



Máster Universitario en Investigación Química y Química Industrial

Memoria de Trabajo de Fin de Máster

***Fabricación de células artificiales
funcionales***
***Fabricación de células artificiais
funcionais***
***Fabrication of functional artificial
cells***

Leticia Meralis Jazmín Herrera

Director: Roberto Javier Brea Fernández

Curso 2021/2022

Convocatoria de Septiembre

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ayudarme en todo momento y siempre estar conmigo, por darme las fuerzas para seguir y nunca perder la fe.

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (MESCYT) de mi país, República Dominicana. Gracias por darme la oportunidad de obtener una beca de máster para mi desarrollo personal, profesional y científico. Sin su ayuda nada de esto sería posible, gracias por confiar en mí.

Al laboratorio de investigación Biomimetic Membrane Chemistry (BioMemChem). En particular, a mi tutor Roberto Javier Brea, gracias por su paciencia, dedicación y ayudarme a aclarar todas mis dudas, orientándome de la mejor manera.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres, Oneida Herrera y José Francisco Jazmín, por su apoyo y cariño incondicional, por los valores que me han enseñado y motivarme junto a mis hermanas a cumplir mis metas, los quiero.

A mis amigos y compañeros. Gracias, ustedes han sido un gran apoyo para mí, dándome fuerzas para seguir y ayudándome en todo momento. En especial, gracias a Rafhali Solís, Rikelvi Fermín, y Luis García Tirado por emprender conmigo este camino, ayudarme y ser los mejores compañeros que habría podido desear, que con su apoyo incondicional me ha ayudado a cumplir esta meta.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

DIEA: *N,N*-Diisopropiletilamina

DMAP: 4-Dimetilaminopiridina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDC·HCl: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EM: Espectrometría de masas

ESI: Ionización por electrospray

h: Hora

H-Dap-OH·HCl: Clorhidrato de ácido 2,3-diaminopropiónico

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

Hz: Hercios

J: Constante de acoplamiento

m: Multiplete

M: Molar

MeOH: Metanol

MESNA: 2-Mercaptoetanosulfonato de sodio

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

μm: Micrómetro

μmol: Micromol

m/z: Relación masa-carga

PB: Tampón fosfato (*Phosphate buffered*)

RMN: Resonancia magnética nuclear

t: Triplete

ta: Temperatura ambiente

t_R: Tiempo de retención

CRONOGRAMA

EN.	FEBR.	MZO.	ABR.	MY.	JUN.	JUL.

Búsqueda bibliográfica	
Síntesis de los compuestos	
Caracterización de los compuestos	
Redacción de la memoria	
Análisis y discusión de los resultados	

RESUMEN

La fabricación de células artificiales proporciona una poderosa estrategia para reconstruir numerosos procesos biológicos, organizar reacciones (bio)químicas en compartimentos únicos y vislumbrar como la vida surgió en la Tierra. Uno de los mayores desafíos para la fabricación de células sintéticas es el requerimiento de métodos sencillos que imiten a la perfección cómo las células naturales son generadas. Por lo tanto, cobra un enorme interés el desarrollo de estrategias químicas innovadoras que permitan la formación de células artificiales funcionales. En el presente Trabajo de Fin de Máster se ha desarrollado una ambiciosa metodología para la fabricación de nuevos modelos de células sintéticas basada en la preparación mediante aminólisis directa de conjugados anfifílicos aminoácido-lípido, los cuales se autoensamblan espontáneamente en vesículas biomiméticas de la membrana celular. Dicha metodología resulta especialmente poderosa como herramienta para el establecimiento de compartimentos únicos que faciliten el transporte de fármacos, la reconstitución de proteínas y la expresión de biomoléculas. Estos estudios ofrecen nuevos conocimientos sobre la naturaleza de los sistemas vivos y el origen de la vida celular.

Palabras clave: célula artificial, membrana, biomimético, aminólisis, autoensamblaje.

RESUMO

A fabricación de células artificiais proporciona unha poderosa estratexia para reconstruir numerosos procesos biolóxicos, organizar reaccións (bio)químicas en compartimentos únicos e vislumbrar como a vida surtiu na Terra. Un dos maiores desafíos para a fabricación de células sintéticas é o requerimento de métodos sinxelos que imiten á perfección como as células naturais son xeradas. Polo tanto, cobra un enorme interese o desenvolvemento de estratexias químicas innovadoras que permitan a formación de células artificiais funcionais. No presente Traballo de Fin de Máster desenvólvese unha ambiciosa metodoloxía para a fabricación de novos modelos de células sintéticas baseada na preparación mediante aminólisis directa de conxugados anfifílicos aminoácido-lípido, os cales autoensámblanse espontaneamente en vesículas biomiméticas da membrana celular. Dita metodoloxía resulta especialmente poderosa como ferramenta para o establecemento de compartimentos únicos que faciliten o transporte de fármacos, a reconstitución de proteínas e a expresión de biomoléculas. Estes estudos ofrecen novos coñecementos sobre a natureza dos sistemas vivos e o orixe da vida celular.

Palabras chave: célula artificial, membrana, biomimético, aminólisis, autoensamblaxe.

ABSTRACT

The fabrication of artificial cells provides a powerful strategy to reconstruct numerous biological processes, organize (bio)chemical reactions into unique compartments, and shed light on how life emerge on Earth. One of the biggest challenges for making synthetic cells is the requirement for simple methods that perfectly mimic how natural cells are generated. Therefore, the development of innovative chemical strategies that allow the formation of functional artificial cells is of great interest. In this Master's Thesis, an ambitious methodology has been developed for the fabrication of new synthetic cell models based on the preparation by direct aminólisis of amphiphilic amino acid-lipid conjugates, which spontaneously self-assemble into biomimetic vesicles of the cell membrane. This methodology is especially powerful as a tool for the establishment of unique compartments that facilitate the transport of drugs, the reconstitution of proteins, and the expression of biomolecules. These studies offer new insights into the nature of living systems and the origin of cellular life.

Keywords: artificial cell, membrane, biomimético, aminólisis, self-assembly.

ÍNDICE

Agradecimientos

Abreviaturas

Cronograma

Resumen/Resumo/Abstract

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes históricos	1
1.2. Células artificiales.....	2
1.3. Métodos para la construcción de células artificiales	3
1.3.1. Método de arriba hacia abajo (<i>top-down</i>)	4
1.3.2. Método de abajo hacia arriba (<i>bottom-up</i>).....	4
1.4. Tipos de células artificiales	5
1.4.1. Liposomas o vesículas.....	5
1.4.2. Vesículas de ácidos grasos	5
1.4.3. Polimerosomas.....	6
1.4.4. Gotas lipídicas.....	6
1.4.5. Coloidosomas.....	6
1.4.6. Coacervados	7
1.5. Aplicaciones de las células artificiales	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
3.1. Estrategia general.....	10
3.2. Síntesis y caracterización	10
3.2.1. Preparación de tioésteres.....	10

3.2.2. Formación de conjugados aminoácido-lípido por aminólisis directa.....	11
3.3. Estudios de microscopía	15
4. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS	18
5. SECCIÓN EXPERIMENTAL	21
5.1. Materiales y métodos.....	21
5.1.1. Condiciones generales	21
5.1.2. Reactivos, disolventes y otros.....	21
5.1.3. Técnicas instrumentales	23
5.2. Procedimientos experimentales.....	25
5.2.1. Síntesis de tioésteres de MESNA	25
5.2.2. Reacción de aminólisis directa en agua	27
6. BIBLIOGRAFIA	29
7. ANEXOS.....	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos

El descubrimiento de la célula está estrechamente relacionado con la fabricación y perfeccionamiento de los primeros microscopios. Esto es debido fundamentalmente a que la mayoría de las estructuras biológicas tienen dimensiones menores al poder de resolución del ojo humano, que es del orden de 0.1 mm (100 μm), por lo que se necesitaban técnicas adecuadas capaces de lograr su visualización.¹

La célula fue descubierta por Robert Hooke en el año 1665. Este científico inglés empleó un microscopio primitivo que el mismo había construido, siendo así capaz de observar en el corcho unidades que se repetían a modo de celdillas a las que llamó células (Figura 1).

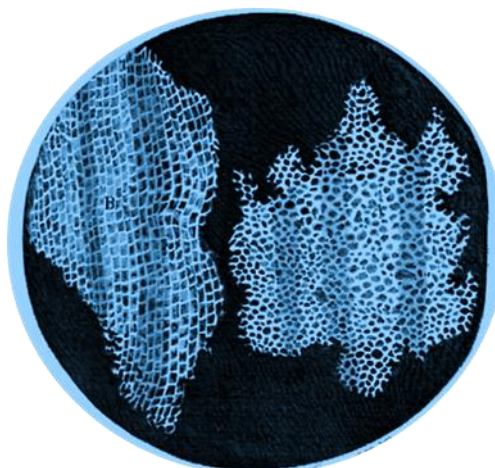


Figura 1. Células de corcho observadas por el científico Robert Hooke.

A partir de este descubrimiento, se pudo comprobar que las células estaban presentes en todos los organismos vivos, tanto animales como vegetales, por lo que su estudio resultaba de suma importancia para comprender el funcionamiento de dichos organismos.²

La teoría celular, postulada en el año 1839 por Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann, estableció que la célula es la unidad estructural y funcional básica de todos los organismos vivos conocidos. Por lo tanto, el funcionamiento vital de los sistemas vivos deriva de las actividades de todas las células que trabajan en coordinación. Este hecho convierte a la célula en un modelo extremadamente relevante para llevar a

cabo investigaciones biológicas reseñables en múltiples y diversas áreas, tales como el estudio del origen de la vida, el transporte de fármacos, la biotecnología y la construcción de microreactores bioquímicos. Además, adquiere un especial interés en la biología sintética, cuyos pilares fundamentales se encuentran relacionados con la construcción de células artificiales.²

El término biología sintética fue utilizado por primera vez por Barbara Hobon, quien lo empleó para referirse a bacterias que fueron cambiadas genéticamente mediante ADN recombinante. De esta manera, la biología sintética fue considerada como un sinónimo de la bioingeniería, ya que las bacterias son sistemas vivos (biológicos) alterados genéticamente por la intervención humana (sintético).³

Durante las últimas décadas, Eric Kool y otros investigadores han empleado el término "biología sintética" para referirse a la síntesis de moléculas artificiales que pueden ser utilizadas en sistemas biológicos.⁵ Este hecho expandió enormemente su empleo, resultando clave para el crecimiento y desarrollo de las células artificiales.⁴

El doctor Thomas Chang fue el primero en proponer el concepto de células artificiales en 1957. Teniendo en cuenta investigaciones previas, fue capaz de construir las primeras células sintéticas de tamaño micrométrico constituidas por *nylon* o proteínas reticuladas, las cuales contenían en su interior material biológico relevante, fundamentalmente proteínas funcionales (enzimas y hemoglobina).⁵ Este trabajo ha sido considerado un referente para la fabricación de modelos sintéticos funcionales que mimeticen con precisión la actividad celular.

1.2. Células artificiales

Las células artificiales, células sintéticas o protocélulas, se pueden definir como sistemas (bio)químicos que están basados generalmente en vesículas membranosas constituidas por microcompartimentos definidos, las cuales encierran un conjunto de moléculas relevantes, que pueden reaccionar entre ellas a través de procesos (bio)químicos.⁶

Los avances en las investigaciones sobre células sintéticas han permitido lograr un mayor entendimiento sobre el origen de la vida y especialmente entender qué se requiere para estar vivo.⁷

Un enorme desafío para la biología sintética es la construcción de células artificiales vivas, es decir, células artificiales autosuficientes, capaces de dividirse, evolucionar y morir. A pesar de los numerosos avances logrados a lo largo de las últimas décadas, todavía no se ha podido crear una célula viva completamente funcional a partir de materiales inanimados. Sin embargo, estos sistemas sintéticos han surgido como un ejemplo de células primitivas que permiten elucidar procesos biológicos sencillos y vislumbrar cómo surgió la vida a partir de unidades moleculares mínimas.⁸

1.3. Métodos para la construcción de células artificiales

Existen dos métodos fundamentales para la construcción de células artificiales desde el punto de vista de la ingeniería sintética: un método de arriba hacia abajo (*top-down*) y un método de abajo hacia arriba (*bottom-up*) (Figura 2).

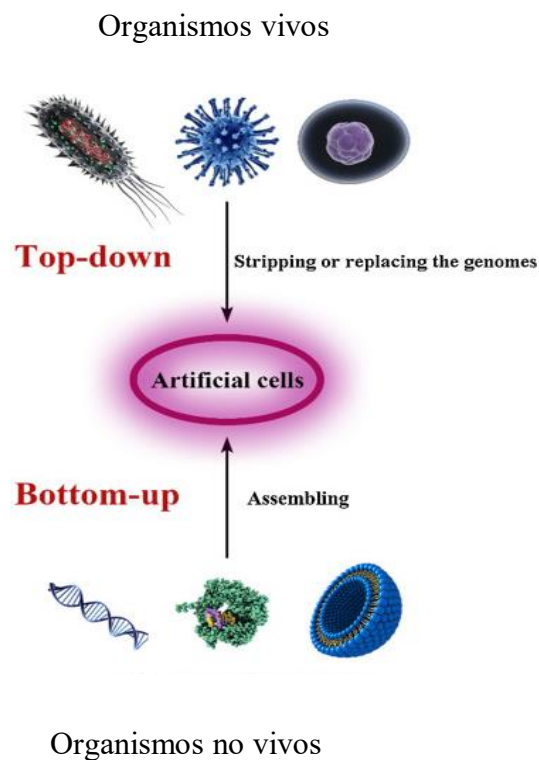


Figura 2. Síntesis de células artificiales [Adaptado de Xu, C. *et al.* 2016].⁸

1.3.1. Método de arriba hacia abajo (*top-down*)

El método de arriba hacia abajo se basa en la construcción de células artificiales a partir de un organismo vivo. Inicialmente, se le extrae parte de su genoma y se incorpora en un ensamblaje adecuado, lo que da como resultado una célula mínima con el número de genes necesarios para llevar a cabo las funciones esenciales de la vida.⁸

Una investigación realizada por Gibson *et al.* reveló que la bacteria *Mycoplasma genitalium* contenía únicamente 517 genes, resultando así en uno de los organismos vivos conocidos más simples.⁹ Este descubrimiento sirvió como base para el desarrollo de células mínimas a las cuales se le eliminaron genes no esenciales. De esta manera, se pudo conocer qué cantidad de genes eran necesarios para mantener viva una célula, pudiendo ésta desempeñar sus funciones de forma apropiada.

En la actualidad, sólo han sido desarrollados virus y bacterias como organismos mínimos. En el caso particular de las células eucariotas mínimas, aún no se han podido desarrollar con éxito modelos adecuados debido a su complejo genoma.⁸

1.3.2. Método de abajo hacia arriba (*bottom-up*)

El método de abajo hacia arriba se basa en la construcción de células artificiales partiendo desde cero, a partir de materiales sencillos, los cuales se pueden considerar como bloques de construcción.

La fabricación de células artificiales a partir de componentes mínimos facilita que las estructuras resultantes sean simples, fácilmente controlables y con menores limitaciones que las células mínimas obtenidas con el método de arriba hacia abajo. Este hecho se debe fundamentalmente a que eliminar uno por uno los genes de un organismo vivo es un proceso trabajoso y puede traer resultados inesperados e indeseables como la muerte celular.⁸

Este Trabajo de Fin de Máster se centra en la fabricación de células artificiales utilizando el método *bottom-up*, el cual permite tener un mayor control sobre las propiedades estructurales y funcionales de las construcciones vesiculares generadas.

1.4. Tipos de células artificiales

Existen numerosas formas de células artificiales con muchas definiciones diferentes, pero todas tienen en común que mimetizan de alguna forma a las células biológicas, ya sea bien en su estructura o presentando alguna característica propia de las células vivas.⁸

Las células artificiales se clasifican de acuerdo al andamio molecular del que están fabricadas en: estructuras membranosas (liposomas, vesículas de ácidos grasos, polimerosomas), emulsiones (gotas y coloidosomas) y coacervados (Figura 3).¹⁰

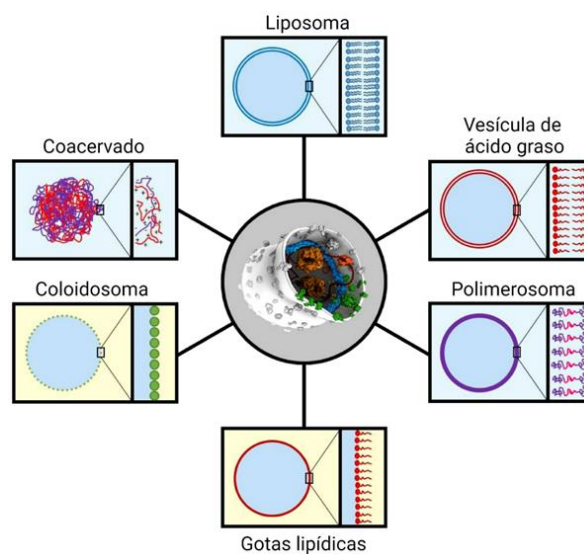


Figura 3. Tipos de células artificiales [Adaptado de Spoelstra *et al.* 2018].¹⁰

1.4.1. Liposomas o vesículas

Los liposomas se definen como vesículas lipídicas esféricas que están formadas normalmente por una o más bicapas de fosfolípidos y colesterol. Dichas estructuras poseen un interior que contiene un disolvente acuoso y presentan un diámetro comprendido entre 0,1 y 100 micras.¹¹

1.4.2. Vesículas de ácidos grasos

Las vesículas de ácidos grasos son estructuras esféricas constituidas por ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas lineales de hasta treinta átomos de carbono. Al igual que los fosfolípidos, los ácidos grasos tienen la capacidad de autoensamblarse en vesículas, pero lo hacen exclusivamente a un pH comprendido entre 7 y 9.¹⁰

1.4.3. Polimerosomas

Los polimerosomas son estructuras que forman vesículas similares a las de los liposomas como consecuencia del autoensamblaje de copolímeros de bloques anfífilos en disolución. Cabe resaltar que tienen un núcleo interno hidrofílico y una bicapa lipofílica. Además, suelen presentar un tamaño que comprende desde nano a micrómetros.¹²

Los copolímeros más utilizados para la construcción de polimerosomas son los copolímeros dibloque (los cuales están constituidos por una parte hidrofílica y otra hidrofóbica) y los copolímeros tribloque (con dos partes hidrofílicas separadas por una parte hidrofóbica). La principal ventaja que presentan los polimerosomas sobre los liposomas es que presentan una mayor estabilidad y tamaño ajustable, lo que es debido a su capacidad de formar bicapas más gruesas y rígidas que las de los liposomas. Este hecho ha despertado el interés de los polimerosomas como posibles transportadores de fármacos.¹⁰

1.4.4. Gotas lipídicas

Las gotas lipídicas son estructuras esféricas producto de la emulsión de agua en aceite. Estas gotas se pueden compartimentar y generalmente son utilizadas como microreactores.¹⁰ Dichos modelos adquieren un especial interés en el estudio de organismos biológicos, ya que resultan extremadamente eficientes para la encapsulación de biomoléculas hidrosolubles, como, por ejemplo, proteínas de membrana. Estudios recientes han mostrado la división de estas gotas lipídicas inducida por aumento de la relación superficie/volumen.¹³

1.4.5. Coloidosomas

Los coloidosomas son estructuras formadas por el autoensamblaje de partículas coloidales inorgánicas, tales como el silicato coloidal o partículas de látex de poliestireno. Estas estructuras experimentan cambios de forma oscilatoria al aplicarle estímulos externos, como, por ejemplo, hinchazón-encogimiento al aplicarle calor. Este hecho ha sido empleado para establecer una forma primitiva de autorreproducción de coloidosomas inducida químicamente, demostrando así la capacidad de dichos sistemas artificiales para imitar algunas características fundamentales de la vida.¹⁰

1.4.6. Coacervados

Los coacervados son un conjunto de moléculas que presentan dos fases bien definidas y que se mantienen unidas por fuerzas electrostáticas.¹⁰

Cabe resaltar los estudios pioneros llevados a cabo por el bioquímico ruso Aleksander Oparin, el cuál propuso que la vida se desarrolló a partir de coacervados. Sus resultados han mostrado la importancia de los coacervados como precursores de las células modernas, conduciendo al surgimiento de la vida en la tierra.¹⁴

1.5. Aplicaciones de las células artificiales

Las características (tales como morfología, superficie y forma) y propiedades especiales que presentan las células artificiales - las cuales permiten mimetizar eficientemente a las células naturales - han posibilitado su aplicación en múltiples y diversos campos, incluyendo investigaciones sobre el estudio de la vida que permiten comprender cómo surgieron las células naturales en la Tierra (Figura 4).

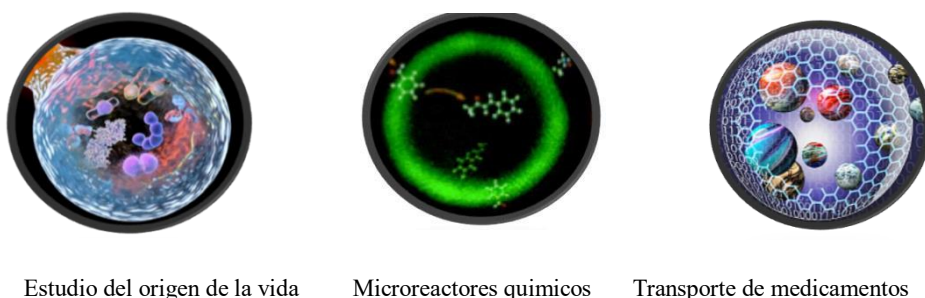


Figura 4. Diferentes aplicaciones de las células artificiales.

Cabe resaltar el frecuente uso de las células sintéticas como microreactores, pudiendo llevar a cabo en sus compartimentos interiores bien definidos desde reacciones químicas simples hasta procesos bioquímicos mucho más complejos.¹⁵

Estos modelos sintéticos también se usan como medio de administración de fármacos (bactericidas), inhibiendo eficientemente, en un tiempo más corto y en una concentración baja de fármaco, a las bacterias tratadas.¹⁶ El interés en este campo ha fomentado su estudio exhaustivo, pudiendo así establecer nuevos modelos artificiales

como vehículos transportadores dirigidos de fármacos para tratar enfermedades que requieren de mayor selectividad.

La enorme versatilidad y aplicabilidad de las células artificiales ha hecho que cobre un gran interés el desarrollo de estrategias químicas innovadoras que permitan su precisa construcción. En el presente Trabajo de Fin de Máster se ha desarrollado una ambiciosa estrategia para la fabricación de nuevos modelos de células sintéticas funcionales mediante la utilización de reacciones de aminólisis directa.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal planteado en este Trabajo de Fin de Máster es la construcción de nuevos modelos de células sintéticas funcionales basados en conjugados aminoácido-lípido autoensamblantes mediante el empleo de reacciones sencillas a partir de precursores solubles en agua. En concreto, se propone:

1. Síntesis y caracterización de diversos precursores tioéster alquílicos. Estudio de la influencia de la longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones en la formación de vesículas.
2. Formación *in situ* de aminoácidos diacilados con capacidad de autoensamblarse en vesículas. Preparación del ácido N_α, N_β -dioleil-L-diaminopropiónico mediante una reacción de aminólisis directa en agua.
3. Caracterización de los conjugados aminoácido-lípido. Corroboración de la formación de liposomas mediante microscopía óptica de campo claro y fluorescencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estrategia general

En el presente Trabajo de Fin de Máster se han fabricado células sintéticas funcionales mediante la preparación *in situ* de moléculas anfifílicas capaces de autoensamblarse en liposomas de tamaño micrométrico. Al igual que los fosfolípidos, estas moléculas están constituidas por dos fragmentos bien definidos; por un lado, dos colas hidrófobas compuestas por cadenas de ácidos grasos y, por otro, una cabeza hidrofílica de naturaleza polar. En nuestro caso particular, abordamos la construcción de dichas especies anfifílicas mediante reacciones de aminólisis directa en medio acuoso entre tioésteres de cadena larga (tiocaprilato, tiolaurato, tiopalmitato, tiooleato) -que aportarían el componente hidrófobo- y un aminoácido con capacidad para diacilarse [ácido aminopropiónico (Dap)] -que constituiría la parte hidrofílica (Figura 5).

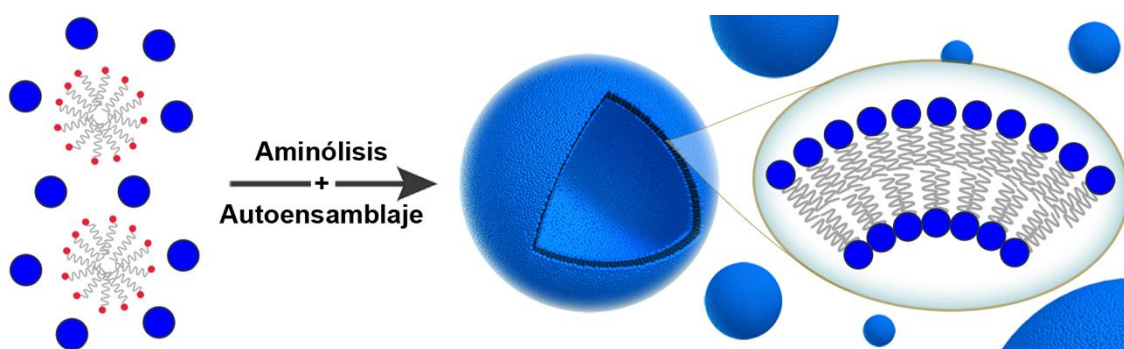


Figura 5. Estrategia usada para la construcción de células artificiales funcionales.

3.2. Síntesis y caracterización

3.2.1. Preparación de tioésteres

Los tioésteres de cadena larga empleados (6-9) se sintetizaron a partir de su ácido graso correspondiente (2-5), siguiendo el esquema de reacción de la Figura 6. Inicialmente, se activó el grupo carboxilo en diclorometano a 0 °C utilizando como agente de acoplamiento EDC.HCl y DMAP como catalizador. Esta preactivación favoreció el posterior ataque nucleófilo del 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA) (1), generando el tioéster deseado (6-9), el cual fue extraído en agua. La fase acuosa se

concentró en el rotavapor, obteniéndose un residuo transparente que se lavó con acetonitrilo y se filtró a vacío. De esta forma, se aislaron los diferentes tioésteres en forma de sólidos blancos con rendimientos del 39% (**6**), 60% (**7**), 20% (**8**) y 24% (**9**), respectivamente. Dichos derivados fueron convenientemente caracterizados mediante espectroscopía de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figuras A1-A4), así como por espectrometría de masas (Figuras A6-A9).

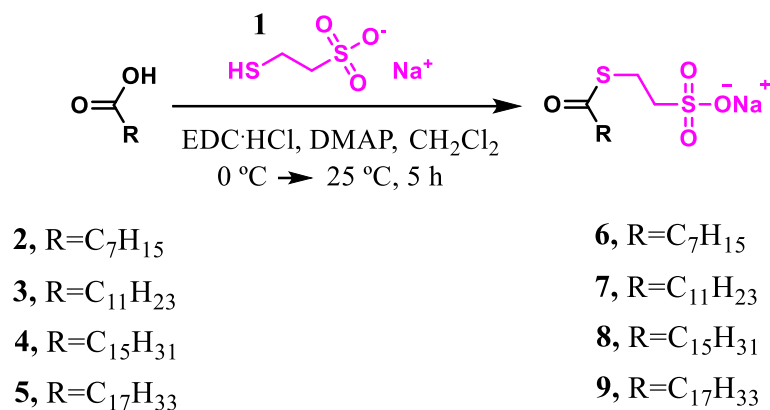


Figura 6. Síntesis de los tioésteres de MESNA (**6-9**).

3.2.2. Formación de conjugados aminoácido-lípido mediante aminólisis directa

Una vez se prepararon y caracterizaron los diferentes tioésteres alquílicos, se estudió la construcción de los conjugados anfílicos aminoácido-lípido, los cuales podrían autoensamblarse adecuadamente en vesículas. Para ello, se empleó una estrategia sintética basada en la utilización de una aminólisis directa entre precursores solubles en agua.

La aminólisis es la reacción entre un ácido carboxílico (o un derivado, como por ejemplo, un tioéster) y una amina primaria, dando lugar así a la formación de una amida. Esta ligación es un método utilizado frecuentemente para la obtención de péptidos.¹⁷ Aunque la aminólisis no presenta una alta quimioselectividad, su sencillez y versatilidad facilitan su empleo y estudio en diacilaciones en medio acuoso.

Cabe resaltar que investigaciones realizadas en enzimas hidrolíticas evidenciaron que el grupo imidazol de la histidina forma parte del sitio catalítico de dichas enzimas.¹⁸ Este hecho vislumbró la utilización de imidazol como catalizador de ligaciones mediadas por aminólisis, lo que lleva asociado un incremento considerable de sus cinéticas. De esta forma, Li *et al.* pudieron observar la aminólisis intramolecular en disolución acuosa de

una secuencia peptídica lineal, generando así el péptido cíclico esperado en tiempos de reacción adecuados (Figura 7).¹⁹

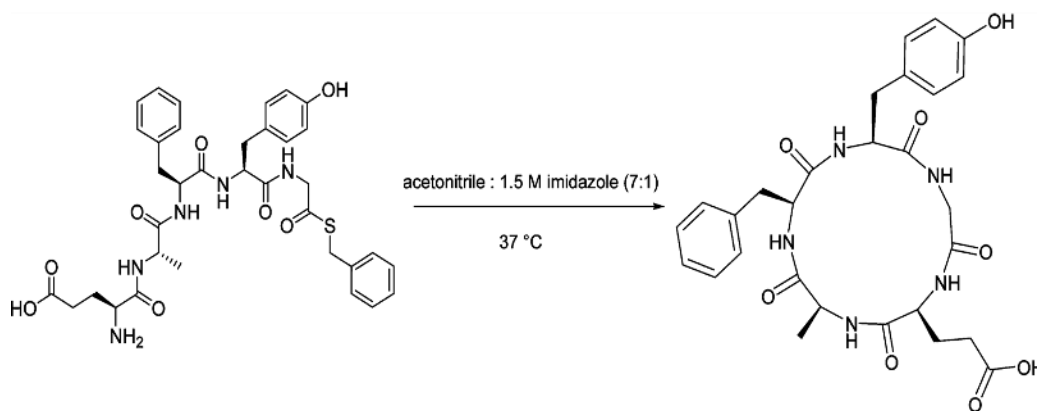


Figura 7. Síntesis de péptidos cíclicos mediante una aminólisis catalizada por imidazol
[Adaptado de Li *et al.*, 2009].¹⁹

En nuestro caso particular, decidimos analizar la reacción de aminólisis directa en agua entre los diferentes tioésteres de MESNA (**6-9**) sintetizados anteriormente y el clorhidrato de ácido 2,3-diaminopropiónico (H-Dap-OH·HCl, **10**), el cual es un aminoácido sintético homólogo inferior del α -aminoácido lisina.²⁰

Estudios preliminares realizados en el grupo de investigación BioMemChem mostraron que la presencia de imidazol era fundamental para llevar a cabo la diacilación en medio acuoso de derivados diaminados (L-lisina). Del mismo modo, se observó que la aminólisis directa no tenía lugar cuando se empleaban directamente los ácidos carboxílicos de cadena larga, por lo que era necesario la presencia de derivados activados (tioésteres) para poder lograr la eficiente diacilación. Cabe resaltar que el mecanismo de acción del imidazol todavía no se conoce con certeza.²¹

Teniendo en cuenta los resultados previos, se combinaron los diferentes tioésteres alquílicos (**6-9**) (concentración final: 5 mM), el aminoácido H-Dap-OH·HCl (**10**) (concentración final: 2,5 mM) y el imidazol (concentración final: 1,5 M), y se dejaron reaccionar en agua durante 2 h (Figura 8).

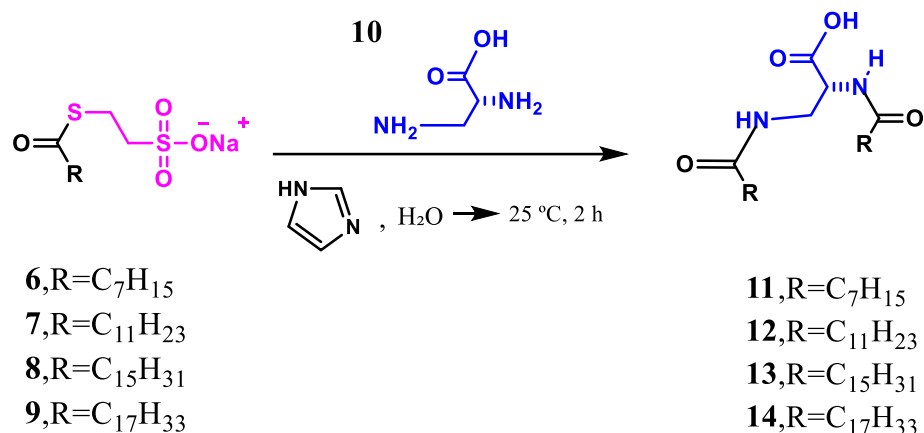


Figura 8. Reacción de aminólisis en agua mediada por imidazol entre diferentes tioésteres alquílicos (**6-9**) y el aminoácido H-Dap-OH·HCl (**10**), dando lugar a la formación de los correspondientes derivados diacilados (**11-14**).

Tras inyectar las diferentes muestras en el HPLC (Figura 9), sólo se observó la aparición de nuevos picos que podían corresponderse con el producto esperado en la reacción llevada a cabo entre el tiooleato de MESNA (**9**) y el aminoácido H-Dap-OH·HCl (**10**) (Figura 9D). Los derivados saturados de cadena más corta (**6-8**) no condujeron al producto diacilado esperado (**11-13**), ni siquiera aumentando los tiempos de reacción de la aminólisis (>24 h) (Figuras 9A-C). Este hecho parece indicar que estamos ante la presencia de una reacción selectiva para el tiooleato de MESNA (**9**), lo que puede ser consecuencia de que las micelas generadas por dicho derivado favorecen que la aminólisis directa tenga lugar de forma más adecuada. Futuros estudios focalizados en el tipo (tamaño, forma) de las estructuras micelares que forma cada tioéster, así como un análisis más amplio de diversas reacciones de aminólisis mediadas por imidazol (tanto de las dinámicas como de sus cinéticas) permitirá corroborar adecuadamente dicha hipótesis.

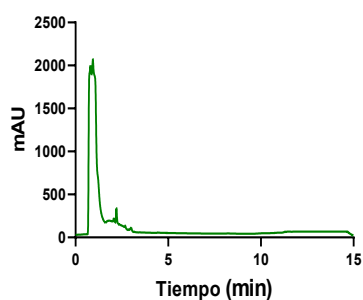
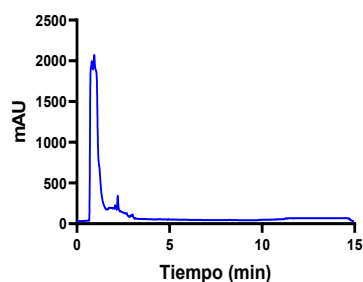
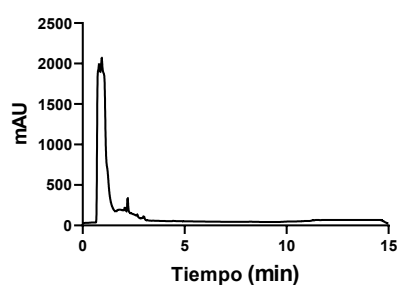
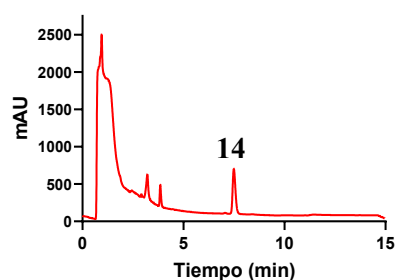
A)**B)****C)****D)**

Figura 9. Cromatogramas de la reacción de aminólisis directa entre los diferentes tioésteres alquílicos (**6-9**) y el aminoácido H-Dap-OH·HCl (**10**), para dar lugar a los correspondientes derivados diacilados (**11-14**). **A)** Reacción entre el tiocaprilato de MESNA (**6**) y **10**. **B)** Reacción entre el tiolaurato de MESNA (**7**) y **10**. **C)** Reacción entre el tiopalmitato de MESNA (**8**) y **10**. **D)** Reacción entre el tiooleato de MESNA (**9**) y **10**, observándose la formación de un nuevo producto correspondiente con el derivado dioleilado **14**.

Posteriormente, se procedió a purificar mediante HPLC el compuesto **14** obtenido por aminólisis directa, empleando para ello una columna semipreparativa C18. El tiempo de retención (t_R) del pico relativo al derivado dioleilado fue de 17.8 min. A continuación, se combinaron y concentraron las diferentes eluciones, obteniendo un aceite transparente (rendimiento: 33%). Dicho aceite se disolvió en metanol y se inyectó una pequeña alícuota en el HPLC utilizando una columna analítica C8. Este hecho corroboró la alta pureza de nuestro compuesto diacilado **14**, cuyo pico se observó a un tiempo de retención de 7.8 min (Figura 10).

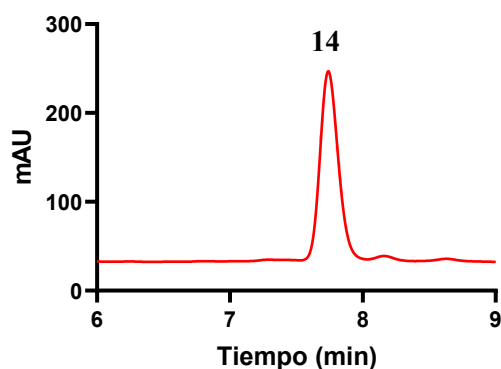


Figura 10. Cromatograma correspondiente al producto diacilado **14** puro.

El compuesto **14** se caracterizó mediante espectroscopía de ^1H RMN, cuyos resultados se pueden observar en la Figura A5. El espectro recogido permitió identificarlo convenientemente, siendo clave las señales de los seis protones correspondientes a los grupos metilo terminal de las cadenas alquílicas (0.90 ppm) y los cuatro protones correspondientes a los dobles enlaces de las cadenas de ácido graso (5.34 ppm), las cuales nos sirven para corroborar que se ha producido la diacilación. Además, se observa una señal correspondiente al protón del aminoácido (4.39 ppm), lo que indica que la cabeza polar de nuestro sistema proveniente del aminoácido Dap está presente.

El producto de la aminólisis también se caracterizó mediante espectrometría de masas, observándose una señal con una relación m/z de 671,51 (Figura A10), como consecuencia de la incorporación de potasio. De esta forma, la espectrometría de masas permitió también corroborar la obtención del producto esperado.

3.3. Estudios de microscopía

En primer lugar, se generaron películas lipídicas (*lipid films*) del derivado diacilado **14**. A continuación, las películas se hidrataron durante 2 h con una disolución 100 mM de tampón fosfato (PB) a pH 7,4, dando lugar a disoluciones turbias (concentración final del lípido **14**: 1 mM). Las suspensiones resultantes se analizaron mediante microscopía óptica en campo claro (objetivo 100X), observando la presencia de numerosas poblaciones de vesículas de tamaño micrométrico y con tendencia a agregarse (Figura 11).

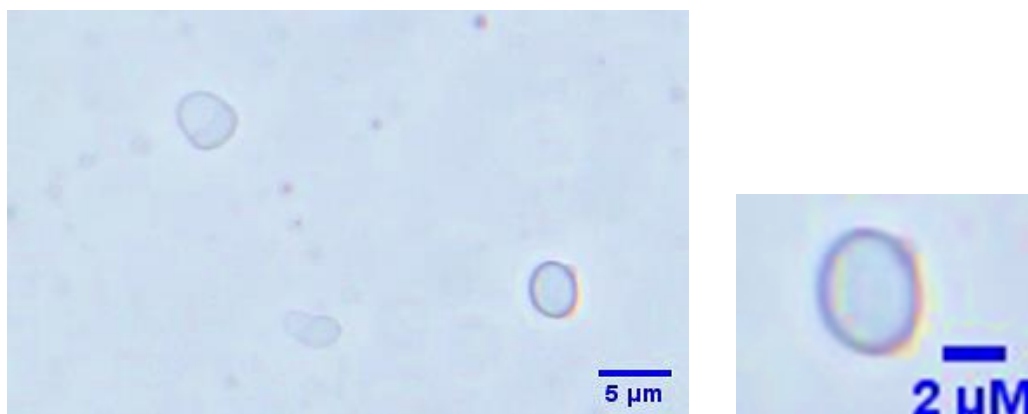


Figura 11. Fotografías tomadas en el microscopio óptico en campo claro de las vesículas formadas por hidratación del derivado diacilado **14**.

Una vez confirmada la presencia de vesículas bien definidas mediante el empleo de microscopía óptica en campo claro, se añadió el fluoróforo marcador de membranas Nile Red (10 μM) a una pequeña alícuota de la muestra lipídica previamente hidratada. Como las vesículas son estructuras lipídicas cerradas, se esperaba que este compuesto tiñera únicamente la membrana, hecho que se confirmó al observar las estructuras resultantes mediante microscopía de fluorescencia (Figura 12).

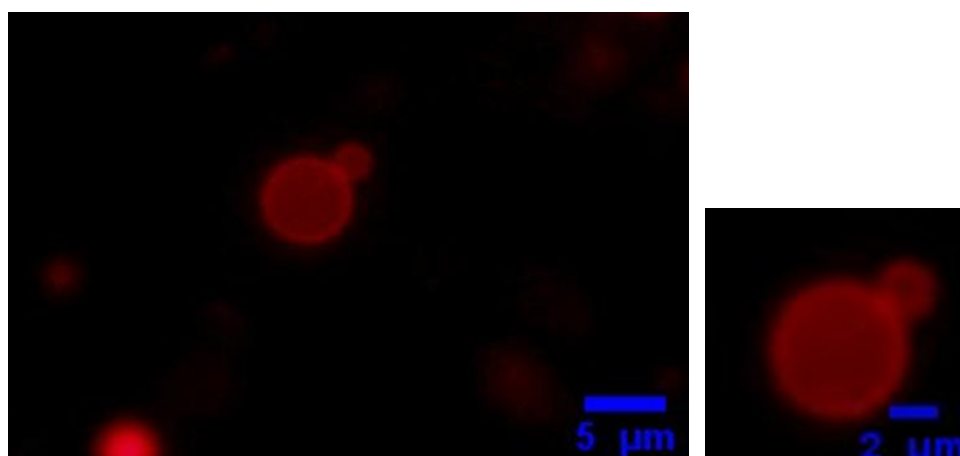


Figura 12. Visualización en el microscopio de fluorescencia (objetivo 100X) de las vesículas del producto **14** teñidas con Nile Red.

Un estudio exhaustivo del proceso de autoensamblaje del conjugado dioleilado **14** a diferentes tiempos de hidratación (30-120 min) y a una mayor concentración (2.5 mM), permitió observar mediante microscopía de fluorescencia el incremento del número de poblaciones de vesículas esféricas cuánto mayor es el tiempo de agitación. Además, se

determinó la presencia de numerosas estructuras vesiculares tubulares (Figura 13), correspondientes probablemente a nanoestructuras formadas al inicio del proceso de autoensamblaje. Cabe resaltar que dichos ensamblajes tubulares se transforman con el paso del tiempo en las correspondientes vesículas esféricas.

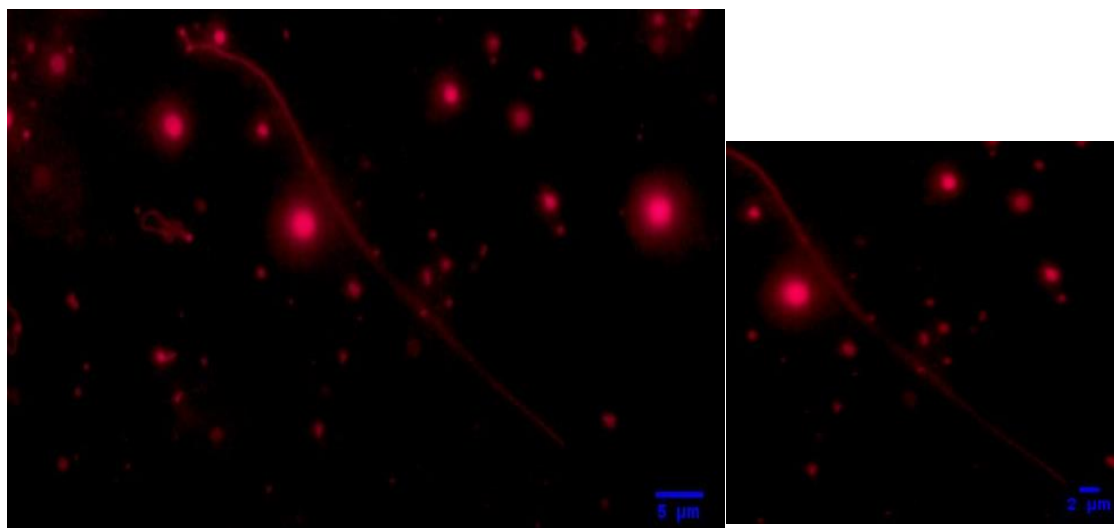


Figura 13. Visualización en el microscopio óptico de fluorescencia de estructuras tubulares teñidas con Nile Red.

4. CONCLUSIONES

En base a los objetivos propuestos y a los resultados obtenidos empleando la estrategia diseñada para la construcción de células sintéticas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de diferentes tioésteres alquílicos de MESNA (**6-9**) solubles en agua. Se ha demostrado que la longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones repercute considerablemente en la reacción de aminólisis que media la formación de liposomas. Así, se comprobó que el tiooleato de MESNA (**9**) era el precursor más adecuado en el caso de dicha ligación.
- Se ha sintetizado el aminoácido diacilado ácido $N_{\alpha}N_{\beta}$ -dioleil-L-diaminopropiónico (**14**) mediante aminólisis directa.
- Se ha caracterizado el conjugado aminoácido-lípido **14** mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas. Tras su hidratación, se demostró su autoensamblaje en forma de estructuras vesiculares de tamaño micrométrico mediante microscopía óptica de campo claro y fluorescencia, corroborando así la fabricación de una nueva clase de células sintéticas.

El empleo de la metodología desarrollada durante la realización de este Trabajo de Fin de Máster permitirá la fabricación precisa de células sintéticas aminoácido-lípido con relevantes aplicaciones en el campo de los biorreactores, el origen de la vida o el transporte y liberación de fármacos.

CONCLUSIONES

En base ós obxetivos propostos e ós resultados obtidos empregando a estratexia deseñada para a construción de células sintéticas, pódense extraer as seguintes conclusións:

- Levouse a cabo a síntese de diferentes tioésteres alquílicos de MESNA (**6-9**) solubles en auga. Demostrouse que a lonxitude da cadea e a presenza de insaturacións repercute considerablemente na reacción de aminólisis que media a formación de liposomas. Así, comprobouse que o tiooleato de MESNA (**9**) era o precursor máis adecuado no caso de dita ligación.
- Sintetizouse o aminoácido diacilado ácido N_α, N_β -dioleil-L-diaminopropiónico (**14**) mediante aminólisis directa.
- Caracterizouse o conxugado aminoácido-lípido (**14**) mediante espectroscopía de RMN e espectrometría de masas. Trala súa hidratación, demostrouse o seu autoensamblaxe en forma de estruturas vesiculares de tamaño micrométrico mediante microscopía óptica de campo claro e fluorescencia, corroborando así a fabricación dunha nova clase de células sintéticas.

O emprego da metodoloxía desenvolvida durante a realización deste Traballo de Fin de Máster permitirá a fabricación precisa de células sintéticas aminoácido-lípido con relevantes aplicacións no campo dos biorreactores, o orixe da vida ou o transporte e liberación de fármacos.

CONCLUSIONS

Based on the proposed objectives and the results obtained using the strategy designed for the construction of synthetic cells, the following conclusions can be drawn:

- Different water-soluble alkyl thioesters of MESNA (**6-9**) were synthesized. We demonstrated that the length of the chain and the presence of unsaturations have a considerable impact on the aminolysis reaction that mediates the formation of liposomes. Thus, it was verified that the MESNA thiooleate (**9**) was the most suitable precursor in the case of such ligation.
- Diacylated amino acid *N* α ,*N* β -dioleoyl-L-diaminopropionic acid (**14**) was synthesized by direct aminolysis.
- Conjugate amino acid-lipid **14** was characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. After hydration, we demonstrated its self-assembly in the form of vesicular structures of micrometric size by bright field and fluorescence optical microscopy, thus corroborating the fabrication of a new class of synthetic cells.

The use of the methodology developed during the completion of this Master's Thesis will allow the precise fabrication of synthetic amino acid-lipid cells with relevant applications in the field of bioreactors, the origin of life, or the transport and release of drugs.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Condiciones generales

Los reactivos y disolventes comerciales no fueron modificados ni purificados previamente antes de ser empleados. Para trabajar bajo atmósfera inerte se utilizó la línea de nitrógeno (N₂). Los matraces de fondo redondo fueron previamente secados en estufa a 80 °C.

5.1.2. Reactivos, disolventes y otros

Todos los reactivos, disolventes y disoluciones empleadas a lo largo de esta memoria se recogen en las Tablas 1-4.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis

<i>REACTIVOS</i>	<i>PROVEEDOR</i>
<i>Ácido dodecanoico</i>	BLD Pharmatech
<i>Acido fórmico, 99% LC-MS</i>	Fluorochem
<i>Ácido hexanoico</i>	TCI Chemicals
<i>Ácido octanoico</i>	BLD Pharmatech
<i>Ácido oleico</i>	BLD Pharmatech
<i>Ácido palmítico</i>	BLD Pharmatech
<i>Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC.HCl)</i>	BLD Pharmatech
<i>4-Dimetilaminopiridina (DMAP)</i>	Fluorochem
<i>Imidazol</i>	BLD Pharmatech

<i>2-Mercaptoetanosulfonato de sodio (MESNA)</i>	BLD Pharmatech
<i>N,N-Diisopropiletilamina (DIEA)</i>	TCI Chemicals

Tabla 2. Disolventes utilizados para la síntesis

<i>DISOLVENTES</i>	PROVEEDOR
<i>Acetonitrilo, UHPLC-MS</i>	Scharlau
<i>Agua, UHPLC-MS</i>	Scharlau
<i>Agua ultrapura</i>	Direct-Q-Suv
<i>Cloroformo, HPLC Grade</i>	Scharlau
<i>Diclorometano anhidro, 99.9%</i>	Scharlau
<i>Metanol, Grado HPLC supragradiente</i>	Scharlau

Tabla 3. Disolventes deuterados empleados

<i>DISOLVENTES DEUTERADOS</i>	PROVEEDOR
<i>Dimetilsulfóxido d6</i>	Deutero
<i>Metanol d4 >99,8% D</i>	Fluorochem

Tabla 4. Disoluciones tampones empleadas

TAMPONES	PROVEEDOR
<i>Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES)</i>	Fluorochem
<i>Fosfato sódico dibásico</i>	BLD Pharmatech
<i>Fosfato sódico monobásico</i>	BLD Pharmatech

5.1.3. Técnicas instrumentales

- **Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).** Se utilizó el cromatógrafo Agilent 1260 Infinity II del laboratorio BioMemChem para obtener los cromatogramas correspondientes a cada una de las reacciones realizadas y a cada uno de los compuestos debidamente aislados. Las fases móviles empleadas estaban constituidas por H₂O con 0,1% de ácido fórmico (*Fase A*) y MeOH con 0,1% de ácido fórmico (*Fase B*). Para el análisis de las muestras se utilizó una columna analítica Eclipse Plus C8, mientras que para la purificación de las muestras se utilizó una columna semipreparativa Zorbax SB-C18.
- **Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).** La preparación de las muestras para la realización de los espectros de RMN se llevó a cabo en tubos habitualmente empleados para dicha técnica. Cabe resaltar que como disolvente se empleó dimetilsulfóxido deuterado (d₆-DMSO) para los diversos tioésteres de MESNA (**6-9**) y metanol deuterado (d₄-MeOH) para el producto diacilado (**14**) resultante de la aminólisis. Para el procesado de los diferentes espectros obtenidos se empleó el programa MestreNova.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de los tioésteres de MESNA se registraron en el espectrómetro Bruker Avance 300 MHz del CICA. En el caso del derivado diacilado **14**, el espectro de RMN de ¹H se registró en el espectrómetro Bruker Avance500 MHz de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña.

- **Espectrometría de masas (EM).** Los espectros de masa tipo ESI de baja resolución fueron hechos en un espectrómetro de masas ESI-Q-q-TOF (modelo Qstar Elite, marca Applied Biosystems) del SAI utilizando ionización positiva.

- **Hidratación de películas lipídicas.** Este método permite la generación de vesículas lipídicas. El procedimiento consiste en hacer una película delgada de lípido (*lipid film*) en un recipiente de vidrio (habitualmente de fondo redondo) mediante la eliminación del disolvente orgánico. Tras la adición del medio de dispersión y sucesiva agitación, se forman las correspondientes vesículas lipídicas.

Así, para generar de manera eficiente liposomas, se tomó el producto diacilado (**14**) resultante de la reacción de aminólisis y con capacidad de autoensamblarse en vesículas y se situó inicialmente en un vial de 1,5 mL. Posteriormente, se disolvió en cloroformo de grado HPLC (concentración final de 2,5 mM). A continuación, se evaporó el disolvente orgánico empleando una corriente de N₂, obteniendo así una película fina distribuida por las paredes del vial. Luego, se añadió la disolución acuosa deseada (100 mM tampón fosfato a pH=7,4). Finalmente, los viales se situaron en un minirotador y la película lipídica se hidrató por rotación lenta durante 2 h.

- **Microscopía óptica.** El equipo utilizado para la apropiada visualización de las vesículas aminoácido-lipídicas derivadas del conjugado **14** fue el microscopio óptico OLYMPUS BX53 perteneciente al laboratorio Biomimetic Membrane Chemistry (BioMemChem) del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidade da Coruña (UDC). El fluoróforo marcador de membranas que se utilizó fue Nile Red en una concentración final de 10 μmol.

5.2. Procedimientos experimentales

5.2.1. Síntesis de tioésteres de MESNA

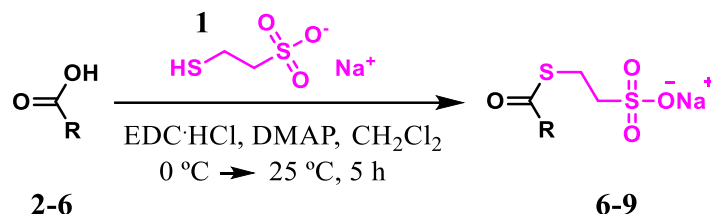
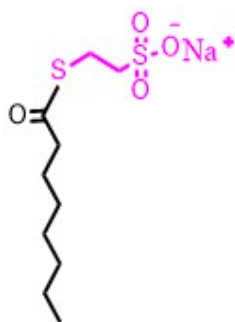


Figura 14. Preparación de los tioésteres de MESNA (6-9).

Se disolvió en 5 mL de diclorometano anhidro a $0\text{ }^\circ\text{C}$ 1.1 equivalentes del ácido graso correspondiente (**2**: 96,6 mg; **3**: 134,2 mg; **4**: 172,8 mg o **5**: 189,2 mg; 670 μmol). A continuación, se agregó 1.1 equivalentes de $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (128,4 mg, 670 μmol) y 0.1 equivalentes (7.4 mg, 60.9 μmol) de DMAP y la mezcla resultante se agitó durante 10 min. Posteriormente, se añadió 1 equivalente de MESNA (**1**) (100 mg; 609.1 μmol) y la reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 h.

Transcurridas las 5 h, el tioéster correspondiente se extrajo con agua (2 x 3 mL) y las fases acuosas combinadas se lavaron con acetato de etilo (3 mL). Tras evaporar el agua a presión reducida, se lavó el residuo sólido con acetonitrilo (5 mL) y se filtró a vacío, dando lugar al tioéster deseado en forma de sólido blanco (**6**: 75.2 mg; **7**: 140 mg; **8**: 51,5 mg o **9**: 69.5 mg).

Tiocaprilato de MESNA (6)



Aspecto: Sólido blanco.

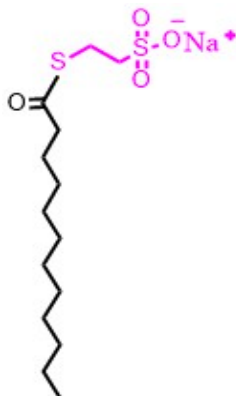
Rendimiento: 39%.

^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO, δ): 3,06-3,00 (m, 2H, 1 \times CH_2); 2,61-2,50 (m, 4H, 2 \times CH_2); 1,57-1,50 (m, 2H, 1 \times CH_2); 1,29-1,22 (m, 8H, 4 \times CH_2); 0,85 (t, $J = 7,0\text{ Hz}$, 3H, 1 \times CH_3).

^{13}C RMN (126 MHz, d_6 -DMSO, δ): 206,5; 198,7; 50,9; 43,3; 31,1; 30,7; 28,2; 25,1; 24,3; 22,0; 13,91.

Masas (ESI positivo, m/z) [M+Na]=267,07.

Tirolaurato de MESNA (7)



Aspecto: Sólido blanco.

Rendimiento: 60%.

¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO, δ): 3,03-3,00 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,58- 2,51 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,53 (q, *J* = 7 Hz, 2H, 1 × CH₂); 1,31-1,24 (m, 16H, 8 × CH₂); 0,84 (t, *J* = 5,1 Hz, 3H, 1 × CH₃).

¹³C RMN (125,77 MHz, d₆-DMSO, δ): 199,2; 51,4; 43,7; 31,8; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 28,7; 25,5; 24,8; 22,6; 14,5.

Masas (ESI positivo, m/z) [M+Na] = 323,14.

Tiopalmítico de MESNA (8)



Aspecto: Sólido blanco.

Rendimiento: 20%.

¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO, δ): 3,10-2,99 (m, 2H, 1 × CH₂); 2,64-2,51 (m, 4H, 2 × CH₂); 1,56-1,52 (m, 2H, 1 × CH₂); 1,34-1,14 (m, 24H, 12 × CH₂); 0,85 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H, 1 × CH₃).

¹³C RMN (125,77 MHz, d₆-DMSO, δ): 198,7; 50,9; 43,3; 31,3; 29,1; 29,1; 29,1; 29,0; 29,0; 29,0; 28,9; 28,8; 28,7; 28,2; 25,1; 24,3; 22,1; 14,0.

Masas (ESI positivo, m/z) [M+Na] = 379,20.

Tiooleato de MESNA (9)



Aspecto: Sólido blanco.

Rendimiento: 24%

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, d_6 -DMSO, δ): 5,36-5,16 (m, 2H, 2 \times CH); 3,05-2,85 (m, 2H, 1 \times CH₂); 2,60-2,51 (m, 4H, 2 \times CH₂); 1,98-1,94 (m, 4H, 2 \times CH₂); 1,48 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H, 1 \times CH₂); 1,34-1,08 (m, 24H, 12 \times CH₂); 0,85 (t, $J = 5,7$ Hz, 3H, 1 \times CH₃).

$^{13}\text{C RMN}$ (125,77 MHz, d_6 -DMSO, δ): 198,7; 129,8; 129,7; 51,0; 43,4; 31,4; 29,2; 29,1; 28,9; 28,8; 28,7; 28,6; 28,5; 28,3; 26,7; 26,6; 25,1; 24,4; 22,2; 14,1.

Masas (ESI positivo, m/z) [M+Na] = 405,21.

5.2.2. Reacción de aminólisis directa en agua

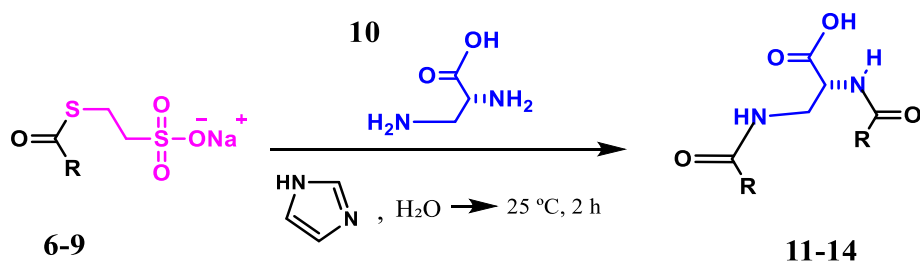
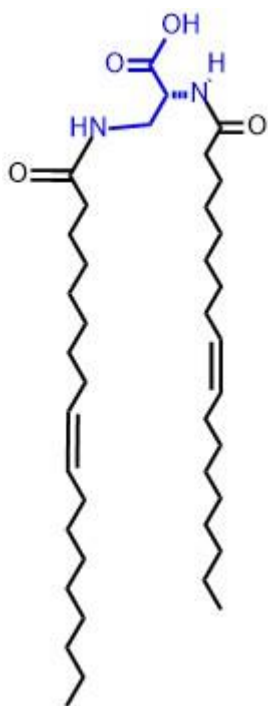


Figura 15. Preparación de los conjugados aminoácido-lípido (11-14) mediante aminólisis directa en agua mediada por imidazol.

En un vial de 1.5 mL conteniendo una barra agitadora y 500 μL de agua Milli-Q se añadió el tioéster de MESNA correspondiente (**6**: 1,8 mg; **7**: 4.35 mg; **8**: 5,05 mg o **9**: 5,35 mg). A continuación, se agregó el aminoácido H-Dap-OH \cdot HCl (0,9 mg, 6,25 μmol) y el imidazol (255.3 mg, 3.75 mmol). La mezcla se dejó agitando durante 2 h a temperatura ambiente (ta). Transcurrido ese tiempo, se inyectó una pequeña alícuota de cada una de las reacciones en el HPLC.

Ácido N_{ω},N_{β} -dioleil-L-diaminopropiónico (14)



Aspecto: Aceite transparente.

^1H RMN (500 MHz, MeOH- d_4 , δ): 5,43-5,26 (m, 4H, 4 \times CH); 4,42-4,35 (m, 1H, 1 \times CH); 3,64-3,44 (m, 2H, 1 \times CH₂); 2,32-2,11 (m, 4H, 2 \times CH₂), 2,10-1,94 (m, 8H, 4 \times CH₂); 1,74-1,51 (m, 4H, 2 \times CH₂); 1,44-1,20 (m, 40H, 20 \times CH₂); 0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H, 2 \times CH₃).

Rendimiento: 33%.

Masas (ESI positivo, m/z) [M+K] = 671,51.

HPLC $t_R = 7,80$ min (Columna: Eclipse Plus C8 analítica, Método: Lucía_diacilación_3; *Fase A*: H₂O con 0,1% de ácido fórmico; *Fase B*: MeOH con 0,1% de ácido fórmico; 50-95% *Fase B* en *Fase A*, de 0 a 1 min; 95% *Fase B* en *Fase A*, de 1 a 8 min; 95-100% *Fase B* de 8 a 10 min; 100% *Fase B* de 10 a 13 min; 100-50% *Fase B* en *Fase A* de 13 a 15 min).

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Masters, B. R. History of the optical microscope in Cell Biology and Medicine. En *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*; John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (Reino Unido), 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0003082>.
- (2) Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A; Lewis, J., Raff, M.; Roberts, K.; Peter, P. En *Introducción a la Biología Celular / Introduction to the Cellular Biology*, 3ª ed.; Editorial Médica Panamericana, 2006, pp 6-8.
- (3) Benner, S. A.; Sismour, A. M. Synthetic Biology. *Nature Reviews Genetics*. 2005, 6 (7), 533–543. <https://doi.org/10.1038/nrg1637>.
- (4) Rawis, R. L.; Washington, C. “Synthetic Biology” makes its debut. *Chemical & Engineering News* **2000**, 78 (17), 49–53. <http://dx.doi.org/10.1021/cen-v078n017.p049>.
- (5) Ding, Y.; Wu, F.; Tan, C.; Mavelli, F.; Stano, P. Synthetic Biology: A bridge between artificial and natural cells. *Life* **2014**, 4, 1092–1116. <https://doi.org/10.3390/life4041092>.
- (6) Stano, P. Is research on “Synthetic Cells” moving to the next level? *Life* **2018**, 9 (1), 3. <http://dx.doi.org/10.3390/life9010003>.
- (7) Pohorille, A.; Deamer, D. Artificial cells: prospects for biotechnology. *Trends in Biotechnology* **2002**, 20 (3), 123–128. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)01909-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799(02)01909-1).
- (8) Xu, C.; Hu, S.; Chen, X. Artificial cells: from basic science to applications. *Materials Today* **2016**, 19 (9), 516–532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2016.02.020>.
- (9) Gibson, D. G.; Glass, J. I.; Lartigue, C.; Noskov, V. N.; Chuang, R.-Y.; Algire, M. A.; Benders, G. A.; Montague, M. G.; Ma, L.; Moodie, M. M.; Merryman, C.; Vashee, S.; Krishnakumar, R.; Assad-Garcia, N.; Andrews-Pfannkoch, C.; Denisova, E. A.; Young, L.; Qi, Z.-Q.; Segall-Shapiro, T. H.; Calvey, C. H.; Parmar, P. P.; Hutchison III, C. A.; Smith, H. O.; Craig Venter, J. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **2010**, 329 (5987), 52–56. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1190719>.

- (10) Spoelstra, W. K.; Deshpande, S.; Dekker, C. Tailoring the appearance: what will synthetic cells look like? *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, *51*, 47–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.005>.
- (11) Andrews, H. E. Tecnologías de Nano/Microencapsulación de compuestos bioactivos. *Nanobio* 3^a ed.; Ciatej.2017.
- (12) Grillo, D. A. Polimerosomas aptos para transporte de drogas: diseño y caracterización empleando técnicas computacionales. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2019.
- (13) Sato, Y.; Yasuhara, K.; Kikuchi, J.-I.; Sato, T. N. Synthetic cell division system: Controlling equal vs. unequal divisions by design. *Scientific Reports* **2013**, *3* (1), 1-5. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03475>.
- (14) Lazcano, A. Alexandr I. Oparin and the origin of life: A historical reassessment of the heterotrophic theory. *Journal of Molecular Evolution* **2016**, *83* (5-6), 214-222. <https://doi.org/10.1007/s00239-016-9773-5>.
- (15) Krinsky, N.; Kaduri, M.; Zinger, A.; Shainsky-Roitman, J.; Goldfeder, M.; Benhar, I.; Hershkovitz, D.; Schroeder, A. Synthetic cells synthesize therapeutic proteins inside tumors. *Advanced Healthcare Materials* **2018**, *7* (9), 1701163. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701163>.
- (16) Jones, M. N.; Kaszuba, M. Polyhydroxy-mediated interactions between liposomes and bacterial biofilms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1994**, *1193* (1), 48–54. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90331-x](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(94)90331-x).
- (17) Contributors to Wikimedia projects. *Aminolysis*. Wikipedia, the free encyclopedia, 14 de marzo de 2006. <https://n9.cl/q0nsm1>.
- (18) Bruice, T. C.; Lapinski, R. Imidazole catalysis. IV. The reaction of *general Bases with p-nitrophenyl acetate in aqueous solution*. *Journal American of Chemical Society* **1958**, *80* (9), 2265-2267. <https://doi.org/10.1021/ja01542a057>.
- (19) Li, Y.; Yongye, A.; Giulianotti, M.; Martinez-Mayorga, K.; Yu, Y.; Houghten, R. A. Synthesis of cyclic peptides through direct aminolysis of peptide thioesters catalyzed by imidazole in aqueous organic solutions. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, *11* (6), 1066–1072. <https://doi.org/10.1021/cc900100z>.

- (20) Arguello Velasco, R. O. Síntesis de 2,5-dicetopiperazinas basadas en la estructura del ácido 2,3-diaminopropiónico y aminoácidos aromáticos. Tesis de Grado, Universidad Veracruzana, 2014.
- (21) Lomba Riego, L. Síntesis quimioselectiva de células artificiales funcionales. Trabajo de Fin de Grado, Universidad de La Coruña, 2022.

7. ANEXOS

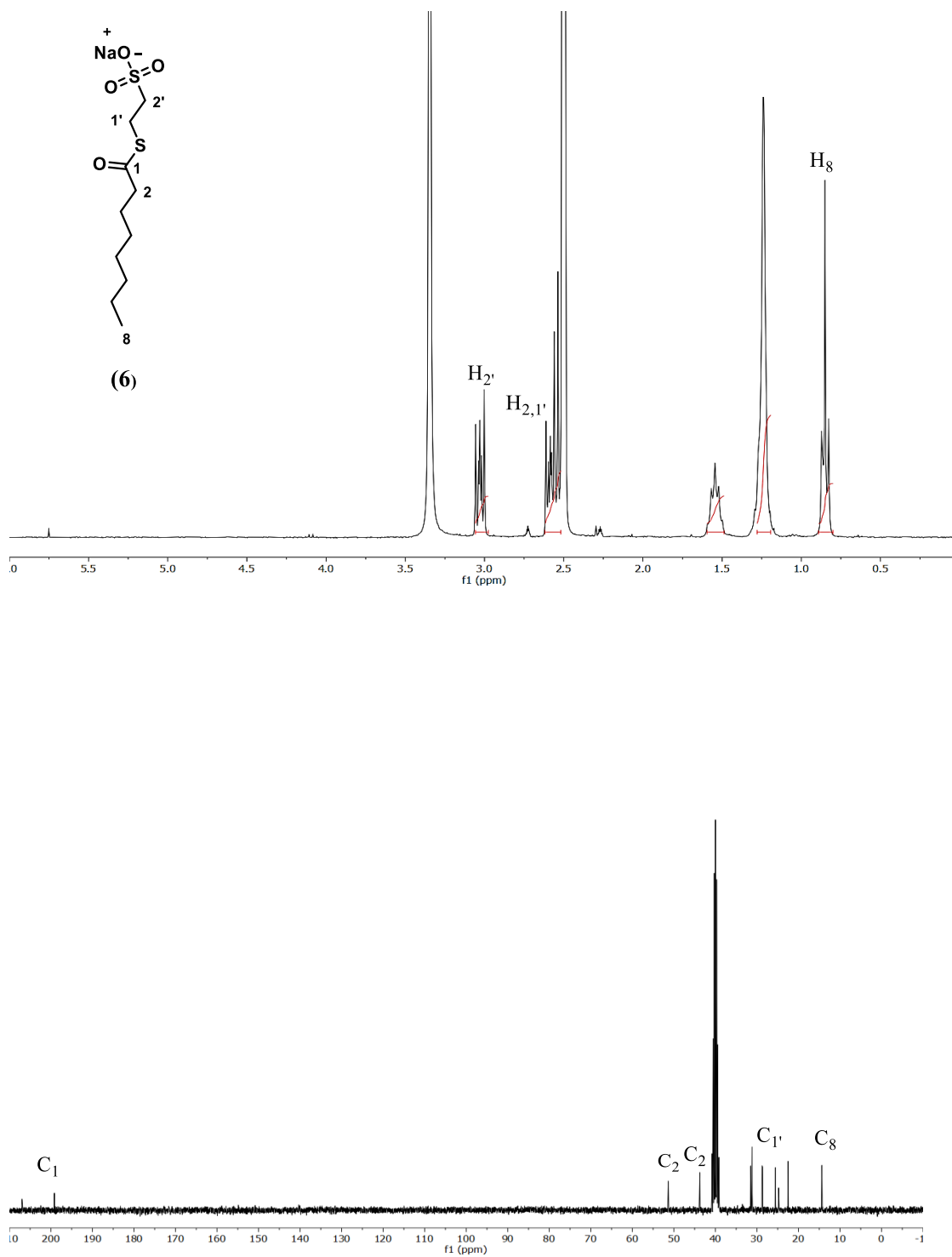


Figura A1. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tiocaprilato de MESNA (6).

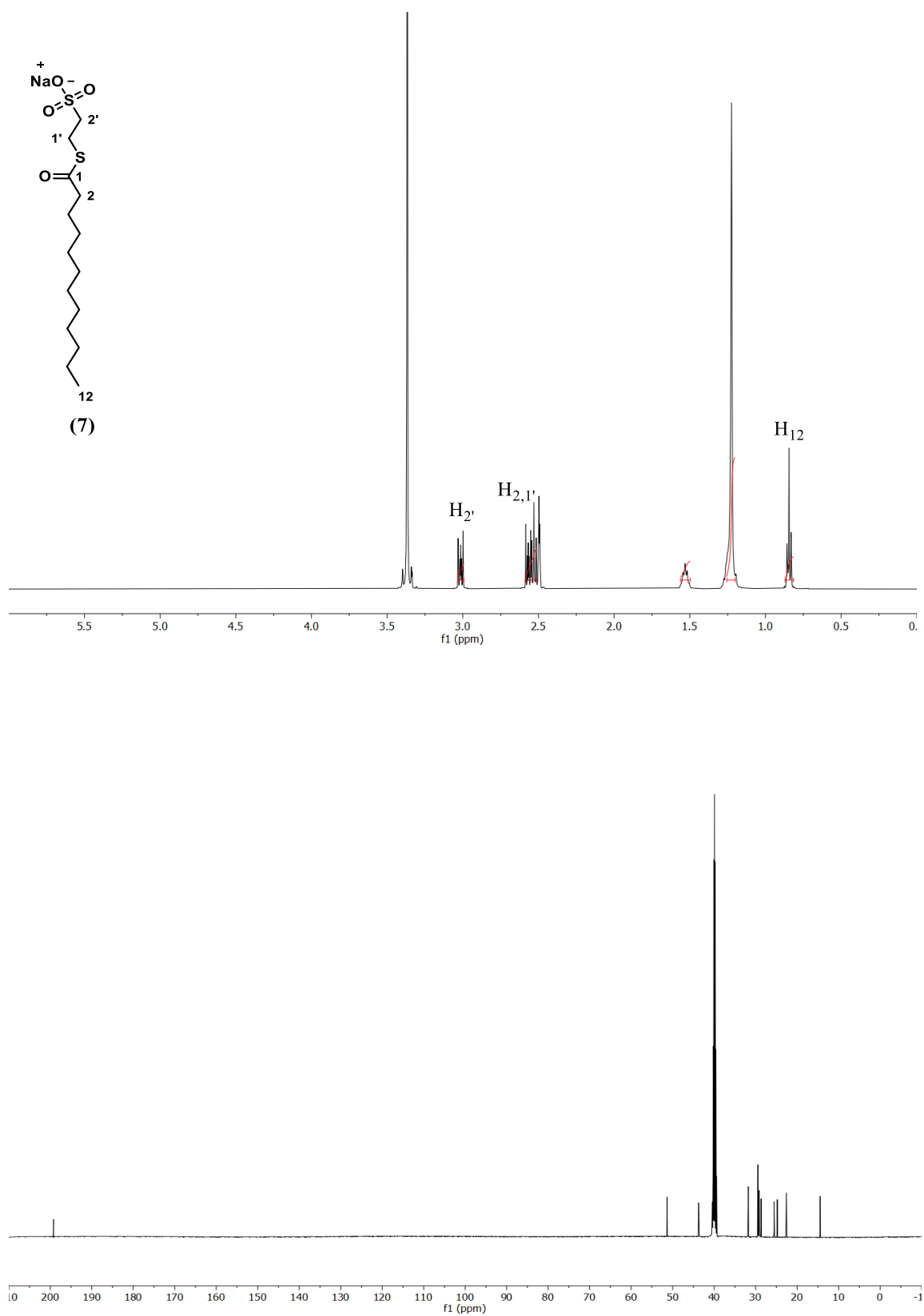


Figura A2. Espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del tiolaurato de MESNA (7).

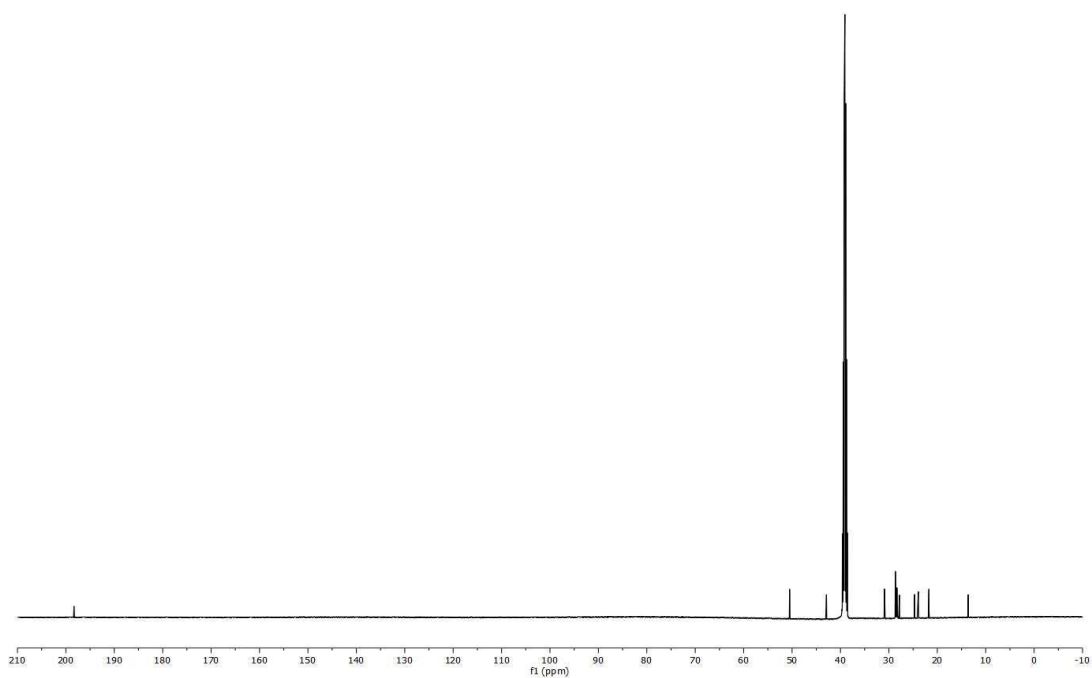
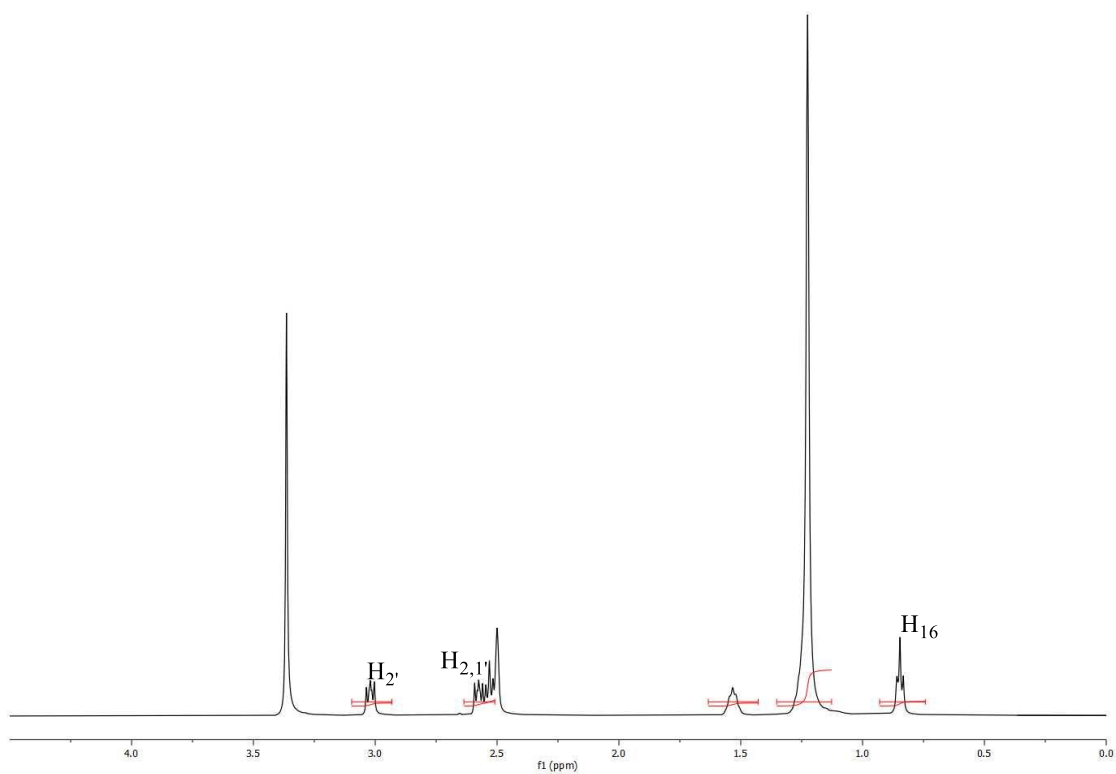
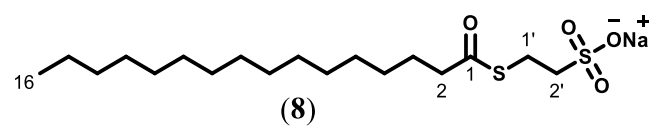


Figura A3. Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del tiopalmitato de MESNA (8).

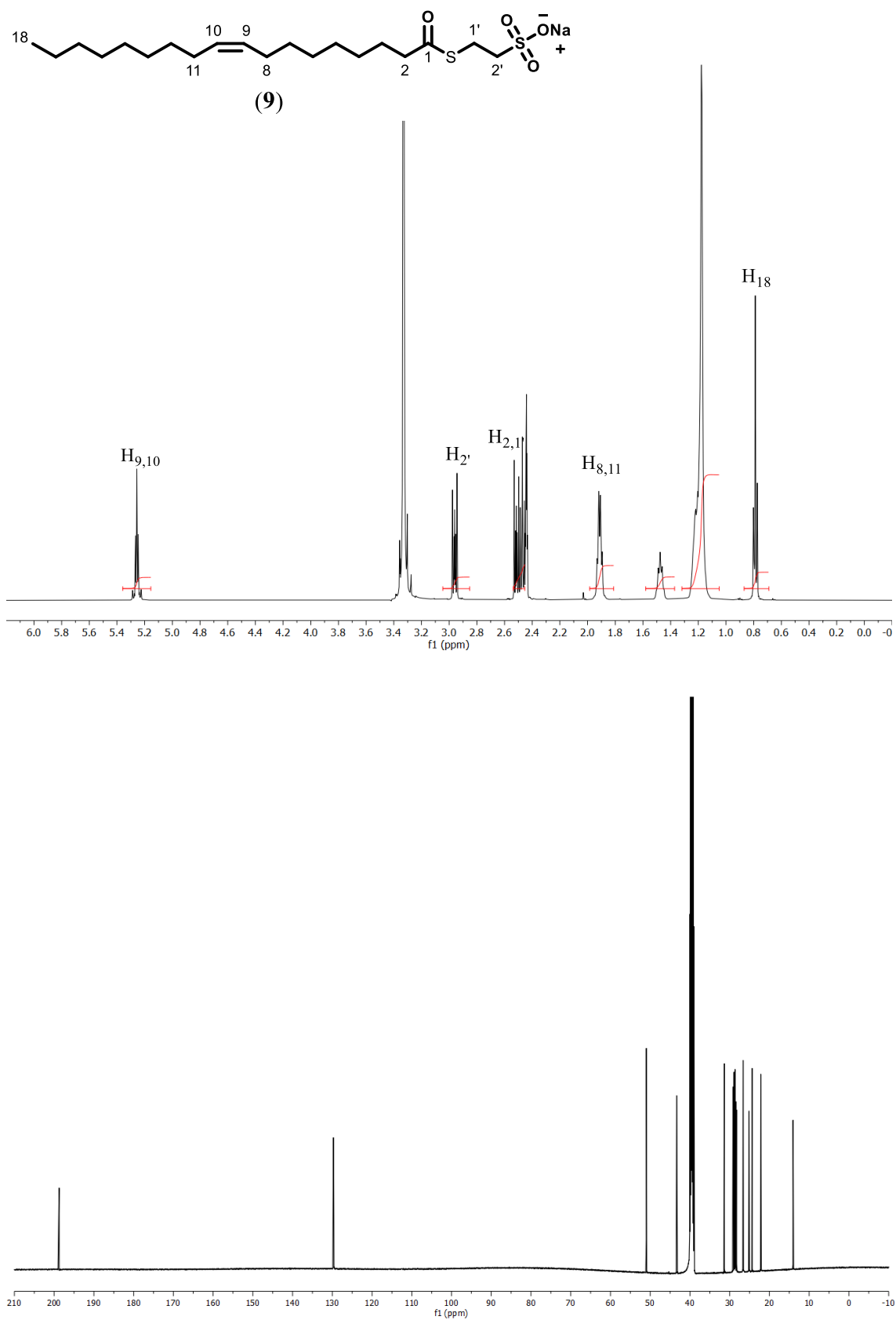


Figura A4. Espectros ¹H-RMN y ¹³C-RMN del tioleato de MESNA (9).

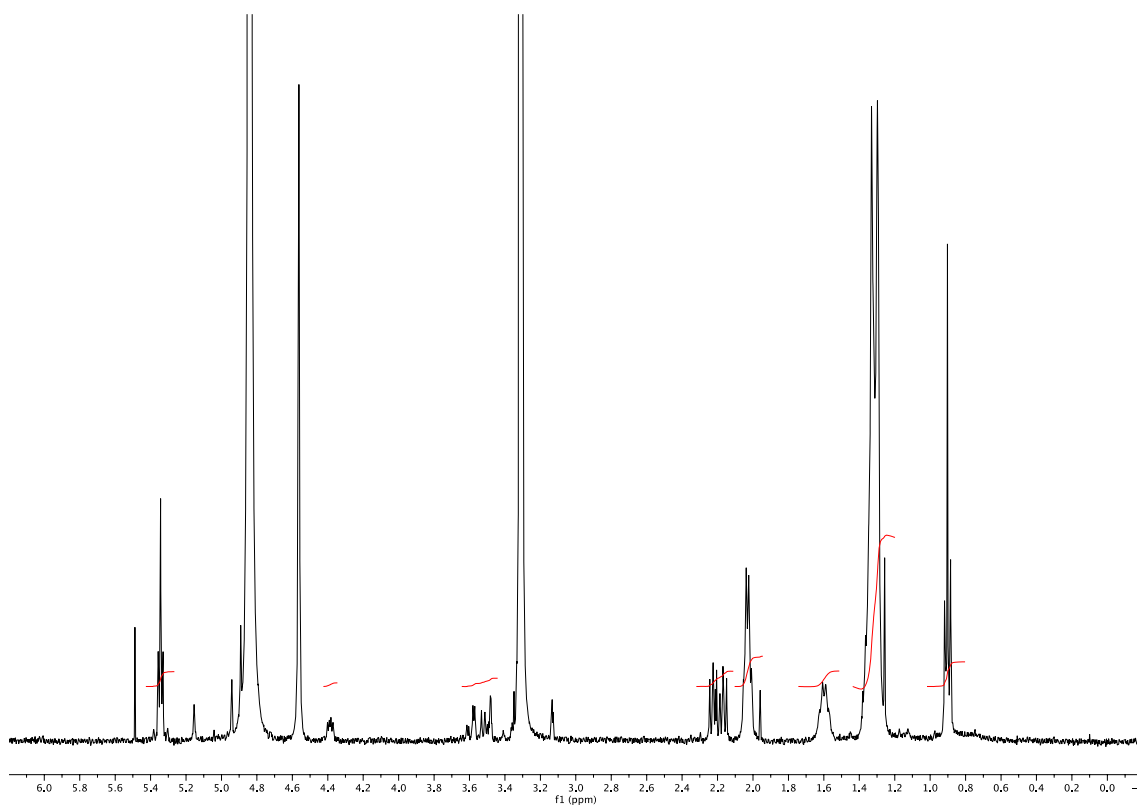
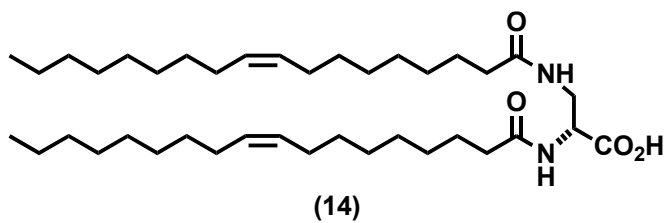


Figura A5. Espectro ¹H-RMN del conjugado aminoácido-lípido diacliado ácido *N*_α,*N*_β-dioleil-diaminopropiónico (14).

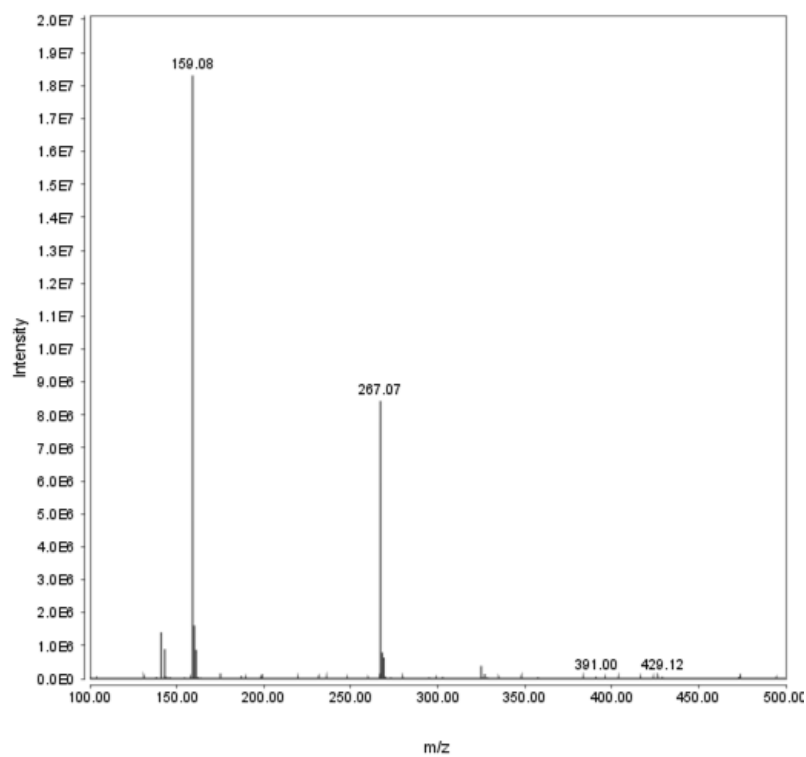


Figura A6. Espectro de masas del tiocaprilato de MESNA (6). Relación $m/z = 267,07$.

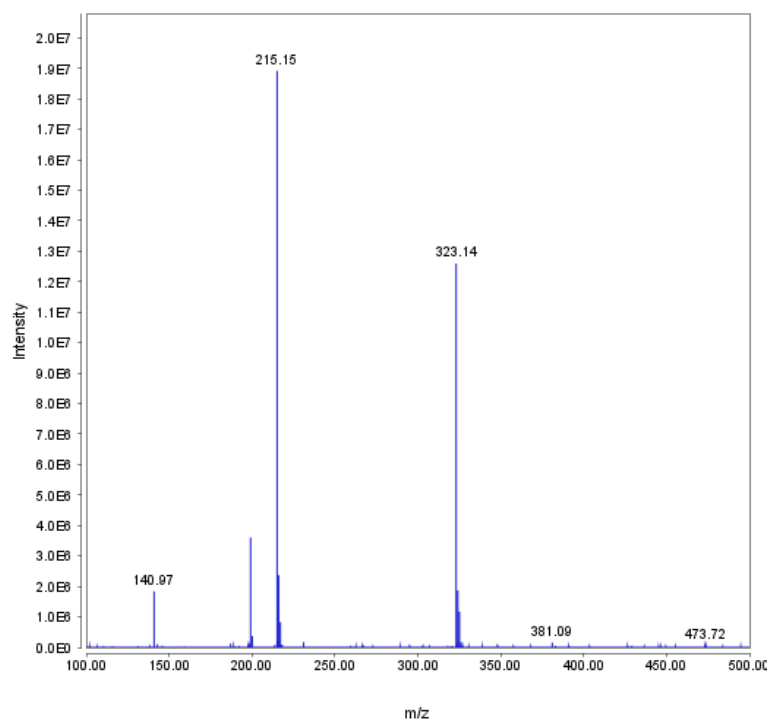


Figura A7. Espectro de masas del tiolaurato de MESNA (7). Relación $m/z = 323,14$.

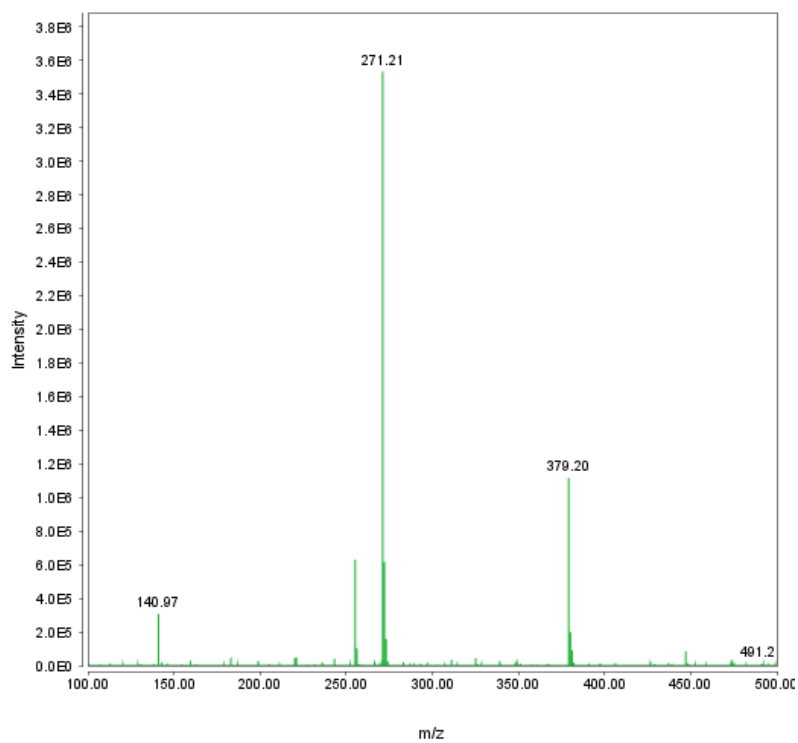


Figura A8. Espectro de masas del tiolaurato de MESNA (8). Relación $m/z = 379,20$.

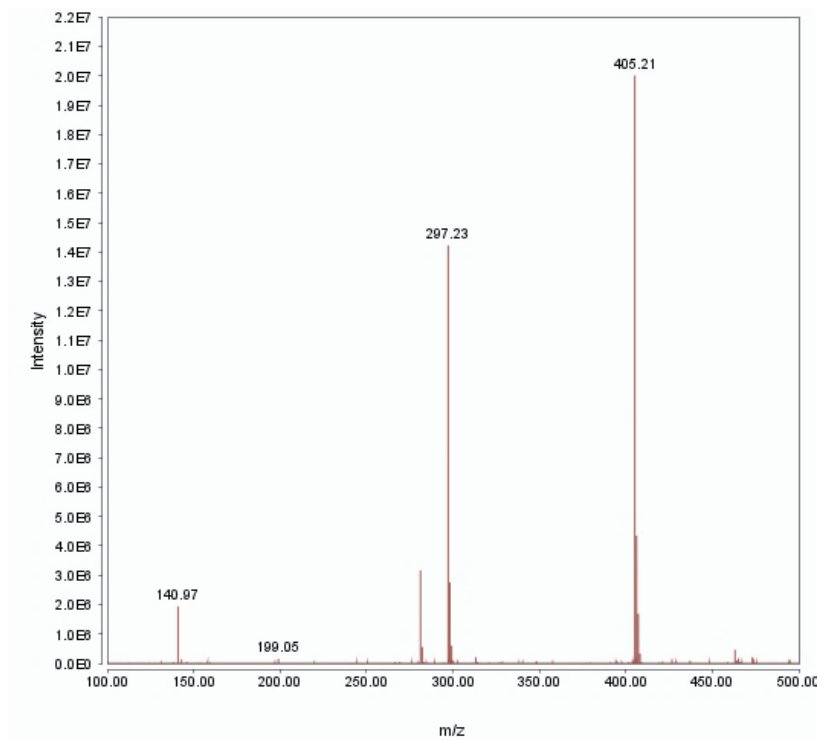


Figura A9. Espectro de masas del tioleato de MESNA (9). Relación $m/z = 405,21$.

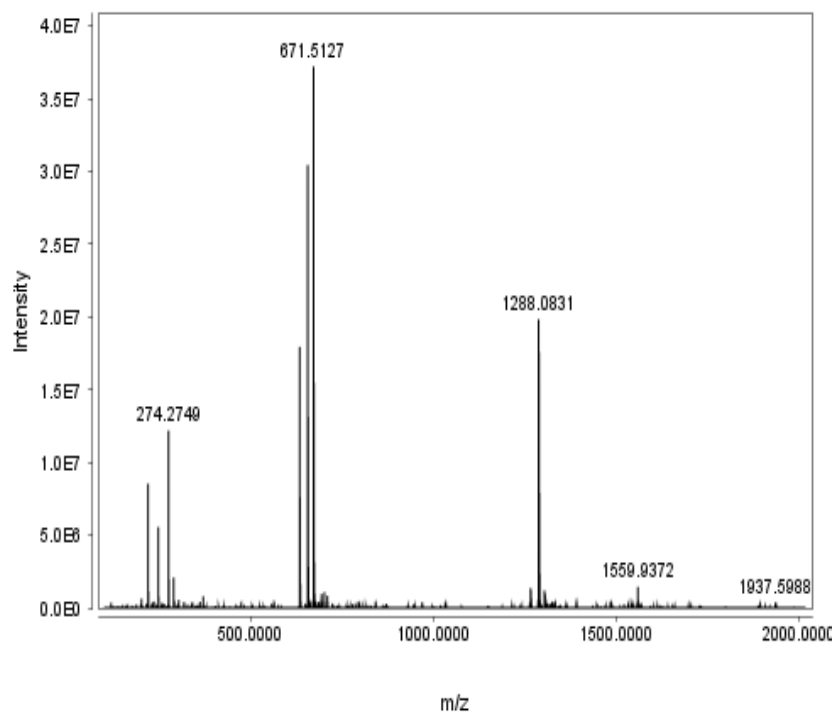


Figura A10. Espectro de masas del conjugado aminoácido-lípido diaclado ácido N_{α},N_{β} -dioleil-L-diaminopropiónico (**14**). Relación $m/z = 671.5$.