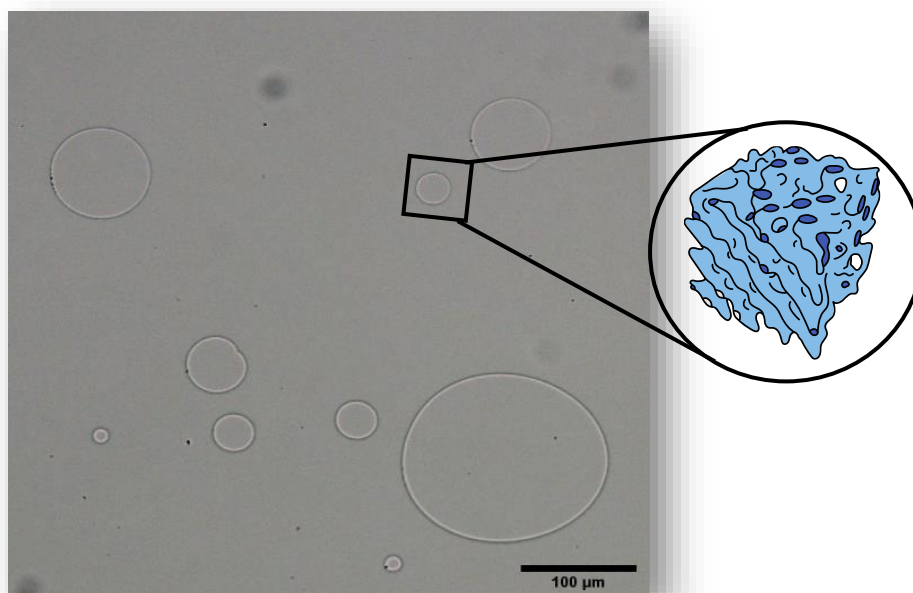


Figura 14. *Fase coalescida del gemini  $C_8-C_{10}$ .*

La presencia de partículas de tamaños variables en la dispersión del gemini  $C_8-C_{10}$  creemos que podría ser debida a la alta tendencia a autoagregarse que presentan



las estructuras de fase tipo esponja ( $L_3$ ), demostrada previamente en el ensayo turbidimétrico y de coalescencia. De esta forma, consideramos que este tipo de estructuras podrían coalescer entre sí para dar lugar a partículas de gran tamaño incluso a bajas concentraciones. En contraposición, la observación de un tamaño de partícula homogéneo en el caso de los otros gemelares ( $C_8-C_8$  y  $C_8-C_{14}$ ) resultó indicativa de una menor tendencia de estas moléculas anfifílicas a agregarse entre sí, confirmando de esta forma los resultados obtenidos en los ensayos de turbidimetría y coalescencia.

## 5. Atrapado molecular

Evaluamos a continuación la capacidad que presentan las estructuras resultantes del autoensamblaje de los surfactantes zwitteriónicos de atrapar moléculas en su interior. De esta forma, podríamos analizar si dichas estructuras mimetizan de manera adecuada la compartimentalización de biomoléculas que presentan los orgánulos naturales. En particular, decidimos centrarnos en el atrapado de los compuestos fluorescentes *Nile Red* y HPTS (Figura 15).

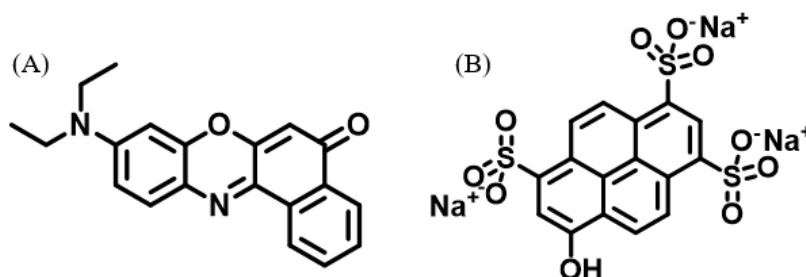


Figura 15. Estructuras de los compuestos fluorescentes *Nile Red* (A) y HPTS (B).

### 5.1 Atrapado de *Nile Red*

#### 5.1.1 Turbidimetría

En primer lugar, antes de realizar el estudio de atrapado molecular, decidimos comprobar si el *Nile Red* afectaba a la capacidad de autoensamblaje del gemini  $C_8-C_{10}$ . Para ello, realizamos medidas turbidimétricas de una dispersión de dicho surfactante en presencia de *Nile Red*. El análisis de dos muestras nos permitió observar una disminución continua (8 h) de la DO equivalente a la observada previamente en ausencia de *Nile Red* (Figura 16). De esta forma, comprobamos que el *Nile Red* no afectaba al proceso de autoagregación del  $C_8-C_{10}$ .

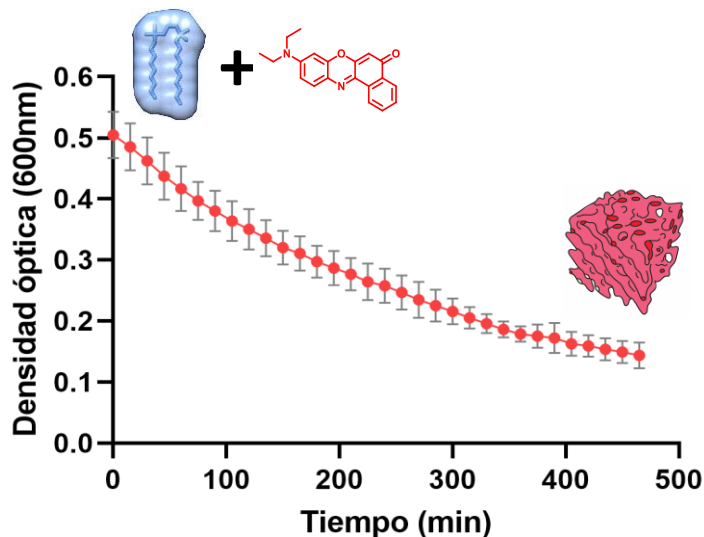


Figura 16. Estudio de turbidimetría correspondiente a muestras hidratadas del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) en presencia de Nile Red (0,1 mol%).

### 5.1.2 Ensayos de atrapamiento

Una vez constatado que el compuesto fluorescente no afectaba al proceso de formación de la estructura de tipo L<sub>3</sub>, procedimos a examinar la capacidad de atrapamiento del Nile Red por parte del surfactante C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>. Las propiedades como colorante que presenta el Nile Red (fluoróforo/cromóforo habitualmente empleado en tinción lipídica) facilitarían que su atrapamiento se pudiese apreciar de forma visual. Este hecho quedó confirmado con la presencia de un coalescido de color rosa tras 8 h de reposo a temperatura ambiente de una dispersión 5 mM del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> en presencia de Nile Red (0,1 mol%) (Figura 17).

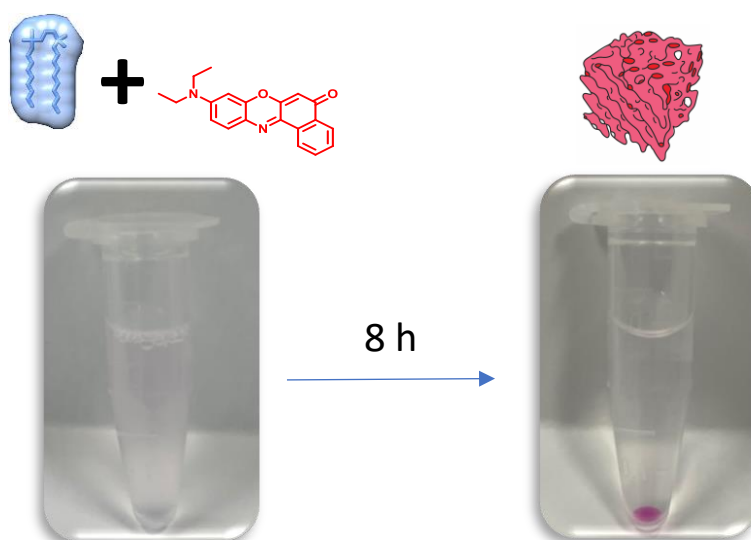


Figura 17. Coalescencia de una dispersión del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) en presencia de Nile Red (0,1 mol%).

La demostración previa de la autoagregación del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> en forma de estructura de tipo L<sub>3</sub> unido a la falta de coloración rosácea en el sobrenadante al cabo de 8 h, permitieron establecer que el coalescido rosa (Figura 17) se correspondía con la estructura tipo esponja del C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> conteniendo *Nile Red*. Este resultado pone de manifiesto que la estructura bicontinua formada por el gemini es capaz de almacenar moléculas en el interior de sus canales, reproduciendo así la compartimentalización de biomoléculas que tiene lugar en los orgánulos naturales. De este modo, se observa el potencial interés del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> como un excelente candidato para la mimetización de orgánulos celulares. En particular, creemos que la presencia de un sistema de fase no lamelar L<sub>3</sub> permitiría su utilidad como un eficaz biomimético de la estructura subcelular compleja del RE.

Habitualmente es necesaria la combinación de varios lípidos con distintas propiedades físicas para preparar estructuras de fase esponjosa (L<sub>3</sub>). Cabe destacar que, en nuestro caso particular, el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> es capaz de formar por sí solo este tipo de estructuras, sin necesidad alguna de incorporar otros lípidos.<sup>[11]</sup> Por lo tanto, el modelo establecido por el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> resulta una aproximación excelente para construir sistemas sintéticos estructuralmente complejos empleando estrategias experimentalmente sencillas.

Con respecto a los otros dos geminis bajo estudio (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>), dado que en los ensayos previos de turbidimetría y coalescencia no se apreció precipitación de los agregados, se esperaba que la adición de *Nile Red* no provocase ningún efecto adicional. Después de la hidratación de diferentes películas de geminis (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> de concentraciones finales 5 y 50 mM) en presencia de *Nile Red* (0,1 mol%) y transcurrido un tiempo de reposo de 8 h a temperatura ambiente, pudimos observar que las dispersiones resultantes permanecían de color rosáceo sin mostrar cambio alguno (Figura 18). Por lo tanto, confirmamos, al menos de forma visual, que la adición del fluoróforo no llevaba asociado ningún efecto en el comportamiento de los geminis.

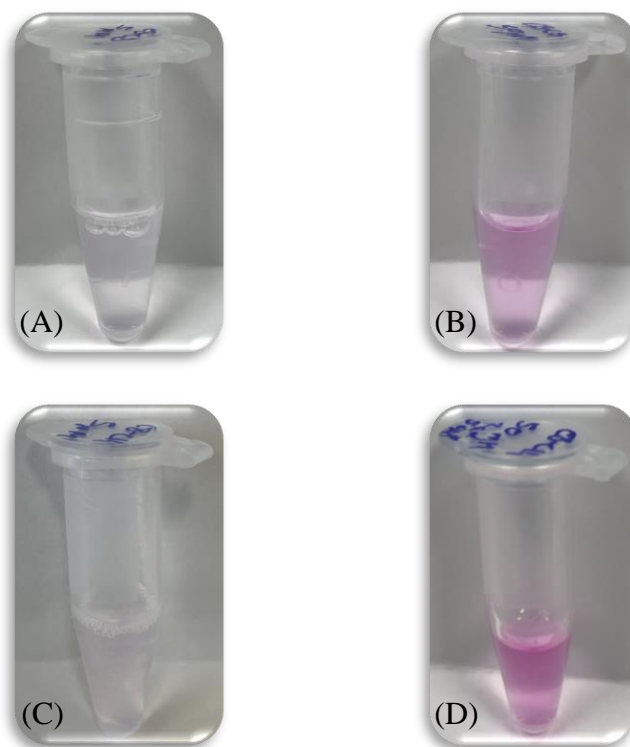


Figura 18. Estudios de autoensamblaje de los geminis zwitteriónicos  $C_8-C_8$  y  $C_8-C_{14}$ . (A) Dispersión del  $C_8-C_8$  (5 mM) y Nile Red (0,1 mol%). (B) Dispersión del  $C_8-C_8$  (50 mM) y Nile Red (0,1 mol%). (C) Dispersión del  $C_8-C_{14}$  (5 mM) y Nile Red (0,1 mol%). (D) Dispersión del  $C_8-C_{14}$  (50 mM) y Nile Red (0,1 mol%).

Partiendo de la premisa de que el  $C_8-C_8$  y  $C_8-C_{14}$  se disponen en forma de estructuras micelares y lamelares, respectivamente, podemos pensar que el carácter hidrofóbico del Nile Red facilitaría su atrapamiento en el interior de las micelas (para  $C_8-C_8$ ) o en la membrana de las vesículas (para  $C_8-C_{14}$ ).

Desafortunadamente, a nivel estrictamente visual, no se pudo discernir si el color rosado de las dispersiones de la Figura 18 es Nile Red en suspensión, atrapado por las estructuras micelares o incrustado en la membrana vesicular.

### 5.1.3 Microscopía

A continuación, procedimos al análisis de muestras hidratadas de los tres geminis en presencia de Nile Red (0,01 mol%) mediante el empleo de fluorescencia en un microscopio confocal y en uno óptico (Figura 19).

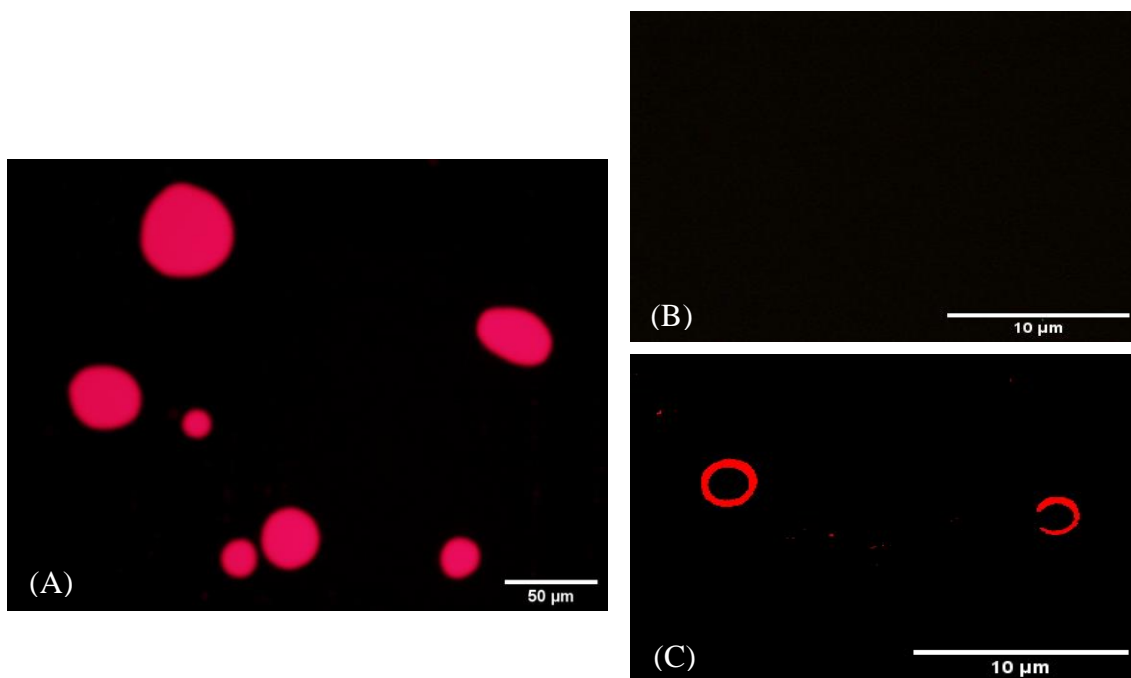


Figura 19. Microscopía de fluorescencia de las estructuras resultantes del autoensamblaje de geminis zwitteriónicos. (A) Imagen de la fase coalescida del gemini  $C_8-C_{10}$ . (B) Imagen de una dispersión del gemini  $C_8-C_8$ . (C) Imagen de una dispersión del gemini  $C_8-C_{14}$ . Excitación a 554 nm.

Los resultados obtenidos mediante microscopía nos permitieron confirmar la conclusión principal establecida en el apartado anterior en lo relativo al gemini  $C_8-C_{10}$ . De esta forma, se observó como el fluoróforo *Nile Red* se encontraba fundamentalmente atrapado en el interior de la estructura tipo esponja constituida por dicho gemini (Figura 19A). Por otra parte, el estudio de las estructuras formadas por el gemini  $C_8-C_{14}$  mostró como el *Nile Red* se localizaba exclusivamente en la membrana de dichas estructuras, corroborando así la presencia de sistemas de tipo vesicular (Figura 19 C). En cuanto al derivado  $C_8-C_8$ , no se apreció atrapado del *Nile Red* (Figura 19B) ni en el interior ni en la membrana lipídica, lo que podría considerarse como un indicativo de la presencia de estructuras micelares mínimas.

Dadas las características y la eficiencia del atrapado molecular del *Nile Red* mostradas por el surfactante  $C_8-C_{10}$ , decidimos centrar nuestros estudios en el análisis del autoensamblaje y propiedades de dicha molécula anfifílica.

Para ello, realizamos diversos ensayos con objeto de caracterizar el rango de aplicabilidad del  $C_8-C_{10}$  en lo relativo al atrapado molecular.

#### 5.1.4 Estudio de atrapado de Nile Red a diferentes concentraciones

Con el fin de examinar visualmente la máxima capacidad de atrapamiento del *Nile Red* por parte del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, se realizó un estudio de atrapado molecular variando la concentración del *Nile Red* (5-30  $\mu$ M) mientras se mantenía constante la del surfactante zwitteriónico (5 mM). Tras formación de las dispersiones acuosas gemini/*Nile Red* y subsecuente reposo de 8 h a temperatura ambiente, se observó que había coalescencia en todas las muestras analizadas, con presencia o ausencia de color rosáceo en el sobrenadante dependiendo de la concentración inicial de *Nile Red* empleada. Encontramos así ausencia de coloración rosácea en el sobrenadante para dispersiones acuosas conteniendo concentraciones de *Nile Red* iguales o inferiores a 15  $\mu$ M. Por el contrario, la presencia de coloración en el sobrenadante se observó a concentraciones de *Nile Red* iguales o superiores a 20  $\mu$ M (Figura 20). Este hecho es indicativo de que el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> no ha sido capaz de atrapar por completo al compuesto fluorescente. Por lo tanto, los resultados obtenidos mostraron un límite de saturación para el atrapamiento de *Nile Red* en el sistema de tipo esponja constituido por el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> situado entre las concentraciones de 15 y 20  $\mu$ M para dicho fluoróforo.

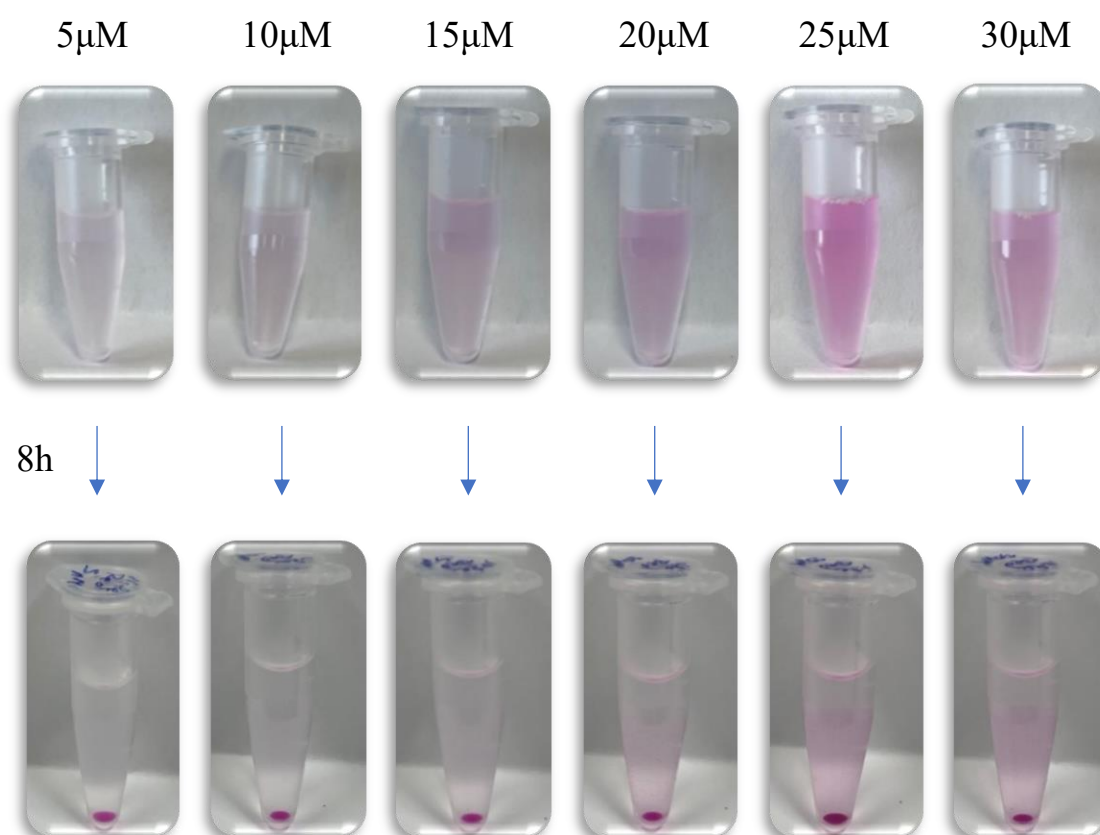


Figura 20. Ensayo de atrapado con C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) y Nile Red (5-30  $\mu$ M).

Los estudios de atrapado han permitido determinar como con tan solo una concentración inicial del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> de 5 mM es posible atrapar en el interior de la estructura resultante de su autoensamblaje concentraciones del compuesto fluorescente *Nile Red* de hasta 15 μM. De esta forma, estamos ante un sistema con una capacidad de atrapamiento molecular eficaz en un rango relativamente amplio de concentraciones. Esta característica puede resultar especialmente interesante si atendemos a aplicaciones de captación de compuestos de interés, ya sea de índole analítica o medioambiental.

#### 5.1.5 Estudio de atrapado de *Nile Red* a diferentes pHs

Analizamos a continuación la capacidad de atrapamiento del *Nile Red* por parte del sistema supramolecular formado por el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> a diferentes pHs (6,8, 7,4 y 8,0). Tras hidratación de las películas lipídicas en 1 mL de disolución 100mM de tampón HEPES al pH deseado y posterior reposo de 8 h a temperatura ambiente de las dispersiones acuosas obtenidas, pudimos observar como todas las suspensiones del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) en presencia de *Nile Red* (0,1 mol%) dieron lugar a coalescencia (Figura 21).

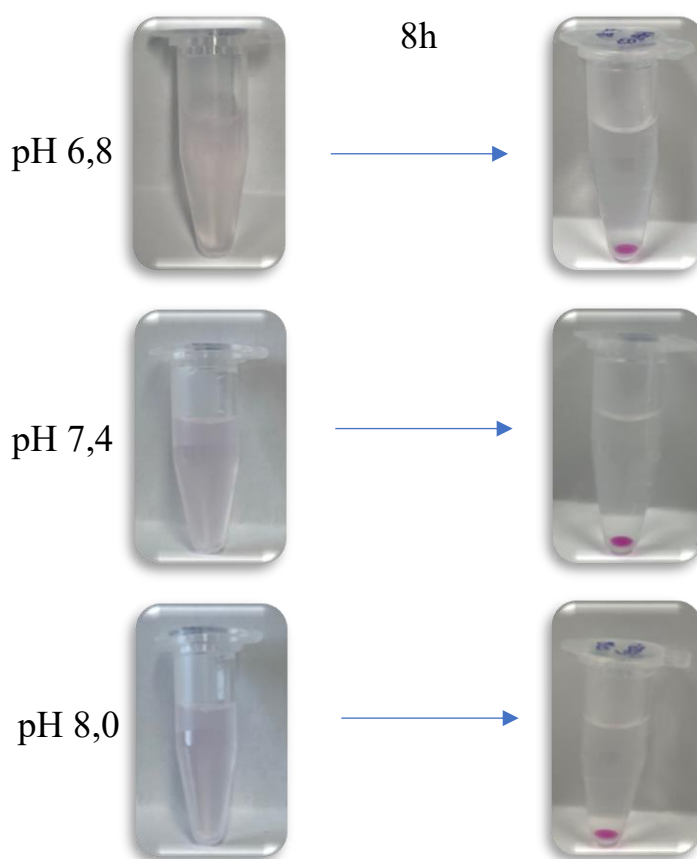


Figura 21. Ensayo de atrapado con C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) y *Nile Red* (0,1 mol%) a pH 6,8, 7,4 y 8,0.

El hecho de observar coalescencia tanto a pH ligeramente ácido, como a pH neutro (fisiológico) y pH ligeramente básico, indicó que el sistema de canales que forma la estructura de fase esponja del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> es capaz de atrapar *Nile Red* en ambientes externos diferentes, comportándose así como un sistema altamente dinámico. Este resultado es alentador en la medida en la que posiciona al gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> como un sistema con capacidad de actuación tanto a pH fisiológico -simulando así el comportamiento de un orgánulo natural- como a pH ácido y básico. De esta manera, podemos extender su rango de aplicabilidad hacia diversas metodologías de captación/eliminación de compuestos de interés.

### 5.2 Atrapado molecular selectivo

Dado que en la estructura de tipo esponja los canales nanométricos están en contacto con el agua, sería de esperar que moléculas hidrofílicas pudiesen ser incorporados en los mismos. Por lo tanto, para finalizar la caracterización de la capacidad de atrapado molecular del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, decidimos evaluar la medida en la que este surfactante era capaz de atrapar moléculas fluorescentes de tipo hidrofílico, tales como el HPTS. Para ello, se preparó inicialmente una dispersión acuosa del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) en presencia de HPTS (0,1 mol%). Tras 8 h de reposo a temperatura ambiente, se observó la presencia de la fase coalescida esperada (Figura 22). Desafortunadamente, tras excitación de la dispersión obtenida a 365 nm, se comprobó que el HPTS se encontraba parcialmente distribuído entre la fase coalescida y el sobrenadante (Figura 22).

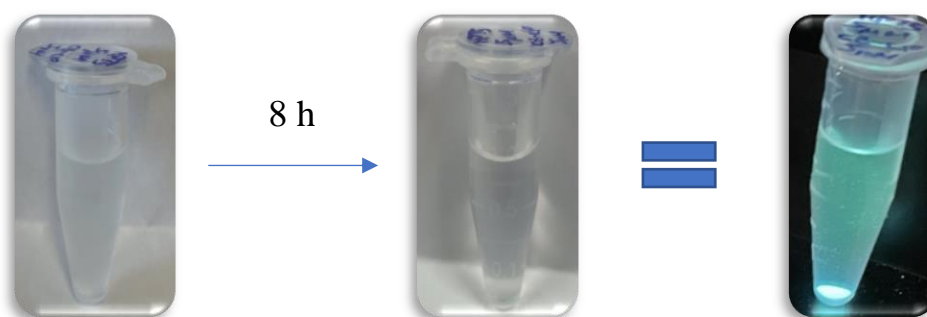


Figura 22. Coalescencia de una dispersión del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (5 mM) con HPTS (0,1 mol%).



El atrapamiento parcial de HPTS difiere del resultado encontrado en el caso del *Nile Red* (apartado 5.1.2), en el que se lograba un atrapado completo por parte del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> para la misma proporción de fluoróforo empleada (0,1 mol%).

Dado que el *Nile Red* y el HPTS presentan tamaños similares (como se puede apreciar en la Figura 15), descartamos esta característica como motivo del diferente atrapamiento. Sin embargo, si atendemos a la polaridad de ambos fluoróforos, el *Nile Red* presenta un claro carácter hidrofóbico, mientras que el HPTS es fundamentalmente hidrofílico. Este hecho nos hace pensar que nos encontramos ante un sistema de atrapamiento diferencial de moléculas en función de su polaridad. De esta manera, la utilización de sistemas basados en el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> resulta altamente interesante para lograr un control selectivo en la organización de moléculas en compartimentos.

## Conclusiones

En el presente proyecto de investigación se han sintetizado tres surfactantes zwitteriónicos (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) y se ha evaluado su autoensamblaje molecular. De esta forma, hemos podido constatar la asociación del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> en forma de una estructura de fase tipo esponja (L<sub>3</sub>), la cuál se puede considerar como un eficaz biomimético del RE.

El estudio y caracterización del modelo supramolecular constituido por C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> ha demostrado que se trata de un sistema con una capacidad de atrapamiento molecular eficaz tanto a diversas concentraciones como a diferentes pHs. Cabe resaltar la selectividad que ofrece en función de la polaridad del material incorporado en su interior. Este hecho remarca la gran aplicabilidad de este sistema en estudios sobre el origen de la vida, la replicación de ADN o la síntesis de proteínas. Este modelo lipídico podría constituir la base para la generación de una nueva clase de biorreactores, la fabricación de liberadores controlados de fármacos, el desarrollo de sistemas para la eliminación de contaminantes en aguas o el tratamiento de aguas residuales, e incluso para la reconstitución de proteínas de membrana.

Dada la gran aplicabilidad que presenta el sistema supramolecular desarrollado, resultaría interesante seguir profundizando en su investigación. Proponemos así el estudio de nuevas aproximaciones en las que se varíe la longitud de la cadena proveniente del alcohol o en las que se modifique el espaciador comprendido entre los grupos iónicos mediante su elongamiento o funcionalización. De esta forma, se podría lograr la captación/liberación de material biológico relevante, así como controlar y acelerar transformaciones bioquímicas fundamentales.

## Conclusións

Neste proxecto de investigación sintetizáronse tres surfactantes zwitteriónicos ( $C_8-C_8$ ,  $C_8-C_{10}$ ,  $C_8-C_{14}$ ) e avalíouse a súa autoensamblaxe molecular. Deste xeito, puidemos verificar a asociación dos xemelgos  $C_8-C_{10}$  en forma de estrutura de fase tipo esponxa ( $L_3$ ), que pode considerarse como un biomimético eficaz do RE.

O estudo e caracterización do modelo supramolecular constituído por  $C_8-C_{10}$  demostrou que se trata dun sistema cunha capacidade de captura molecular efectiva tanto a diferentes concentracións como a diferentes pHs. Cabe destacar a selectividade que ofrece en función da polaridade do material incorporado no seu interior. Este feito pon de manifesto a gran aplicabilidade deste sistema en estudos sobre a orixe da vida, a replicación do ADN ou a síntese de proteínas. Este modelo lipídico podería constituír a base para a xeración dunha nova clase de biorreactores, a fabricación de liberadores controladas de fármacos, o desenvolvemento de sistemas para a eliminación de contaminantes na auga ou o tratamento de augas residuais, e mesmo para a reconstitución de proteínas de membrana.

Dada a gran aplicabilidade do sistema supramolecular desenvolvido, sería interesante seguir avanzando na súa investigación. Así, propoñemos o estudo de novos enfoques nos que se varíe a lonxitude da cadea procedente do alcohol ou nos que se modifique o espaciador entre os grupos iónicos mediante o seu alongamento ou funcionalización. Deste xeito, poderíase conseguir a captación/liberación de material biolóxico relevante, así como controlar e acelerar as transformacións bioquímicas fundamentais.

## Conclusions

In this research project, three zwitterionic surfactants (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) have been synthesized and their molecular self-assembly has been evaluated. In this way, we have been able to verify the association of the gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> in the form of a sponge-like phase structure (L<sub>3</sub>), which can be considered as an effective biomimetic of the ER.

The study and characterization of the supramolecular model constituted by C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> has shown that it is a system with an effective molecular trapping capacity both at different concentrations and at different pHs. It is worth highlighting the selectivity it offers depending on the polarity of the material incorporated inside. This fact highlights the great applicability of this system in studies on the origin of life, DNA replication or protein synthesis. This lipid model could form the basis for the generation of a new class of bioreactors, the manufacture of controlled drug releasers, the development of systems for the elimination of contaminants in water or the treatment of wastewater, and even for the reconstitution of membrane proteins.

Given the great applicability of the developed supramolecular system, it would be interesting to continue furthering its research. Thus, we propose the study of new approaches in which the length of the chain coming from the alcohol is varied or in which the spacer between the ionic groups is modified by means of its elongation or functionalization. In this way, the uptake/release of relevant biological material could be achieved, as well as controlling and accelerating fundamental biochemical transformations.

## Parte experimental

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1 Reactivos

Los reactivos empleados a lo largo de este proyecto se recogen en la Tabla 1.

*Tabla 1. Reactivos dispuestos durante la experimentación.*

<b>Nombre del reactivo</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Características reseñables</b>
<b>Acetonitrilo (anhidro)</b>	99,9	Scharlau	-
<b>Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES)</b>	>98	Fluorochem	-
<b>Celita</b>	-	Thermo Scientific	-
<b>2-Cloro-1,3,2-dioxofosfolan-2-óxido</b>	>95	TCI Chemicals	Sensible al calor
<b>Cloroformo</b>	Grado HPLC	Scharlau	Estabilizado con 150 ppm de amileno
<b>9-(Dietilamino)-5H-benzo[<math>\alpha</math>]fenoxazina-5-ona (Nile Red)</b>	98	BLD Pharmatech	Fluorescente. Fotosensible
<b>Dietil éter</b>	99,5	Scharlau	Estabilizado con 7 ppm de butilhidroxitolueno (BHT)
<b>Dietil éter (anhidro)</b>	99,7	Scharlau	Estabilizado con 7 ppm de BHT
<b>N,N-dimetildecano-1-amina</b>	>95	TCI Chemicals	-
<b>N,N-dimetiloctil-1-amina</b>	>97	TCI Chemicals	-
<b>N,N-dimetiltetradecano-1-amina</b>	99,71	BLD Pharmatech	-
<b>Etanol absoluto</b>	99,9	Scharlau	-

<b>Hexano</b>	96	Scharlau	-
<b>8-Hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato de sodio (HPTS)</b>	85	BLD Pharmatech	Fluorescente
<b>1-octanol</b>	>99	TCI Chemicals	-
<b>Tetrahidrofurano (THF) (anhidro)</b>	99,8	Scharlau	Estabilizado con 250 ppm de BHT
<b>Trietilamina (anhidra)</b>	99	Fluorochem	-

## 1.2 Instrumentación empleada

Para la realización del presente proyecto se utilizaron los siguientes equipos:

-Espectrofotómetro Genesys 50 UV-Visible (Thermo Scientific).

-Microscopio confocal A1R (*Nikon*).

-Microscopio óptico Olympus BX53.

-Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 300. Este equipo se empleó para recoger los espectros de RMN de protón ( $^1\text{H}$ ) y de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) de cada uno de los productos obtenidos, empleando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). De esta manera, se pudieron elucidar sus estructuras, corroborando así la correcta preparación de los compuestos geminales  $\text{C}_8\text{-C}_8$ ,  $\text{C}_8\text{-C}_{10}$  y  $\text{C}_{10}\text{-C}_{14}$ . Los espectros de RMN se encuentran recogidos en la sección “Anexos” de esta memoria.

-Mediante el análisis por HPLC-MS (cromatografía líquida de alta eficacia-espectrometría de masas) con el equipo de cromatografía líquido-líquido con detector de masas y de diodos (PDA), (LC-MS) MSQ PLUS de Thermo Scientific, se pudieron recoger los espectros de masas de todos los productos obtenidos. Para ello, se empleó  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0,04 % TFA)- $\text{H}_2\text{O}$  (0,04 % TFA) como fase móvil (1:1) y electrospray (ESI) como fuente de ionización. Los espectros de MS se encuentran recogidos en la sección “Anexos” de esta memoria.

## 2. Procedimiento experimental

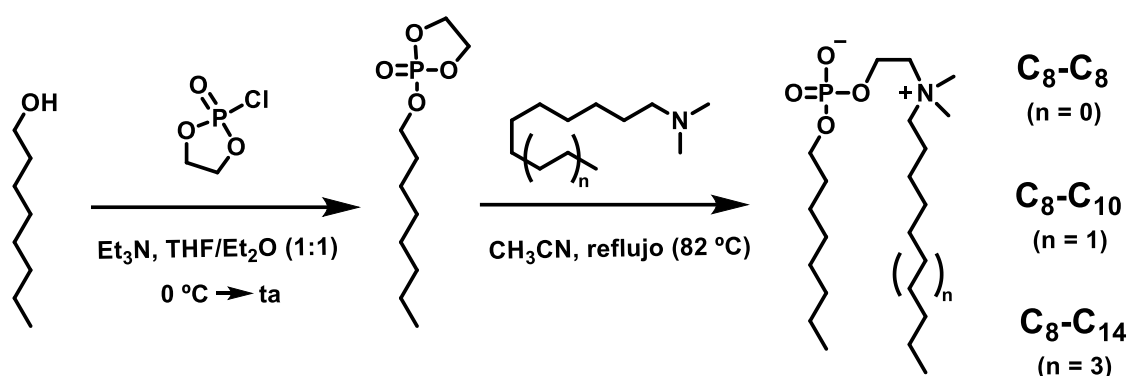


Figura 23. Esquema sintético de los geminis zwitteriónicos  $C_8-C_8$ ,  $C_8-C_{10}$  y  $C_8-C_{14}$ .<sup>[13]</sup>

La síntesis del fosfolano intermedio- $C_8$  se realizó empleando la misma metodología para los tres geminis ( $C_8-C_8$ ,  $C_8-C_{10}$ ,  $C_8-C_{14}$ ). Para ello, se preparó una disolución de 2-cloro-1,3,2-dioxafosfolan-2-óxido (0,44 mL, 4,8 mmol para  $C_8-C_8$ ; 0,50 mL, 5,4 mmol para  $C_8-C_{10}$  y  $C_8-C_{14}$ ) en THF-Et<sub>2</sub>O anhidro (1:1) (2,5 mL) a 0 °C bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub>. A continuación, se adicionó Et<sub>3</sub>N (anhidra) (0,67 mL, 4,8 mmol para  $C_8-C_8$ ; 0,76 mL, 5,4 mmol para  $C_8-C_{10}$  y  $C_8-C_{14}$ ). Posteriormente, se añadió lentamente 1-octanol (0,67 mL, 4,2 mmol para  $C_8-C_8$ ; 0,74 mL, 4,7 mmol para  $C_8-C_{10}$  y  $C_8-C_{14}$ ). La mezcla de reacción se agitó 24-48 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se agregó hexano (1,5 mL). La mezcla resultante se filtró a través de celita y se lavó con 20 mL de THF-Et<sub>2</sub>O (1:1). El filtrado resultante se evaporó a vacío, proporcionando el fosfolano  $C_8$  intermedio en forma de aceite. Dicho intermedio se empleó en la siguiente etapa sin necesidad de purificación adicional.

El intermedio  $C_8$ -fosfolano se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (anhidro) (10 mL) a temperatura ambiente. A la disolución resultante se le adicionó lentamente por goteo 2 equivalentes de la dimetilalquilamina correspondiente (1,73 mL, 8,5 mmol de *N,N*-dimetiloctil-1-amina para  $C_8-C_8$ ; 2,21 mL, 9,5 mmol de *N,N*-dimetildecano-1-amina para  $C_8-C_{10}$ ; 2,90 mL, 9,5 mmol de *N,N*-dimiltetradecano-1-amina para  $C_8-C_{14}$ ). A continuación, la mezcla se agitó a reflujo (~82 °C) durante 48-72 h. Posteriormente, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se vertió sobre 100 mL de Et<sub>2</sub>O, se filtró y se lavó con más Et<sub>2</sub>O para dar lugar al producto deseado en forma de sólido blanco.

**C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>.** Se obtuvieron 682 mg (41 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4.27 (s, 2H), 3.81 (q, *J* = 6.6 Hz, 4H), 3.52 – 3.41 (m, 2H), 3.33 (s, 6H), 1.70 (s, 2H), 1.57 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.40 – 1.16 (m, 20H), 0.87 (td, *J* = 6.8, 2.3 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 77.79, 66.19, 66.12, 65.97, 64.48, 59.39, 52.33, 32.42, 32.28, 31.67, 31.57, 30.04, 29.91, 29.87, 29.71, 26.94, 26.46, 23.41, 23.20, 23.15, 14.63, 14.59. MS (ESI). [MH]<sup>+</sup>=394.2305.

**C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>.** Se obtuvieron 692 mg (35 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4.31 (s, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.52 – 3.43 (m, 2H), 3.35 (s, 6H), 1.54 (s, 2H), 1.52 (m, 2H) 1.26 (m, 24H), 0.87 (td, *J*=6.8, 2.4 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 77.36, 65.77, 65.69, 64.16, 59.07, 59.01, 51.88, 31.99, 31.96, 31.25, 31.15, 29.58, 29.56, 29.47, 29.42, 29.38, 26.49, 26.04, 23.01, 22.78, 14.22. MS (ESI). [M<sub>2</sub>]<sup>+</sup>=843.6590.

**C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>.** Se obtuvieron 1,83g (81 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4.31 (s, 2H), 3.84 (q, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.45 (m, 2H), 3.35 (s, 6H), 1.71 (s, 2H), 1.64 – 1.53 (m, 2H), 1.25 (s, 32H), 0.87 (td, *J* = 6.7, 1.7 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 77.36, 65.80, 65.72, 64.21, 59.03, 51.88, 32.04, 31.99, 31.23, 31.13, 29.81, 29.78, 29.75, 29.67, 29.59, 29.48, 26.50, 26.04, 23.01, 22.80, 22.78, 14.23. MS (ESI). [M<sub>2</sub>]<sup>+</sup>=955.6890.

Cabe mencionar que los rendimientos calculados se corresponden con rendimientos globales (dos etapas de reacción).

### 3. Metodología experimental

#### 3.1 Disoluciones stock

Se prepararon inicialmente disoluciones stock de los compuestos gemelares sintetizados (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) a una concentración de 100 mM en CHCl<sub>3</sub>. Alternativamente, se obtuvieron disoluciones 5 mM de los fluoróforos *Nile Red* (en etanol absoluto) y HPTS (en agua).

#### 3.2 Preparación de películas lipídicas (*lipid films*)

50 μL de una disolución del gemini zwitteriónico (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>) en CHCl<sub>3</sub> (concentración final: 100 mM) se situaron inicialmente en un vial de 1,5 mL. A continuación, se evaporó el disolvente orgánico empleando una corriente de N<sub>2</sub>, obteniendo así una película fina distribuida por las paredes del vial.



### 3.3 Hidratación de películas lipídicas: Construcción de fases esponjas

Las películas lipídicas finas preparadas en el Apartado 3.2 se hidrataron añadiendo 1 mL de disolución acuosa (agua, tampón HEPES) (concentración final del gemini: 5 mM) y agitando unos segundos en el vórtex. Este protocolo generó agregados tipo fase esponja (para el gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>) y agregados tipo lamelar de menor tamaño (para los geminis C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>).

### 3.4 Turbidimetría

#### 3.4.1 Protocolo general

Se prepararon películas finas (*lipid films*) a partir de disoluciones del compuesto gemelar (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>), siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Apartado 3.2). A continuación, se hidrataron tal como se ha indicado previamente (Apartado 3.3) y se llevó a cabo el análisis de DO (600 nm) en el espectrofotómetro durante 8 h.

En el caso particular del gemelar C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, se recogieron por triplicado 32 medidas consecutivas de DO (600 nm) de dispersiones del lípido (5 mM), las cuales corresponden a medidas cada 15 min durante un tiempo final de análisis de 8 h (las medidas se encuentran en el apartado “Anexos”) en tres días diferentes. Para el caso del C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y el C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>, se realizaron diversas medidas de DO (600 nm).

#### 3.4.2 Turbidimetría en presencia de Nile Red

Las medidas de turbidimetría en presencia del compuesto fluorescente *Nile Red* se realizaron siguiendo el protocolo general (Apartado 3.4.1). Cabe destacar que en este caso, se preparó inicialmente una película fina (*lipid film*) a partir de una disolución del compuesto gemelar (C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>) y *Nile Red* (0,1 mol%), siguiendo un protocolo similar al descrito con anterioridad (Apartado 3.2). Posteriormente, se hidrató la película en agua (1 mL) y se agitó unos segundos en el vórtex, obteniendo una dispersión acuosa rosácea que contiene el gemini (concentración final: 5 mM) y el *Nile Red* (concentración final: 5 μM; 0.1 mol%). Finalmente, se llevaron a cabo 32 medidas por duplicado de DO (600 nm) en el espectrofotómetro cada 15 min a lo largo de 8 h en dos días diferentes (las medidas se encuentran en el apartado “Anexos”).

### 3.5 Ensayos de coalescencia

#### 3.5.1 Ensayo de coalescencia con *Nile Red*

Los experimentos de coalescencia se llevaron a cabo preparando películas finas (*lipids films*) en presencia de *Nile Red*, las cuales fueron hidratadas tal como se ha descrito en el apartado 3.3. Seguidamente, se permitió que las dispersiones resultantes de los tres geminis (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>, de concentración final: 5 mM) y *Nile Red* (concentración final: 5 μM; 0.1 mol%) reposasen a temperatura ambiente durante 8 h.

Cabe destacar que en el caso del C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> y del C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> también se prepararon, de forma análoga a la anterior, dispersiones de concentración final de gemini 50 mM y *Nile Red* 5 μM (0.1 mol%) que se dejaron en reposo 8 h a temperatura ambiente.

#### 3.5.2 Ensayo de coalescencia con HPTS

El ensayo de coalescencia del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> con el compuesto fluorescente HPTS se llevó a cabo empleando la misma metodología que en caso del *Nile Red*, permitiendo que la dispersión de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (de concentración final: 5 mM) y HPTS (concentración final: 5 μM; 0.1 mol%) reposase a temperatura ambiente durante 8 h.

### 3.6 Microscopía

#### 3.6.1 Microscopía de campo claro

Alicuotas de 2.5 μL correspondientes a las dispersiones acuosas de los diferentes compuestos gemelares (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>; concentración final: 5 mM) se analizaron en los microscopios confocal y óptico de campo claro. Las fotografías correspondientes se recogen en el apartado 4.3 de la sección de Discusión y Resultados, así como en la sección de Anexos.

#### 3.6.2 Microscopía de fluorescencia

Alicuotas de 2.5 μL referentes a las dispersiones acuosas de los diferentes geminis (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>; concentración final: 5 mM) conteniendo *Nile Red* (concentración final: 0.5 μM; 0,01 mol%) se analizaron en los microscopios confocal y óptico de fluorescencia. Tras la excitación del *Nile Red* a 554 nm, se tomaron varias fotografías, las cuales se recogen en el apartado 5.1.3 de la sección de Discusión y Resultados, así como en la sección de Anexos.

### 3.7 Estudio de atrapado de *Nile Red* a diferentes concentraciones

Siguiendo el protocolo de preparación de películas finas mencionado previamente (Apartado 3.2), se obtuvieron diferentes *lipid films* a partir de disoluciones del compuesto gemelar C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> (concentración fija) y *Nile Red* (concentración variante) en CHCl<sub>3</sub>. A continuación, se hidrataron en presencia de 1 mL de agua milliQ. Cabe destacar que para todas las muestras obtenidas la concentración final de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> fue 5 mM, mientras que la de *Nile Red* varió entre 5-30 μM. Una vez preparadas las dispersiones, se dejaron reposar durante 8 h a temperatura ambiente, pudiendo visualizar finalmente la formación y coalescencia de las correspondientes fases de esponja, así como el atrapado efectivo del fluoróforo. De esta forma, se pudo estimar la concentración máxima de *Nile Red* (en torno a 20 μM) que es posible atrapar en los sistemas supramoleculares generados.

### 3.8 Estudio de atrapado de *Nile Red* a diferentes pHs

Se prepararon películas finas (*lipid films*) a partir de disoluciones del compuesto gemelar C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> y *Nile Red* en CHCl<sub>3</sub>, siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Apartado 3.2). A continuación, se hidrataron en presencia de 1 mL de disolución tampón 100 mM de HEPES a diferentes pHs (6,8, 7,4 y 8,0). En todos los casos, la concentración final de la molécula anfifílica fue 5 mM, mientras que la del fluoróforo fue 5 μM (0,1 mol%). Tras dejar reposar las dispersiones durante 8 h, se observó por visualización directa la formación y coalescencia de las correspondientes fases de esponja, así como el correspondiente atrapado de *Nile Red*.

## Anexos

### Tablas

Tabla 2. Cálculos de cantidades relativas a la síntesis del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>.

Nº	Sustancia	Peso Molecular	g	mmol	Eq.	ρ (g/mL)	mL
1	2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido	142.48	0.68	4.8	1.15	1.55	0.44
2	THF (anhydro)	-	-	-	-	-	1.25
3	Et <sub>2</sub> O (anhydro)	-	-	-	-	-	1.25
4	Et <sub>3</sub> N	101.19	0.49	4.8	1.15	0.726	0.67
5	1-octanol	130.23	0.55	4.2	1.00	0.83	0.67
6	N,N-dimetiloctil-1-amino	157.30	1.33	8.5	2.00	0.769	1.73
7	CH <sub>3</sub> CN (anhydro)	-	-	-	-	-	10
8	Producto	393.54	1.65	4.2	1.00	-	-

Tabla 3. Cálculos de cantidades relativas a la síntesis del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>.

Nº	Sustancia	Peso Molecular	g	mmol	Eq.	ρ (g/mL)	mL
1	2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido	142,48	0,78	5,4	1,15	1,55	0,50
2	THF (anhidro)	-	-	-	-	-	1,25
3	Et <sub>2</sub> O (anhidro)	-	-	-	-	-	1,25
4	Et <sub>3</sub> N	101,19	0,55	5,4	1,15	0,726	0,76
5	1-octanol	130,23	0,62	4,7	1,00	0,83	0,74
6	N,N-dimetildecano-1-amina	185,36	1,75	9,5	2,00	0,792	2,21
7	CH <sub>3</sub> CN (anhidro)	-	-	-	-	-	10
8	Producto	421,60	1,99	4,7	1,00	-	-

Tabla 4. Cálculos de cantidades relativas a la síntesis del gemini C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>.

Nº	Sustancia	Peso Molecular	g	mmol	Eq.	ρ (g/mL)	mL
1	2-cloro-1,3,2-dioxafosfolano-2-óxido	142.48	0.78	5.4	1.15	1.55	0.50
2	THF (anhidro)	-	-	-	-	-	1.25
3	Et <sub>2</sub> O (anhidro)	-	-	-	-	-	1.25
4	Et <sub>3</sub> N	101.19	0.55	5.4	1.15	0.726	0.76
5	1-octanol	130.23	0.62	4.7	1.00	0.83	0.74
6	N,N-dimetiltetradecan-1-amino	241.46	2.29	9.5	2.00	0.795	2.89
7	CH <sub>3</sub> CN (anhidro)	-	-	-	-	-	10
8	Producto	477.71	2.25	4.7	1.00	-	-

# Espectros

## Espectros de RMN de C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>

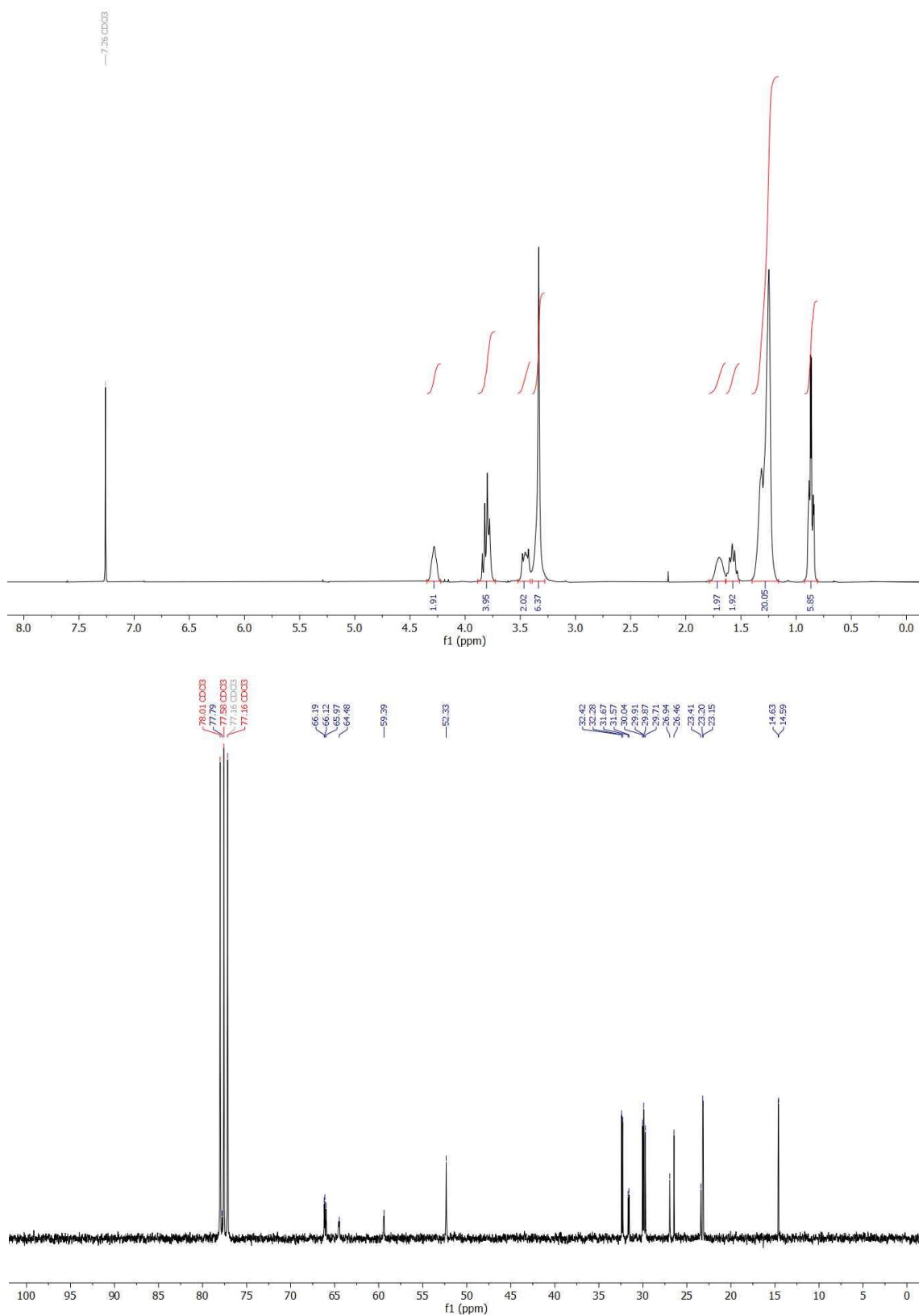


Figura 24. Espectros de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN del C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>.

# Espectros de RMN de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>

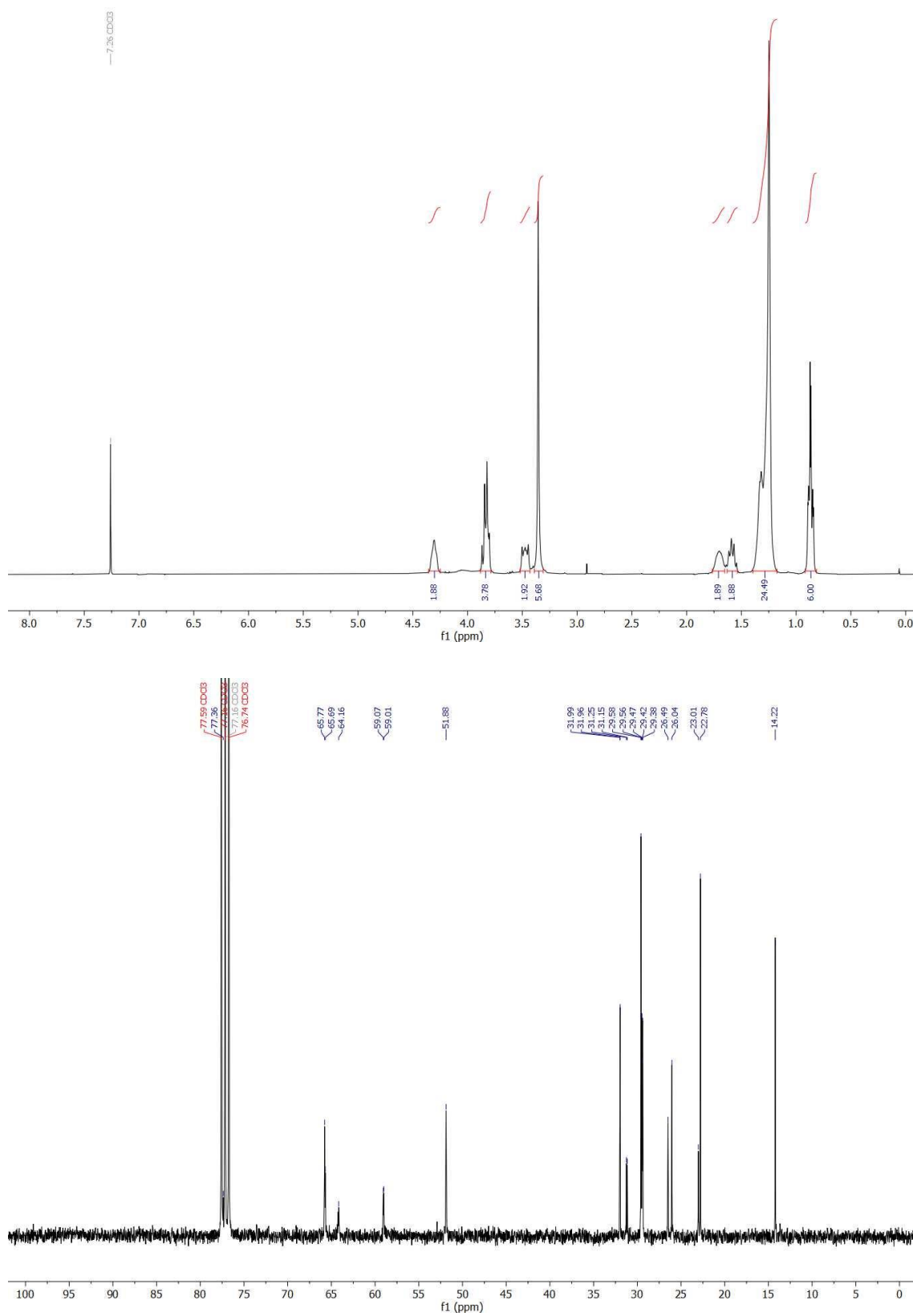


Figura 25. Espectros de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN del C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>.

# Espectros de RMN de C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>

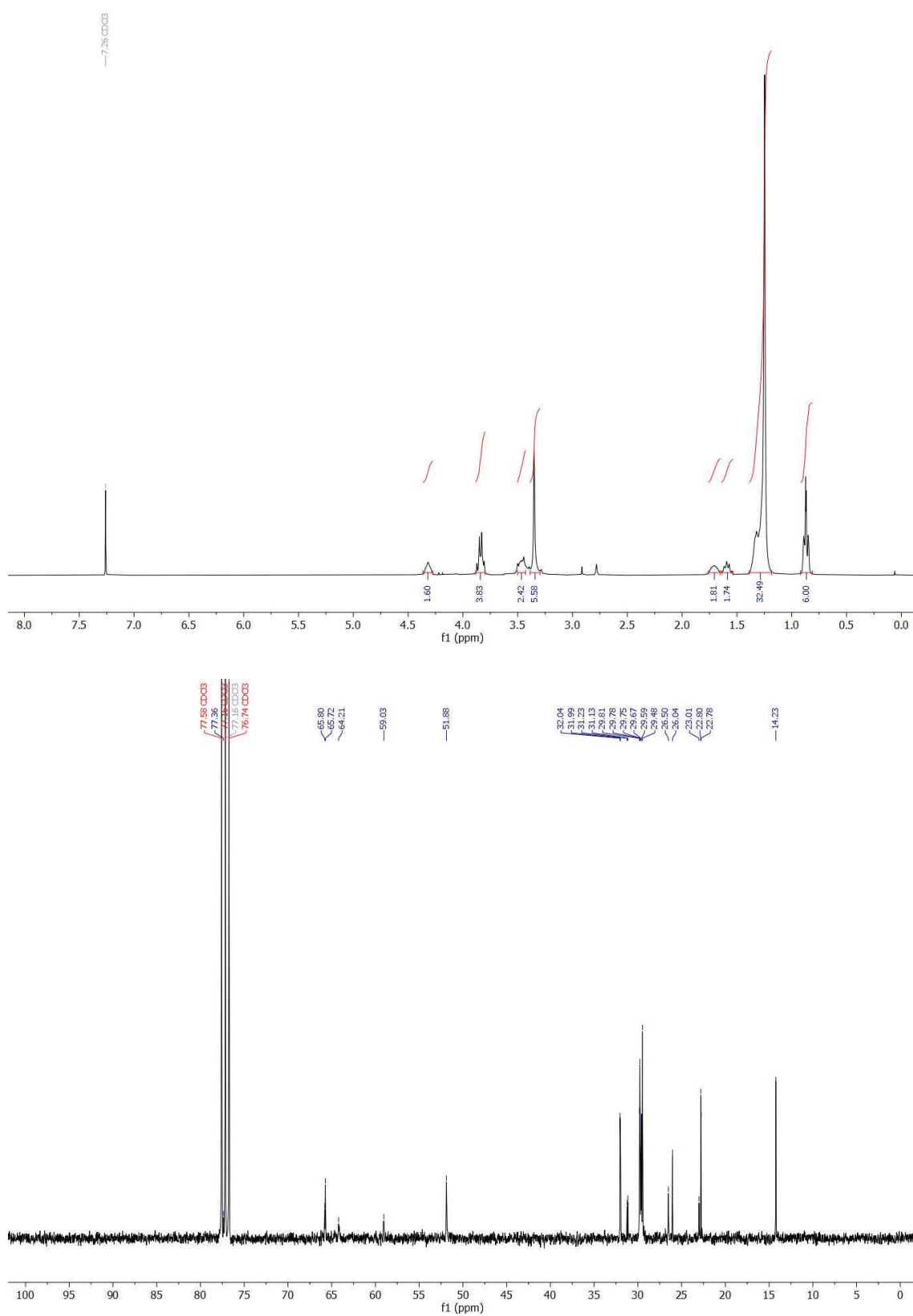
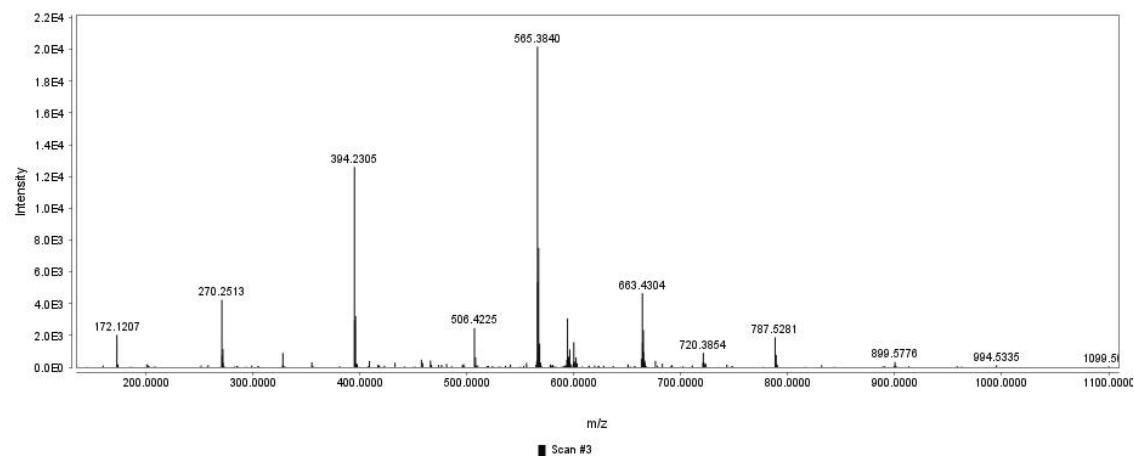
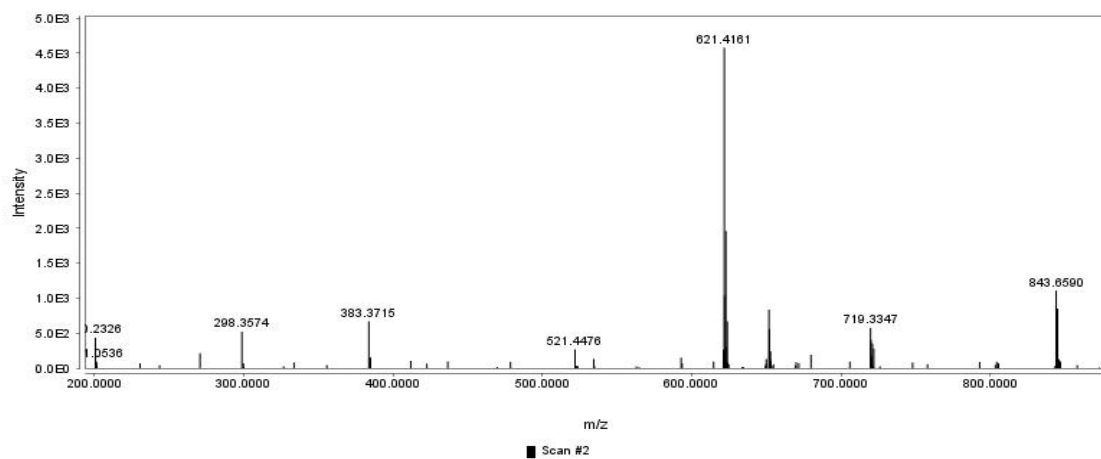


Figura 26. Espectros de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN del C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>.

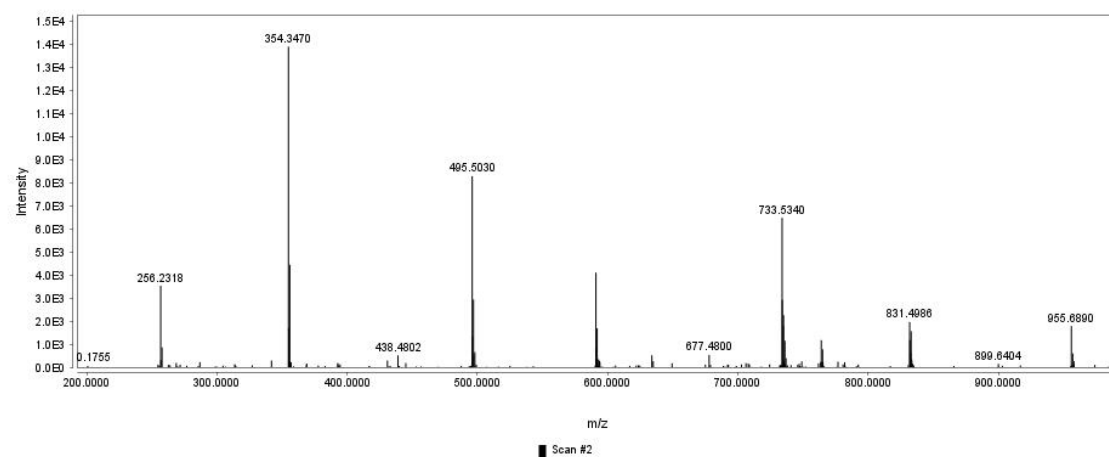
### Espectro de masas de C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>



### Espectro de masas de C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>



### Espectro de masas de C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub>





## Datos de densidad óptica (DO)

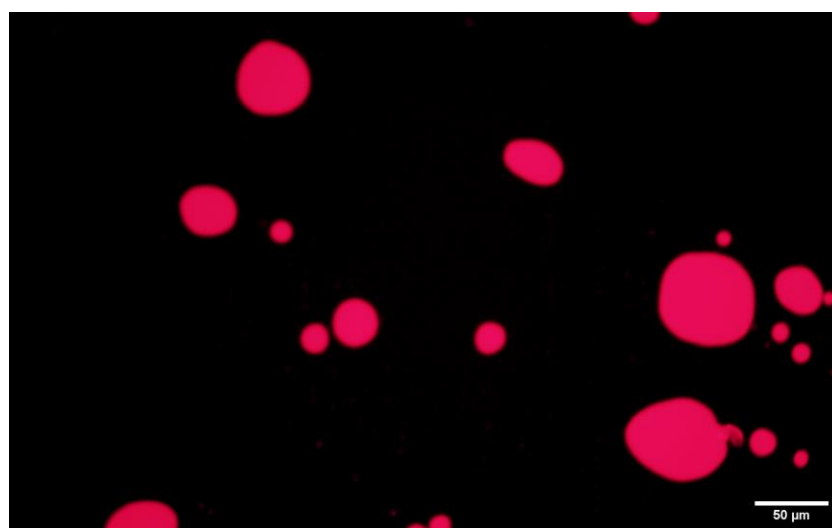
Tabla 5. Datos de DO de tres dispersiones acuosas de  $C_8$ - $C_{10}$  (5 mM).

Tiempo (min)	DO (600nm)	DO (600nm)	DO (600nm)	SD
0	0,504	0,475	0,559	0,042665365
15	0,493	0,465	0,558	0,047710935
30	0,478	0,453	0,546	0,048128301
45	0,459	0,439	0,527	0,04613025
60	0,443	0,427	0,510	0,044034078
75	0,413	0,418	0,491	0,043661577
90	0,399	0,405	0,475	0,042253205
105	0,384	0,395	0,463	0,042790186
120	0,367	0,383	0,445	0,041198705
135	0,348	0,371	0,429	0,041741267
150	0,318	0,357	0,418	0,05040172
165	0,288	0,348	0,416	0,064041653
180	0,280	0,338	0,406	0,063066103
195	0,264	0,329	0,391	0,063505905
210	0,253	0,323	0,378	0,06264982
225	0,244	0,313	0,348	0,052918176
240	0,236	0,302	0,335	0,050408333
255	0,225	0,290	0,326	0,051189192
270	0,216	0,281	0,321	0,05299371
285	0,209	0,271	0,321	0,056107041
300	0,200	0,263	0,312	0,056145644
315	0,187	0,256	0,303	0,058346665
330	0,168	0,253	0,295	0,06470188
345	0,153	0,235	0,285	0,066643329
360	0,135	0,228	0,275	0,071248392
375	0,132	0,223	0,264	0,06755985
390	0,110	0,219	0,253	0,074706091
405	0,101	0,216	0,242	0,075035547
420	0,095	0,213	0,233	0,074574348
435	0,092	0,211	0,225	0,073082146
450	0,094	0,208	0,218	0,06888638
465	0,094	0,204	0,213	0,066259591

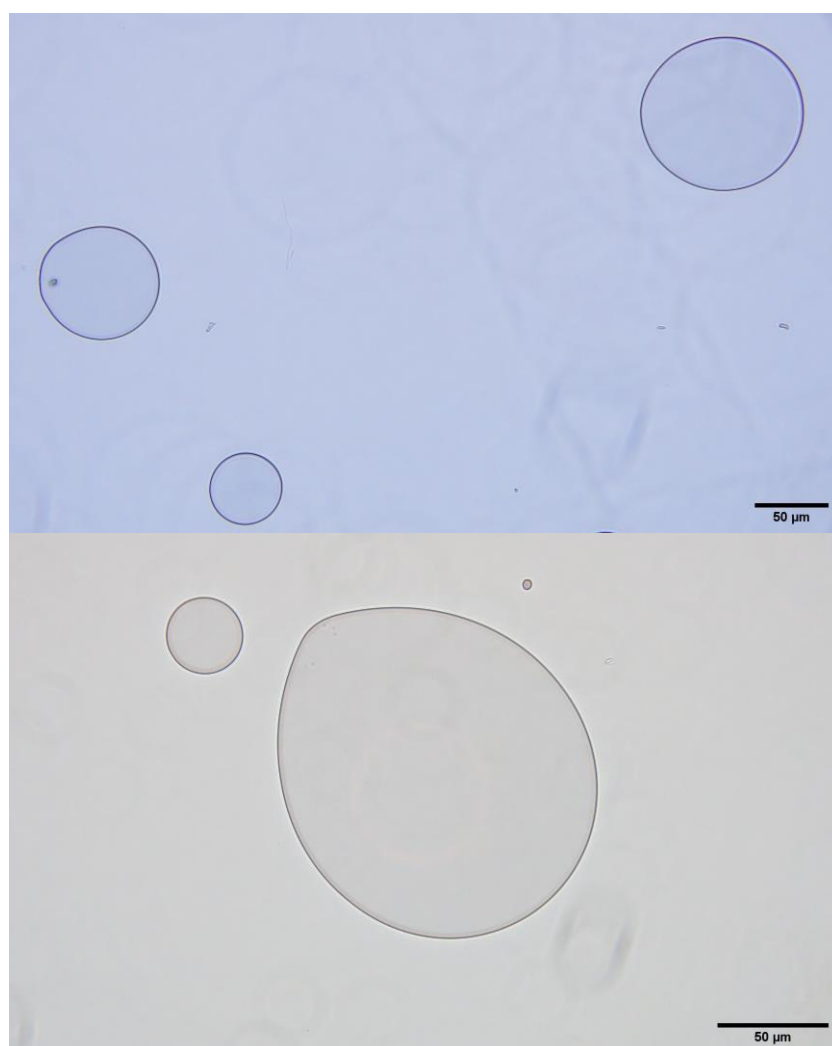
Tabla 6. Datos de DO de dos dispersiones acuosas de  $C_8-C_{10}$  (5 mM) y Nile Red (0,1 mol%).

Tiempo (min)	DO (600nm)	DO (600nm)	SD
0	0,532	0,478	0,038183766
15	0,513	0,458	0,038890873
30	0,490	0,435	0,038890873
45	0,465	0,410	0,038890873
60	0,443	0,391	0,036769553
75	0,419	0,375	0,031112698
90	0,404	0,357	0,033234019
105	0,387	0,341	0,032526912
120	0,374	0,327	0,033234019
135	0,357	0,315	0,029698485
150	0,340	0,301	0,027577164
165	0,331	0,291	0,028284271
180	0,316	0,279	0,026162951
195	0,307	0,267	0,028284271
210	0,296	0,258	0,026870058
225	0,286	0,243	0,030405592
240	0,278	0,238	0,028284271
255	0,267	0,227	0,028284271
270	0,256	0,214	0,029698485
285	0,244	0,207	0,026162951
300	0,231	0,201	0,021213203
315	0,218	0,193	0,01767767
330	0,207	0,185	0,015556349
345	0,196	0,177	0,013435029
360	0,188	0,170	0,012727922
375	0,189	0,162	0,019091883
390	0,190	0,155	0,024748737
405	0,177	0,149	0,01979899
420	0,172	0,147	0,01767767
435	0,167	0,141	0,018384776
450	0,162	0,136	0,018384776
465	0,159	0,129	0,021213203

## Fotografías de microscopía



*Figura 27. Microscopía de fluorescencia de las estructuras resultantes del autoensamblaje del gemini  $C_8-C_{10}$  (5 mM) en presencia de Nile Red (0,1 mol%).*



*Figura 28. Microscopía óptica de la fase coalescida del gemini  $C_8-C_{10}$  (5 mM).*

## Bibliografía

- [1] Berger, M. (3 de agosto de 2015). A facile process for the vertical orientation of block copolymer nanodomains. *Nanowerk*. Recuperado el 13 de junio de 2022, de <https://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=40942.php>
- [2] Bhattacharya, A., & Brea, R. J. (2020). Supramolecular assembly and mesophase behavior of glycopyranose-derived single-chain amphiphiles. *American Chemical Society*, 1355, 15-30. <https://doi.org/10.1021/bk-2020-1355.ch002>
- [3] Bhattacharya, A., Brea, R. J., & Devaraj, N. K. (2017). *De novo* vesicle formation and growth: an integrative approach to artificial cells. *Chemical Science*, 8(12), 7912-7922. <https://doi.org/10.1039/C7SC02339A>
- [4] Bhattacharya, A., Brea, R. J., Song, J.-J., Bhattacharya, R., Sinha, S. K., & Devaraj, N. K. (2019). Single-chain  $\beta$ -D-glycopyranosylamides of unsaturated fatty acids: self-assembly properties and applications to artificial cell development. *The Journal of Physical Chemistry B*, 123(17), 3711-3720. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b01055>
- [5] Bhattacharya, A., Niederholtmeyer, H., Podolsky, K. A., Bhattacharya, R., Song, J.-J., Brea, R. J., Tsai, C.-H., Sinha, S. K., & Devaraj, N. K. (2020). Lipid sponge droplets as programmable synthetic organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(31), 18206-18215. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004408117>
- [6] Fagone, P., & Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research*, 50, S311-S316. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>
- [7] González-Rubio, S., Ballesteros-Gómez, A., García-Gómez, D., & Rubio, S. (2022). Double-headed amphiphile-based sponge droplets: synthesis, characterization and potential for the extraction of compounds over a wide polarity range. *Talanta*, 239, 123108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123108>
- [8] Iqbal, S., Blenner, M., Alexander-Bryant, A., & Larsen, J. (2020). Polymersomes for therapeutic delivery of protein and nucleic acid macromolecules: from design to therapeutic applications. *Biomacromolecules*, 21(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01754>
- [9] Kulkarni, C. V. (2012). Lipid crystallization: from self-assembly to hierarchical and biological ordering. *Nanoscale*, 4(19), 5779. <https://doi.org/10.1039/c2nr31465g>
- [10] Menger, F. M., & Littau, C. A. (1991). Gemini-surfactants: synthesis and properties. *American Chemical Society*, 113(4), 1451-1452. <https://doi.org/10.1021/ja00004a077>
- [11] Moinpour, M., Fracassi, A., Brea, R. J., Salvador-Castell, M., Pandey, S., Edwards, M. M., Seifert, S., Joseph, S., Sinha, S. K., & Devaraj, N. K. (2022). Controlling protein enrichment in lipid sponge phase droplets using SNAP-Tag bioconjugation. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100624>

- [12] National Human Genome Research Institute. (s. f.). Organelo. Genome.gov. Recuperado el 31 de enero de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Organelo>
- [13] Peresykin, A. V., & Menger, F. M. (1999). Zwitterionic geminis. Coacervate formation from a single organic compound. *Organic Letters*, *1*(9), 1347-1350. <https://doi.org/10.1021/ol990205g>
- [14] Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado. (s. f.). Proyecto Biosfera. Ministerio de Educación y Formación Profesional. Recuperado el 31 de enero de 2022, de <http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/4ESO/seruni-pluricelulares/contenidos5.htm>
- [15] Roodbeen, R., & van Hest, J. C. M. (2009). Synthetic cells and organelles: compartmentalization strategies. *BioEssays*, *31*(12), 1299-1308. <https://doi.org/10.1002/bies.200900106>
- [16] Seoane, A., Brea, R. J., Fuertes, A., Podolsky, K. A., & Devaraj, N. K. (2018). Biomimetic generation and remodeling of phospholipid membranes by dynamic imine chemistry. *American Chemical Society*, *140*(27), 8388-8391. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04557>
- [17] Simmel, F. C. (2019). Synthetic organelles. *Emerging Topics in Life Sciences*, *3*(5), 587-595. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190056>
- [18] Ugrinic, M., deMello, A., & Tang, T.-Y. D. (2019). Microfluidic tools for bottom-up synthetic cellularity. *Chem*, *5*(7), 1727-1742. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.03.012>