



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MOLÉCULAS
ANFIFÍLICAS BASADAS EN L-CISTEÍNA

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO EN MATERIALES

Presenta

María del Carmen Ley Flores

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

A mis padres,

Santiago Ley Perea y
María del Carmen Flores Córdova

A mis hermanos,

Jesús Ángel y
Santiago

A mi alma gemela,

Han

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo su apoyo y por haberme dado la oportunidad de estudiar en nuestra Alma Mater.

Al Dr. Paul Zavala Rivera por dirigir este trabajo. Mis más sinceras GRACIAS y mi mayor respeto y admiración.

Al Dr. Armando Lucero por asesorar este trabajo. Muchas gracias por su apoyo, sus sugerencias y comentarios.

Al Dr. Ramón Moreno Corral por su disposición y apoyo en la realización de este trabajo.

A la M.C. Anya Argüelles y a M.C. Marco Vizcarra por todo el apoyo recibido, sugerencias y comentarios a este trabajo.

A Han Umaña por las fotografías, y por el apoyo incondicional. Muchas Gracias.

Al Dr. Ramsés Galaz y a mis amigos de GSE Biomedical por el apoyo con las fotomicrografías.

A mis maestros del Dpto. de Ingeniería Química y Metalurgia, del Dpto. de Investigación de Polímeros y Materiales y del Dpto. de Física de la Universidad de Sonora. Gracias por su paciencia, entrega y por compartir conmigo su conocimiento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PÁGINA

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción	2
1.2. Justificación	3
1.3. Objetivo General	4
1.4. Objetivos Particulares	4
II. ANTECEDENTES	6
2.1. Moléculas Anfifílicas	7
2.1.1. Surfactantes.....	8
2.1.2. Cotensoactivos	8
2.1.3. Surfactantes Basados en Aminoácidos.....	11
2.1.4. Lipoaminoácidos	12
2.1.5. Cisteína.....	13
2.1.6. Agentes Gelantes de Bajo Peso Molecular y Geles Moleculares.....	14
2.2. Métodos de conjugación del grupo amida	15
2.2.1. Conjugación mediada por Carbodiimidas	16
2.3. Autoensamblaje Molecular	17
2.3.1. Parámetro de Empaquetamiento Crítico	18
2.4. Efecto Tyndall	18
2.5. Birrefringencia	19
2.6. Espectroscopía de Infrarrojo	20
2.7. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	22
III. METODOLOGÍA.....	23

3.1. Materiales	24
3.2. Preparación de moléculas anfifílicas	24
3.2.1. Paso 1: Esterificación del Ácido Oleico	26
3.2.2. Paso 2: Amidación con L-Cisteína.....	28
3.2.3. Separación de los productos de la Reacción.....	28
3.3. Métodos de Caracterización	30
3.3.1. Instrumentación General.....	30
3.3.3. Microscopía Óptica.....	31
3.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H	31
3.3.5. Espectroscopía de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR)...	32
3.4. Software	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Caracterización del producto de reacción	35
4.1.1. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)..	35
4.1.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H	37
4.2. Autoensamblaje de la molécula anfifílica	40
4.2.1. Gelificación	40
4.2.2. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier.....	43
4.2.3. Microscopía Óptica.....	45
4.2.4. Polarizadores Cruzados	46
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1. Conclusiones	48
5.2. Recomendaciones	49
VI. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de diferentes modelos de mezclas de soluciones: cloruro de cetilpiridino en (a) agua, (b) agua y glicerol, (c) agua y DMSO; y dodecilmencensulfonato de sodio en (d) agua, (e) agua y glicerol, (f) agua y DMSO [2].....	9
Figura 2. Efecto del DMSO en el comportamiento de las moléculas de agua. (A,B) Organización natural del agua [3].	10
Figura 3. Diferentes rutas de derivatización de aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas.....	12
Figura 4. Justificación del cabello rizado por la formación de fuentes disulfuro de las cisteínas presentes en las cadenas de queratina.....	14
Figura 5. Ejemplo esquemático de diferentes geometrías de ensamblaje dependiendo del parámetro de empaquetamiento crítico (PC).....	18
Figura 6. Birrefringencia de un material anisotrópico entre dos polarizadores cruzados.	20
Figura 7. Esquema general de la reacción de conjugación mediada por carbodiimidas para la síntesis de moléculas anfifílicas de N-Oleil-L-Cisteína...	25
Figura 8. Mecanismo de reacción de formación de O-Acilisourea reportado en la literatura [4].	26
Figura 9. Formación del éster de N-Hidroxisuccinimida y de la Diciclohexilurea como subproducto de reacción.	27
Figura 10. Proceso I de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína: (A) Formación de gel a pH 12, (B) extracción física del gel, (C) secado y (D) trituración de la muestra.	29

Figura 11. Proceso II de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína.....	30
Figura 12. Microscopio Óptico Keyence VHX-5000	31
Figura 13. Espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet Is50.....	32
Figura 14. Espectros FT-IR de Ácido Oleico (Azul), L-Cisteína (Rojo) y el producto de reacción (Verde).....	36
Figura 15. Espectro ¹ H-RMN del producto de reacción usando DMSO-d ₆ como solvente.....	38
Figura 16. Estructura del producto de reacción elucidada a partir de los resultados del análisis de espectroscopía ¹ H-RMN.	39
Figura 17. Gelificación del producto crudo de la bioconjugación a pH 12.	40
Figura 18. Solución del producto de reacción en agua (A) a pH 9.5, (B) después de subir el pH a 12, (C) 30 min. después y (D) una hora después.....	42
Figura 19. Producto de reacción disuelto en un sistema DMSO-Agua a (A) pH 4 y (B, C) pH 12.	43
Figura 20. Espectros FT-IR del xerogel del producto de reacción (rojo) y gel formado en el sistema DMSO-agua (verde).....	44
Figura 21. Fotomicrografías de los geles formados a pH 12 (A y C) en un sistema DMSO-agua y (B y D) en agua.	45
Figura 22. Fotografías del bioconjugado en una solución de DMSO (izquierda) y en el sistema DMSO-agua (derecha) a través de dos polarizadores cruzados.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Asignación de bandas de resultados de espectroscopía FT-IR del producto.....	36
Tabla 2. Asignación de bandas de espectroscopía de ^1H -RMN para el producto de bioconjugación.	39
Tabla 3. Diferencias en las bandas de absorción entre el producto en forma de polvo y en forma de gel en el sistema DMSO-agua.	44

RESUMEN

La preocupación actual por sustituir materiales por sus contrapartes ecológicamente benignas ha impactado diferentes disciplinas de la ciencia. Siendo la industria de los surfactantes una de las más grandes a nivel mundial, la producción de moléculas anfifílicas de baja toxicidad, con altas eficiencias y bajo costo se ha vuelto un tema relevante como objeto de estudio.

En este trabajo se reporta el método de síntesis de una molécula que pudiera ser utilizada como agente encapsulante con potencial de vehículo de liberación. De esta manera se realiza la conjugación de una molécula anfifílica compuesta de repeticiones de L-Cisteína unidas a un ácido graso con el fin de cumplir con las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y tendencia autoensamblarse.

Así mismo, se plantea un método donde se proponen las condiciones adecuadas para realizar la conjugación de los componentes mediante la técnica de acoplamiento por carbodiimidas. El producto de reacción se caracteriza por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). De igual manera, se estudia la función de la molécula como agente gelante de bajo peso molecular en diferentes medios y se analizan los geles obtenidos mediante microscopía óptica, FT-IR y a través de polarizadores cruzados.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Los surfactantes son unos de los productos químicos mayor utilizados a nivel mundial. En el 2002 la producción total en volumen de surfactantes fue de 11 millones de toneladas, donde aproximadamente el 20 % de la producción es de origen vegetal [1], siendo aquéllos basados en productos petroquímicos los que representan la mayoría en el mercado actual [2].

En este contexto, debido a la preocupación de producir materiales que cumplan con los criterios de desarrollo sustentable, ha surgido una necesidad por producir surfactantes amigables con el medio ambiente, con baja toxicidad y que al mismo tiempo sean capaces de cumplir con las especificaciones necesarias para su aplicación [2].

A pesar del desafío de minimizar los costos de producción de los surfactantes existentes, el mercado para producir productos ecológicamente responsables es la nueva fuerza impulsora en el desarrollo de surfactantes. En este aspecto, han surgido algunas nuevas iniciativas [3].

- Utilizar surfactantes que ocurren en la naturaleza.
- Sintetizar surfactantes a partir de unidades de construcción naturales.
- Usar materiales sintéticos para producir surfactantes que posean una biodegradación apropiada.
- Insertar uno o más enlaces débiles en la estructura para aumentar la velocidad de degradación.

- Sintetizar surfactantes más eficientes que puedan ser utilizados en menor cantidad.

En este trabajo se aborda la síntesis de un surfactante cuyas unidades de construcción provienen de materiales naturales; en este caso un ácido graso y un aminoácido. Se plantea su posible aplicación como promotor de absorción para sistemas de liberación de fármacos, de manera tal que mejore la permeación en membranas sin causar problemas de toxicidad.

1.2. Justificación

Los aminoácidos naturales son componentes potenciales para la síntesis de surfactantes debido a su disponibilidad, biocompatibilidad y multifuncionalidad. La asociación de aminoácidos polares capaces de constituir el componente hidrofílico con una cadena alifática como componente hidrofóbico resulta en la formación de una molécula anfifílica con baja toxicidad, actividad antimicrobial y biodegradación.

Los surfactantes basados en aminoácidos, tanto naturales como sintéticos, han sido objeto de estudio debido a su potencial aplicación en productos cosméticos, domésticos, alimenticios y farmacéuticos. En este aspecto, su incorporación como agentes encapsulantes de fármacos permite resolver el problema del transporte de compuestos activos a través de la membrana celular o de barreras biológicas tales como capas epiteliales y la barrera de sangre cerebral [4].

Los métodos de producción de los surfactantes basados en aminoácidos incluyen procesos químicos, enzimáticos y químico-enzimáticos, siendo los primeros los más prevalentes debido a su bajo costo de producción [5]. A pesar de que este tipo de surfactantes representa por el momento solo un pequeño porcentaje del

mercado, la tendencia actual de sustituir productos por sus contrapartes ecológicamente responsables podría cambiar este escenario.

En este contexto se puede explotar la estrategia de conjugación de biomoléculas naturales para sintetizar un bioconjugado de Ácido Oleico modificado con L-Cisteína. El proceso de bioconjugación de moléculas individuales resulta en la formación de nuevos materiales que combinan las propiedades de cada uno de sus constituyentes, obteniendo características que no se encuentran normalmente en la naturaleza.

En este aspecto, se plantea la síntesis de una molécula anfifílica que, por la naturaleza biológica de sus constituyentes pueda ser utilizada como vehículo biocompatible para el transporte de fármacos o nanopartículas metálicas explotando su grupo tiol.

1.3. Objetivo General

El objetivo de este trabajo es desarrollar una estrategia para sintetizar y caracterizar un surfactante basado en la conjugación de L-Cisteína y Ácido Oleico mediante el acoplamiento de carbodiimidas. Además, se pretende estudiar su comportamiento de ensamblaje molecular en agua y en sistemas DMSO-Agua a distintos pH para prospectar su posible función como agente encapsulante.

En conjunto este trabajo tiene como finalidad expandir el área de síntesis de N-acilaminoácidos para su posible aplicación en el área biomédica.

1.4. Objetivos Particulares

- Sintetizar un surfactante basado en L-Cisteína y Ácido Oleico a través de una reacción de conjugación con carbodiimidas.

- Identificar por espectroscopía de infrarrojo la formación del enlace amida característico del lipoaminoácido y la presencia del grupo tiol.
- Caracterizar por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón la estructura de la molécula sintetizada.

II. ANTECEDENTES

2.1. Moléculas Anfifílicas

El término anfifílico hace referencia a una estructura molecular que se compone de al menos una parte liofílica y una liofóbica [6]. Debido a que el agua es uno de los solventes más utilizados, generalmente se refiere como moléculas anfifílicas a aquellas moléculas compuestas de una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica (o lipofílica). En su forma más sencilla, dichas moléculas consisten en una larga cadena de hidrocarburos unida a una cabeza polar, la cual puede ser iónica o no iónica [7].

Cuando una molécula con una estructura anfifílica es disuelta en un solvente, el grupo liofóbico distorsiona la estructura del solvente, aumentando la energía libre en el sistema. Cuando esto ocurre, el sistema responde de manera tal que minimiza el contacto entre el grupo liofóbico y el solvente [8].

En el caso de un sistema acuoso, el grupo hidrofóbico distorsiona la estructura del agua rompiendo los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y estructurando dichas moléculas en la vecindad del grupo hidrofílico. Como resultado de esta distorsión, algunas de las moléculas del surfactante son expulsadas hacia las interfaces del sistema con sus grupos hidrofóbicos orientados de manera que se minimice el contacto con las moléculas de agua. De esta manera, la superficie del agua se ve recubierta por una capa de moléculas surfactantes con sus grupos hidrofóbicos orientados predominantemente hacia el aire [8].

Los grupos hidrofóbicos pueden ser cadenas cortas de hidrocarburos, fluorocarbonos o siloxanos con tamaño suficiente para producir las características necesarias de solubilidad, una vez que sea unida con el grupo hidrofílico apropiado [6]. Por su parte, el grupo hidrofílico puede ser iónico o altamente polar.

Moléculas anfífilas con diferentes estructuras tienen diferentes comportamientos de autoensamblajes en solución y en interfases. El principal interés en este tipo de moléculas reside en su autoensamblaje en sistemas acuosos para formar estructuras bien definidas, tales como micelas y vesículas, las cuales tienen aplicaciones en áreas como la fabricación de nanodispositivos, vehículos de liberación de fármacos, entre otros [9].

2.1.1. Surfactantes

Los surfactantes, también llamados agentes tensoactivos, son sustancias que tienen la propiedad de ser adsorbidos hacia las interfases de un sistema y alterar significativamente la tensión superficial del mismo [8]. Este comportamiento se observa también cuando el tensoactivo se encuentra dentro un sistema multifásico donde disminuye la tensión interfacial del mismo.

La estructura química apropiada para un surfactante varía dependiendo de la naturaleza del solvente que se utiliza y las condiciones de uso. En sistemas acuosos, se refiere como cabeza al grupo hidrofílico y como cola al grupo hidrofóbico [6]. Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, los surfactantes se clasifican en aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos.

2.1.2. Cotensoactivos

Los cotensoactivos son pequeñas moléculas anfífilas que por su tamaño no son capaces de autoensamblarse en soluciones acuosas; sin embargo, en presencia de tensoactivos de mayor tamaño, tienen la capacidad de afectar significativamente las estructuras supramoleculares que estos forman [10, 11].

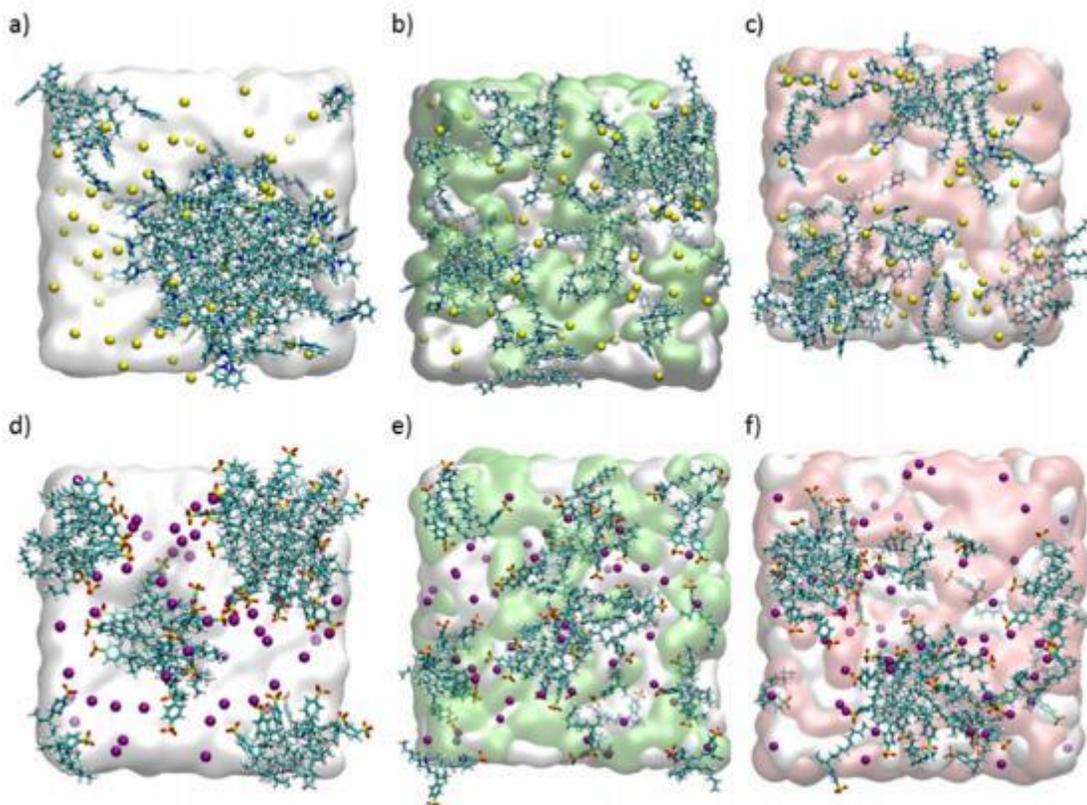


Figura 1. Representación esquemática de diferentes modelos de mezclas de soluciones: cloruro de cetilpiridino en (a) agua, (b) agua y glicerol, (c) agua y DMSO; y dodecibencensulfonato de sodio en (d) agua, (e) agua y glicerol, (f) agua y DMSO.

Estas moléculas suelen ser utilizadas como estabilizadores termodinámicos de sistemas de tensoactivos [12]. En estos casos, la relación entre surfactante y cosurfactante, el tamaño del cosurfactante, así como la composición de las multifases influyen en la formación y las propiedades de las estructuras supramoleculares formadas [11].

Estudios teóricos y experimentales confirman que el proceso de micelización se ve afectado al utilizar diferentes cosolventes tales como glicerol y DMSO como se observa en la Figura 1 [12]. Cuando estos cosurfactantes son añadidos a agua, la fuerza impulsora necesaria para el ensamblaje de las moléculas surfactantes disminuye.

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un solvente aprótico polar que contiene en su estructura un grupo sulfóxido altamente polar [13], así como dos grupos metilo CH_3 de naturaleza no polar. A diferencia de solventes polares próticos como el agua y los alcoholes, el DMSO tiende a aceptar en lugar de donar protones [14].

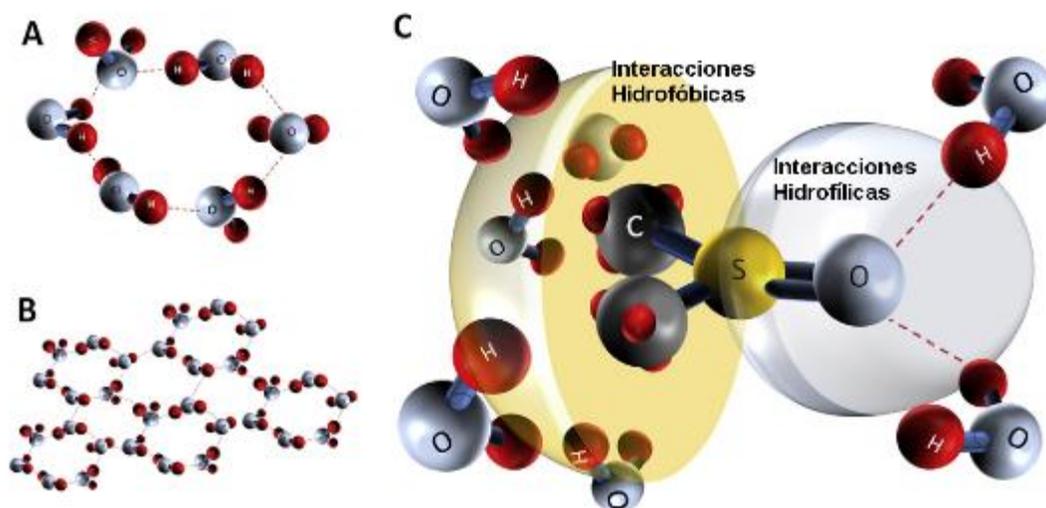


Figura 2. Efecto del DMSO en el comportamiento de las moléculas de agua. (A, B) Organización natural del agua. (C) La adición de moléculas de DMSO ocasiona una disrupción en la interacción de las moléculas de agua debido a que la interacción DMSO-agua es 1.3 veces más fuerte que la de las moléculas de agua.

Su habilidad de penetrar tejidos, tales como la piel, sin ocasionar un daño significativo está relacionada con su capacidad de formar puentes de hidrógeno y con su estructura pequeña y compacta. Estas características resultan en la habilidad del DMSO para asociarse con agua, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y sustancias iónicas [15].

Una de las propiedades estructurales más interesantes del dimetilsulfóxido es su acción como cosolvente o molécula chaperona. Estas son moléculas pequeñas que de manera no selectiva estabilizan proteínas mutantes y las asisten en su plegamiento [13].

2.1.3. Surfactantes Basados en Aminoácidos

La presencia de un aminoácido como grupo polar en una molécula anfifílica caracteriza este tipo de surfactantes. Para su síntesis se utilizan los 22 aminoácidos utilizados como unidades de construcción de proteínas como la materia prima natural. Estos, a excepción de la glicina (la cual es aquiral) se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su grupo R, de esta manera se pueden obtener surfactantes catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros [16, 17].

Debido a que los aminoácidos tienen un grupo carboxílico y un grupo amino primario, los surfactantes sintetizados a partir de ellos pueden ser preparados agregando el componente hidrofóbico en cualquiera de las dos partes, como se observa en la Figura 3. Se puede derivatizar el aminoácido haciendo reaccionar su grupo carboxilato con un alcohol para producir un éster aminado o con una amida para producir una amida aminada. De manera alternativa se puede partir del grupo amino para realizar su derivatización haciéndolo reaccionar con un ácido graso para obtener una amida ácida o con un haluro de alquilo para formar una amina secundaria o terciaria produciendo así un N-alquilaminoácido [18, 16].

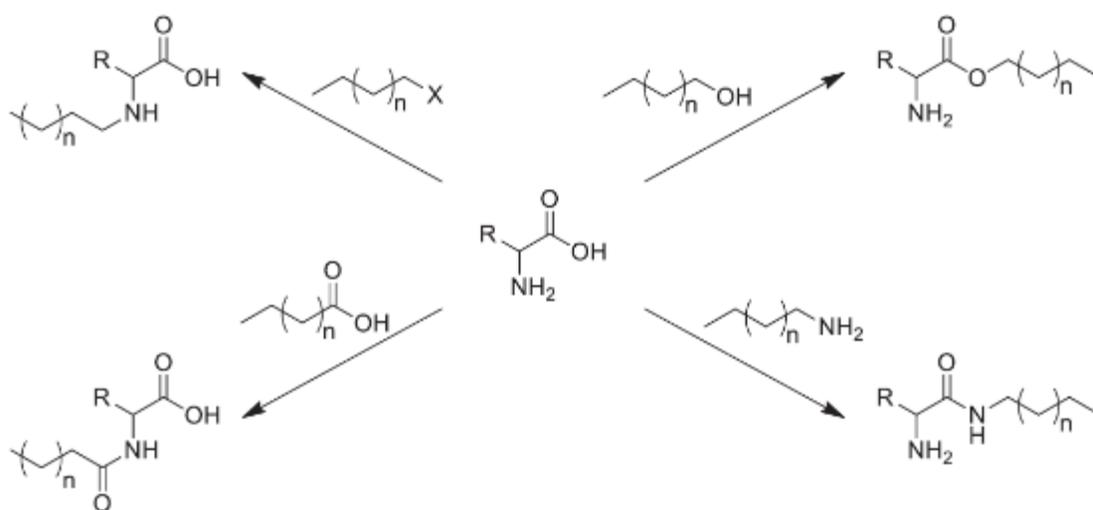


Figura 3. Diferentes rutas de derivatización de aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas.

2.1.4. Lipoaminoácidos

El término lipoaminoácido aplica para aquéllos compuestos en los que un solo aminoácido es unido, ya sea a través de su grupo carboxilo o amino, a un ácido graso de cadena larga [19]. En la naturaleza existen lípidos que contienen aminoácidos en su estructura y que son inseparables por métodos físicos [5].

La primera investigación reportada sobre N-acilaminoácidos fue en 1909 cuando S. Bondi sintetizó lipoaminoácidos de glicina y alanina como N-lauroil-aminoácidos con el fin de elucidar la teoría de que la necrosis de la grasa en las células era atribuida a la descomposición de acilaminoácidos en aminoácidos y ácidos grasos [5]. A partir de entonces la investigación de lipoaminoácidos ha cobrado interés en dos aspectos en particular: (1) la investigación de la existencia de acilaminoácidos en la naturaleza y (2) la exploración de la funcionalidad de dichas moléculas [5]. Posteriormente en 1955, se publicó la primera confirmación de la existencia natural de lipoaminoácidos [20]. Desde entonces se han encontrado varios lipoaminoácidos y lipopéptidos en diferentes seres vivos [5].

Aunque la investigación de la existencia natural de lipoaminoácidos no se ha extendido en la exploración de sus propiedades como moléculas surfactantes o sus aplicaciones potenciales, varios acilaminoácidos han sido sintetizados y estudiados e incluso patentados para aplicaciones como detergentes, cosméticos y pastas dentales [5].

Existen varios estudios que indican que los surfactantes basados en aminoácidos forman estructuras fibrilares capaces de gelificar aceites. La naturaleza de estas fibras reside en el autoensamblaje quiral de las moléculas anfífilas. Las fibras forman una red tridimensional a través del medio para formar un gel. En general,

los materiales que exhiben estas propiedades son denominados como agentes gelantes de bajo peso molecular [21].

El grupo amida en las moléculas está involucrado en la formación de fibras de primer orden a través de puentes de hidrógeno, mientras que la quiralidad de la estructura cisteinato es crítica para su desempeño como agente gelante [21].

2.1.5. Cisteína

El azufre en sus diferentes estados de oxidación representa uno de los elementos más versátiles en biología molecular. Muchos de los compuestos sulfurados en los seres vivos tales como algunas vitaminas, metionina y cisteína son esenciales para la nutrición humana llevando a cabo funciones tales como el transporte de electrones en centros FeS y roles estructurales a través de puentes disulfuro [28].

Los puentes disulfuro en las proteínas mejoran la estabilidad termodinámica de la molécula y pueden ser reversibles en ambientes reductores. La reactividad de los tioles de cisteínas individuales puede ser utilizada para manipular las reacciones oxidativas de ensamblaje [22].

Un ejemplo representativo del efecto de la adición de componentes de cisteína en el ensamblaje molecular de un sistema es el que presentan las moléculas de queratina en el cabello como se muestra en la Figura 4. Las queratinas, particularmente las alfa-queratinas, tienen largas secuencias de aminoácidos que forman una estructura helicoidal. Estas se ven atraídas entre sí a través de puentes de hidrógeno para ensamblarse entre ellas y formar un filamento de cabello. Uno de los aminoácidos que forman estas cadenas es la cisteína, la cual gracias a su grupo tiol es capaz de formar puentes disulfuro con otra cisteína de otra molécula de queratina. Entre más interacciones tiene un filamento con otro, más estrechamente enroscado resultará el conjunto de filamentos final.

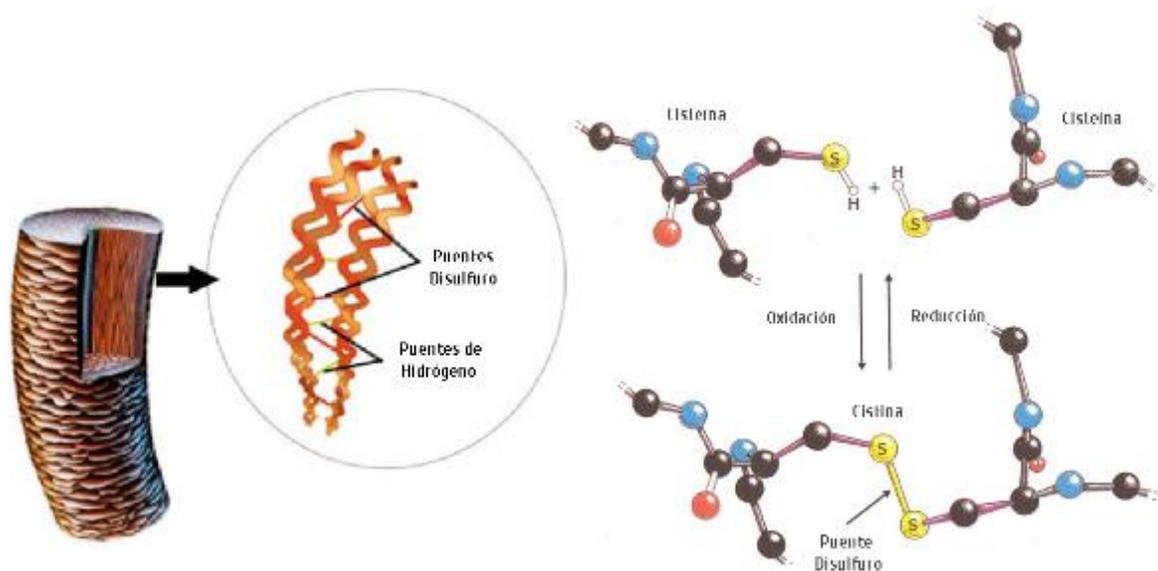


Figura 4. Justificación del cabello rizado por la formación de fuentes disulfuro de las cisteínas presentes en las cadenas de queratina.

Más aún, desde el descubrimiento de los ensamblajes espontáneos de tioles sobre la superficie de nanopartículas de oro, la funcionalización de moléculas anfifílicas con grupos mercaptano ha cobrado gran interés en disciplinas que varían desde electrónica hasta biomedicina [30].

2.1.6. Agentes Gelantes de Bajo Peso Molecular y Geles Moleculares

Los agentes gelantes de bajo peso molecular son una familia de moléculas anfifílicas con pesos moleculares debajo de los 2000 Da (Dalton) [23, 24]. Dichas moléculas se autoensamblan frecuentemente en redes fibrilares tridimensionales como consecuencia de interacciones no-covalentes, tales como fuerzas de dispersión London, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, y fuerzas de atracción y repulsión electrostáticas e interfaciales [25].

Las redes fibrilares autoensambladas son sistemas (SAFIN por sus siglas en inglés) en los que la gelación del solvente se debe a la formación de redes

tridimensionales de estructuras fibrosas tales como filamentos, capas, tubos o cilindros que se mantienen unidas por interacciones débiles entre las fibras [23].

Para la mayoría de los geles basados en SAFIN, la formación del gel se basa en el delicado balance entre las propiedades liofóbicas y las liofílicas del agente gelante con el solvente; de manera que las propiedades liofílicas le permitan a la molécula solvatare sin precipitar pero que las liofóbicas aseguren su agregación en el medio [23]

2.2. Métodos de conjugación del grupo amida

Para llevar a cabo la bioconjugación de un ácido graso como el ácido oleico con la L-Cisteína se pretende formar un enlace amida. Sin embargo, el método ideal de síntesis de amidas mediante la condensación directa de un ácido carboxílico y una amina para la formación de una molécula equivalente de agua como único subproducto no es práctica. Como resultado de esto, la activación del componente ácido es necesaria para promover el acoplamiento de la amida y desarrollar un proceso eficiente de síntesis [26].

Existen muchas consideraciones a la hora de seleccionar la molécula capaz de llevar a cabo el acoplamiento para su producción a escala industrial. Esta debe cumplir con las condiciones de costo, debe tener disponibilidad en el mercado, no ser tóxica, fácil de manejar y tener altos rendimientos de reacción.

En un estudio realizado en el 2016 basado en el número de publicaciones [26], se encontró que los métodos preferidos para la activación del grupo ácido a gran escala fueron:

1. Activación mediante la formación de ésteres con carbodiimidas
2. Formación de cloruros ácidos

3. Conversión de aminas con carbonildiimidazol

Otros de los métodos que se encontraron incluyen el acoplamiento mediante anhídridos ácidos mediante compuestos de boro, síntesis de transamidación, síntesis de amidas catalizadas por ácidos de Brönsted, acoplamiento vía anhídridos basados en fósforo y acoplamiento por sales de fosfonio y uranio [26].

2.2.1. Conjugación mediada por Carbodiimidas

El uso de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) para la formación de péptidos y otros enlaces amida fue reportado por primera vez por Sheehan y Hess en 1955. A partir de ese momento, las carbodiimidas se ha convertido en uno de los compuestos más importantes para la preparación de amidas. Debido a su disponibilidad, costo e impacto ambiental, solo algunas carbodiimidas se utilizan a gran escala; entre ellas se encuentran el DCC, la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC, EDC o EDCI) [26].

Para este tipo de conjugaciones es importante seleccionar la carbodiimida dependiendo del solvente, considerando que debe ocurrir una separación de la urea correspondiente. Para el caso de las reacciones que parten de ácidos grasos, se debe utilizar un compuesto que sea también soluble en solventes no polares o anfifílicos, tales como el DMSO, y que la urea correspondiente sea fácilmente eliminable.

Dado que el producto de reacción se espera que permanezca disuelto en la solución, el DCC presenta una ventaja sobre las otras carbodiimidas ya que no es solo más económica que las ya mencionadas, sino que también es soluble en solventes como el DMSO. Más aún, la urea producida como subproductos es

insoluble y precipita casi inmediatamente, facilitando su separación por medio mecánicos [26].

2.3. Autoensamblaje Molecular

El autoensamblaje supramolecular es una organización espontánea de pequeños componentes moleculares a través de interacciones intermoleculares no covalentes tales como puentes de hidrógenos, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, complejos metal-ligando, apilamientos, entre otras [27].

El diseño y desarrollo de moléculas anfifílicas funcionalizadas juega un papel importante en la programación del autoensamblaje de las unidades de construcción bajo condiciones termodinámicas apropiadas. La diversidad estructural de las moléculas anfifílicas y los modos de interacción entre ellas en diferentes medios resulta en la formación de estructuras tales como micelas, microemulsiones, vesículas, fibras, geles y cristales líquidos [21].

Las moléculas pequeñas con componentes funcionales balanceados tales como las moléculas anfifílicas, son propensas a interactuar unas con otras gracias a una combinación de distintas interacciones débiles. En los últimos años, las estructuras autoensamblables de moléculas anfifílicas como vehículos para la liberación de moléculas bioactivas ha cobrado gran importancia debido al aumento de fármacos hidrofóbicos utilizados en la industria biomédica. Es así como la naturaleza anfifática de las moléculas ensamblables formadas por surfactantes y lípidos presentan varias ventajas que incluyen el aumento de la solubilidad, protección contra hidrólisis y degradación enzimática, así como liberación controlada [28].

2.3.1. Parámetro de Empaquetamiento Crítico

La geometría global de diferentes estructuras depende en gran medida de las dimensiones de la molécula surfactante. Para que estas moléculas anfifílicas puedan empaquetarse en agregados, las dimensiones moleculares deben ser compatibles [28].

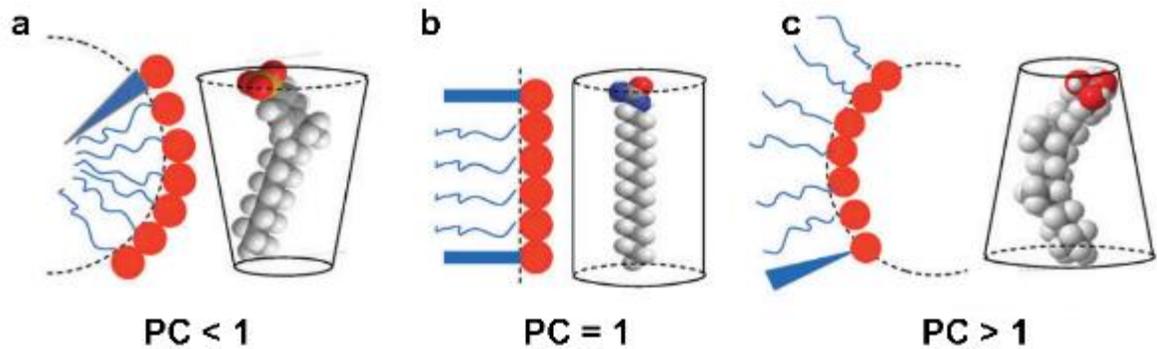


Figura 5. Ejemplo esquemático de diferentes geometrías de ensamblaje dependiendo del parámetro de empaquetamiento crítico (PC).

En este aspecto, el parámetro de empaquetamiento crítico (PC) representa una herramienta útil para medir la topología de agregación. Este parámetro se aproxima a partir de estimaciones de las dimensiones del surfactante, donde se relacionan la longitud efectiva de la cadena hidrofóbica del surfactante, el área efectiva de la cabeza polar de la molécula y el volumen promedio ocupado por ella.

2.4. Efecto Tyndall

A la dispersión de la luz causada por partículas coloidales se le conoce como efecto Tyndall. Este fenómeno puede ser fácilmente relacionado con la turbidez de una muestra por lo que, a simple vista, representa una técnica cualitativa para indicar la formación de sistemas coloidales [29].

2.5. Birrefringencia

Cuando la luz polarizada viaja a través de un material con dos o más índices de refracción diferentes, esta es separada en dos componentes con diferente velocidad y ángulos de refracción. A este fenómeno se le conoce como birrefringencia y es dependiente de la polarización y la dirección de propagación de la luz [30]. De esta manera la birrefringencia es definida simplemente como la diferencia entre los valores mínimos y máximos del índice de refracción [31].

Los materiales usualmente son clasificados como isotrópicos o anisotrópicos. Los materiales isotrópicos presentan propiedades uniformes en todas las orientaciones, mientras que en los anisotrópicos las propiedades varían según la dirección. De esta manera, los materiales ópticamente anisotrópicos se les denomina birrefringentes [30].

La birrefringencia, así como otros efectos ópticos basados en la polarización de la luz, puede ser determinada midiendo los cambios de la polarización de la luz al pasar por un material insertado entre dos polarizadores cruzados.

Se sabe que los cristales líquidos, siendo un estado intermedio entre líquido y sólido, son birrefringentes. Los cristales líquidos liotrópicos son formados por moléculas anfifílicas tales como los surfactantes, las cuales se organizan en solución para crear agregados anisotrópicos que se alinean en una dirección. De esta manera, el comportamiento de estos se ve afectado por la temperatura y la concentración [30].

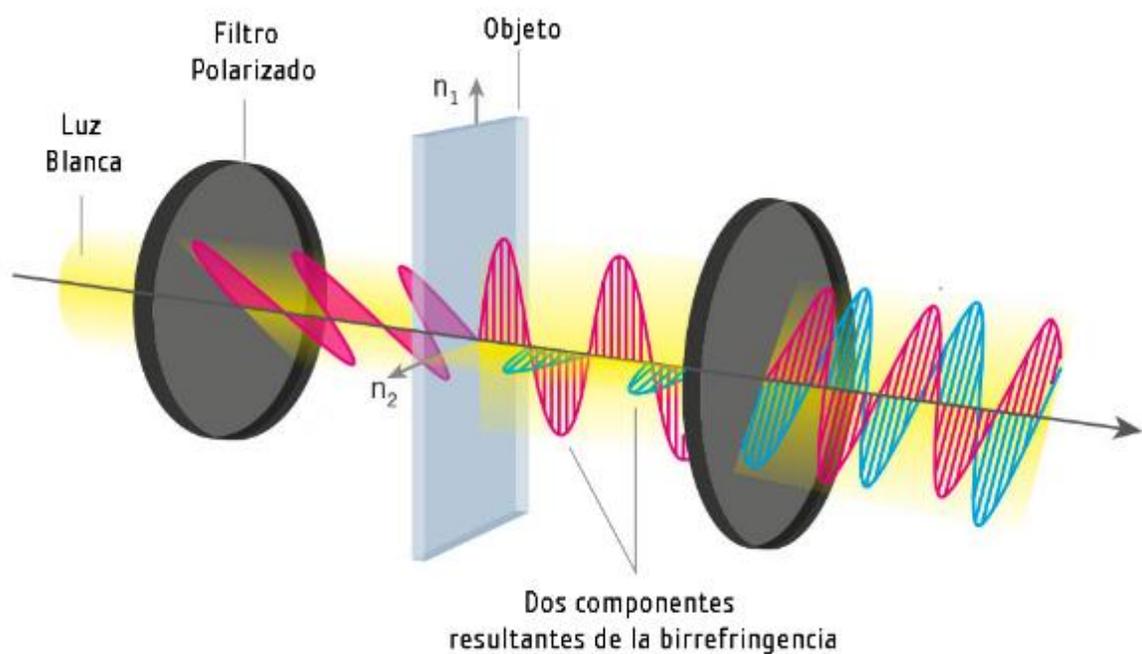


Figura 6. Birrefringencia de un material anisotrópico entre dos polarizadores cruzados.

2.6. Espectroscopía de Infrarrojo

La espectroscopía de infrarrojo es una de las técnicas de caracterización más importantes para la identificación de moléculas orgánicas. La técnica se basa en la vibración de los enlaces que existen entre los átomos de una molécula.

El espectro se obtiene haciendo pasar radiación infrarroja a través de una muestra y determinando la fracción de dicha radiación que fue absorbida a una energía en particular. Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia pueden ser comprendidas en términos de cambios en los dipolos moleculares asociados con vibraciones y rotaciones. Estos movimientos denominados modos normales de vibraciones o modos vibracionales son específicos para diferentes grupos funcionales [32].

Debido a que el objetivo principal de cualquier técnica espectroscópica de absorción es medir qué tan bien absorbe la luz una muestra a cada longitud de onda, la manera más intuitiva de obtener esta información es incidiendo un haz de luz monocromática a través de la muestra y medir cuánta luz es absorbida para cada longitud de onda.

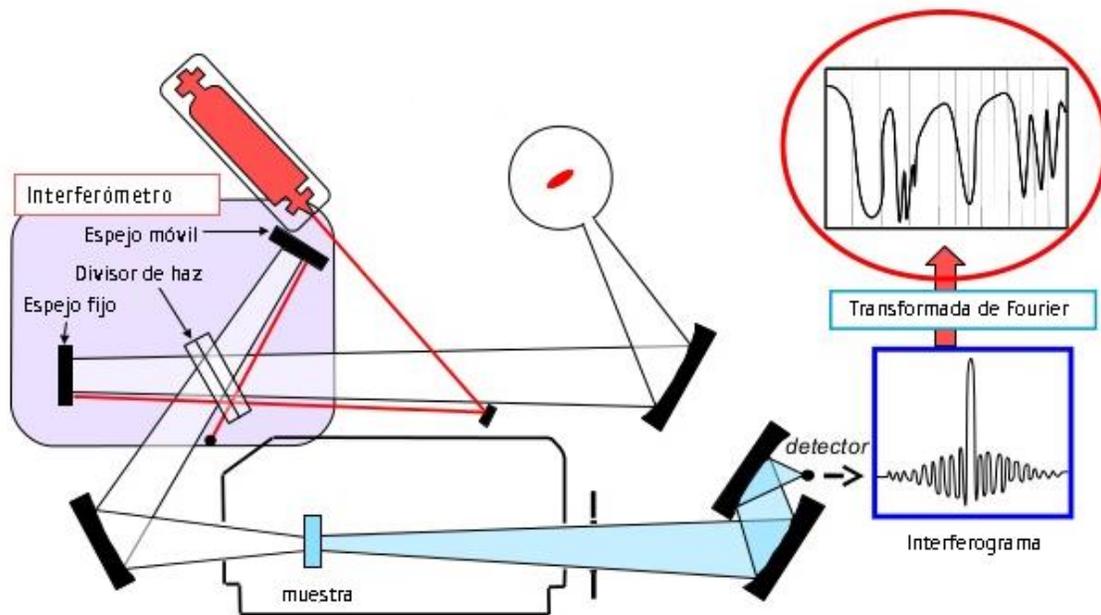


Figura 7. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier.

Sin embargo, en la técnica de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier se hace incidir un haz con luz a diferentes frecuencias y mide la cantidad de luz absorbida; esto se repite para diferentes combinaciones de frecuencias de manera que una computadora obtenga la suficiente cantidad de datos para inferir la absorción de cada longitud de onda. Para llevar a cabo este proceso se hace uso de un algoritmo llamado transformada de Fourier, el cual parte de un interferograma que convierte en el espectro de absorción del material [32]

2.7. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La determinación de casi cualquier molécula orgánica o biológica, así como de muchas moléculas inorgánicas comienza con la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Este proceso involucra llevar a cabo diferentes experimentos para deducir la estructura molecular basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos [32, 33].

En este experimento, la muestra es sometida a un campo magnético y la señal de resonancia magnética nuclear es producida por la excitación de sus núcleos. Como el campo magnético alrededor de un átomo en una molécula cambia la frecuencia de resonancia de manera única y característica para cada compuesto, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear es utilizado como un método definitivo de identificar compuestos orgánicos [33].

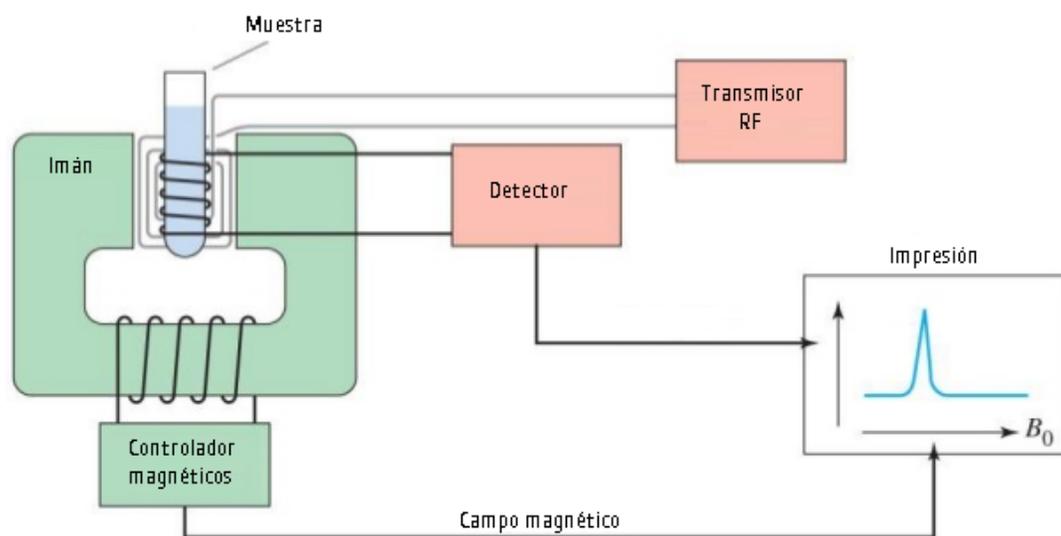


Figura 8. Representación esquemática del funcionamiento de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

III. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

Los siguientes reactivos fueron utilizados para la síntesis del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína:

- Ácido Oleico (natural, FCC) de Sigma-Aldrich.
- L-Cisteína (grado de alta pureza) de AMRESCO.
- N-Hidroxisuccinimida (98 %) de Aldrich.
- N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (99 %) de Alfa Aesar.
- Dimetilsulfóxido (ACS) de Merck Schuchardt.
- Hidróxido de Sodio (ACS) y Ácido Clorhídrico (36.5% - 38%) de Sigma.

3.2. Preparación de moléculas anfifílicas

Para la formación del bioconjugado final se llevó a cabo una síntesis de dos pasos mediada por Diciclohexilcarbodiimida (DCC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS) como se muestra en la Figura 9. El primer paso corresponde a la formación de un éster estable a partir de Ácido Oleico mediante el acoplamiento de la carbodiimida con el grupo carboxilo del ácido graso, seguido de su sustitución por NHS. El segundo paso corresponde al ataque nucleofílico de la amina primaria de la L-Cisteína.

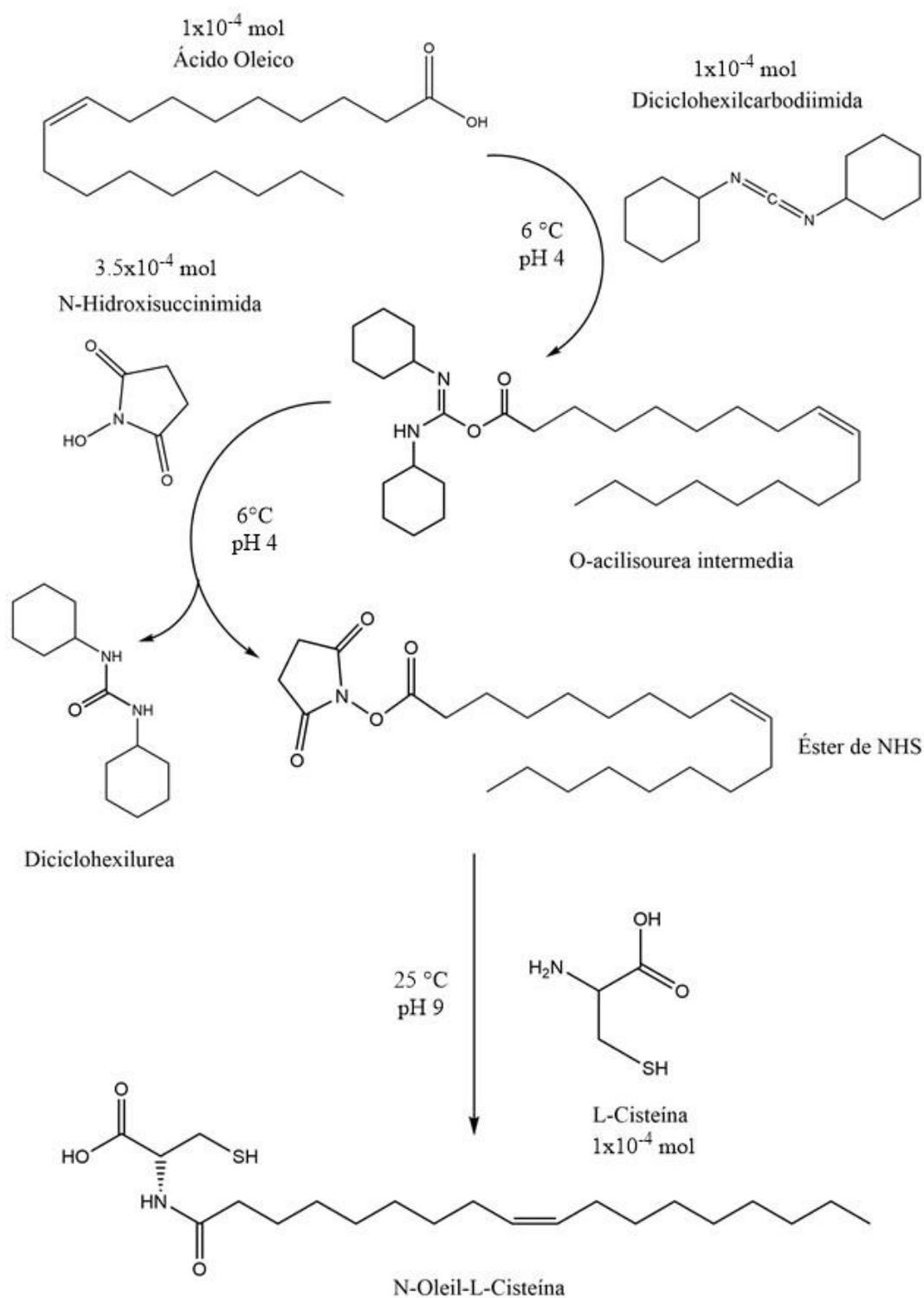


Figura 9. Esquema general de la reacción de conjugación mediada por carbodiimidas para la síntesis de moléculas anfifílicas de N-Oleil-L-Cisteína.

Los ésteres de N-Hidroxisuccinimida formados durante la primera etapa tienen suficiente estabilidad para permitir una reacción de dos pasos en la que las condiciones de la solución pueden ser ajustadas primero para favorecer la formación de ésteres, y posteriormente ser reajustadas para favorecer la reacción de amidación [35].

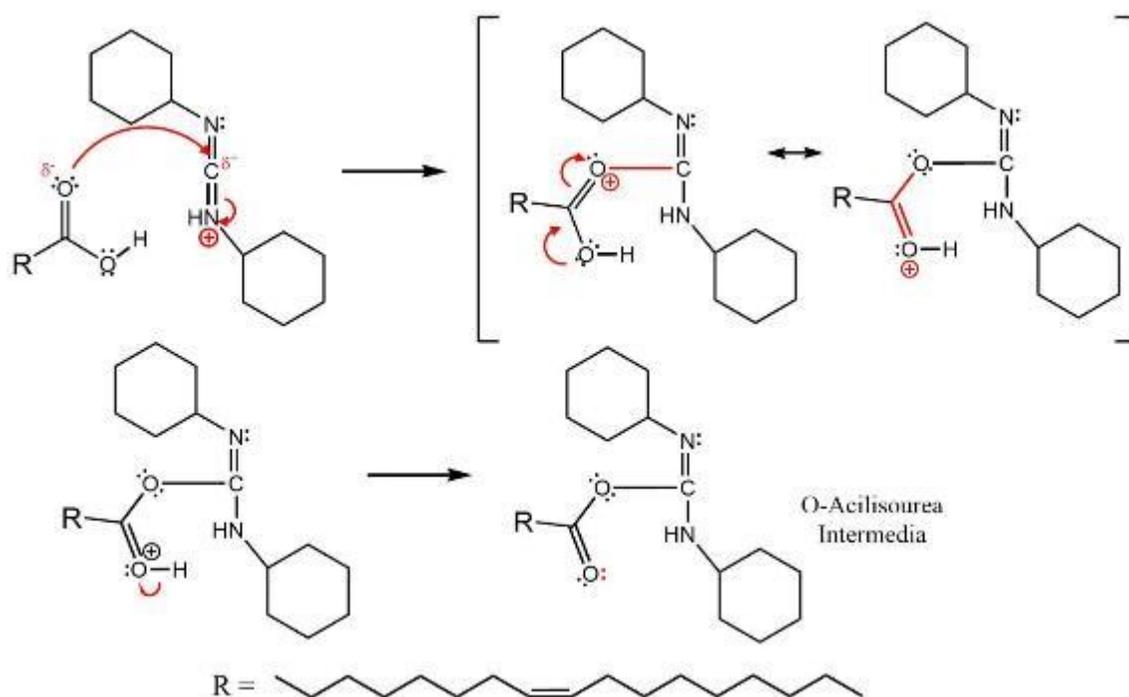


Figura 10. Mecanismo de reacción de formación de O-Acilisourea reportado en la literatura.

3.2.1. Paso 1: Esterificación del Ácido Oleico

Se prepararon 5 ml de una solución 0.02 M de Ácido Oleico, 5 ml de una solución 0.02 M de Diciclohexilcarbodiimida y 5 ml de una solución 0.07 M de N-Hidroxisuccinimida utilizando un solvente aprótico polar como dimetilsulfóxido como medio de reacción.

Para el primer paso de la síntesis, se mezclaron en 5 ml de solvente, las soluciones de N-Hidroxisuccinimida y Diciclohexilcarbodiimida recién preparadas. Debido a la ya conocida inestabilidad de la O-Acilisourea, algunos autores

sugieren que la disminución de la temperatura puede aumentar la vida media de dicha molécula en solución [35], por lo que la solución fue sometida a agitación magnética en baño frío a 6° C para evitar la formación de la N-Oleilurea una vez que el Ácido Oleico sea añadido.

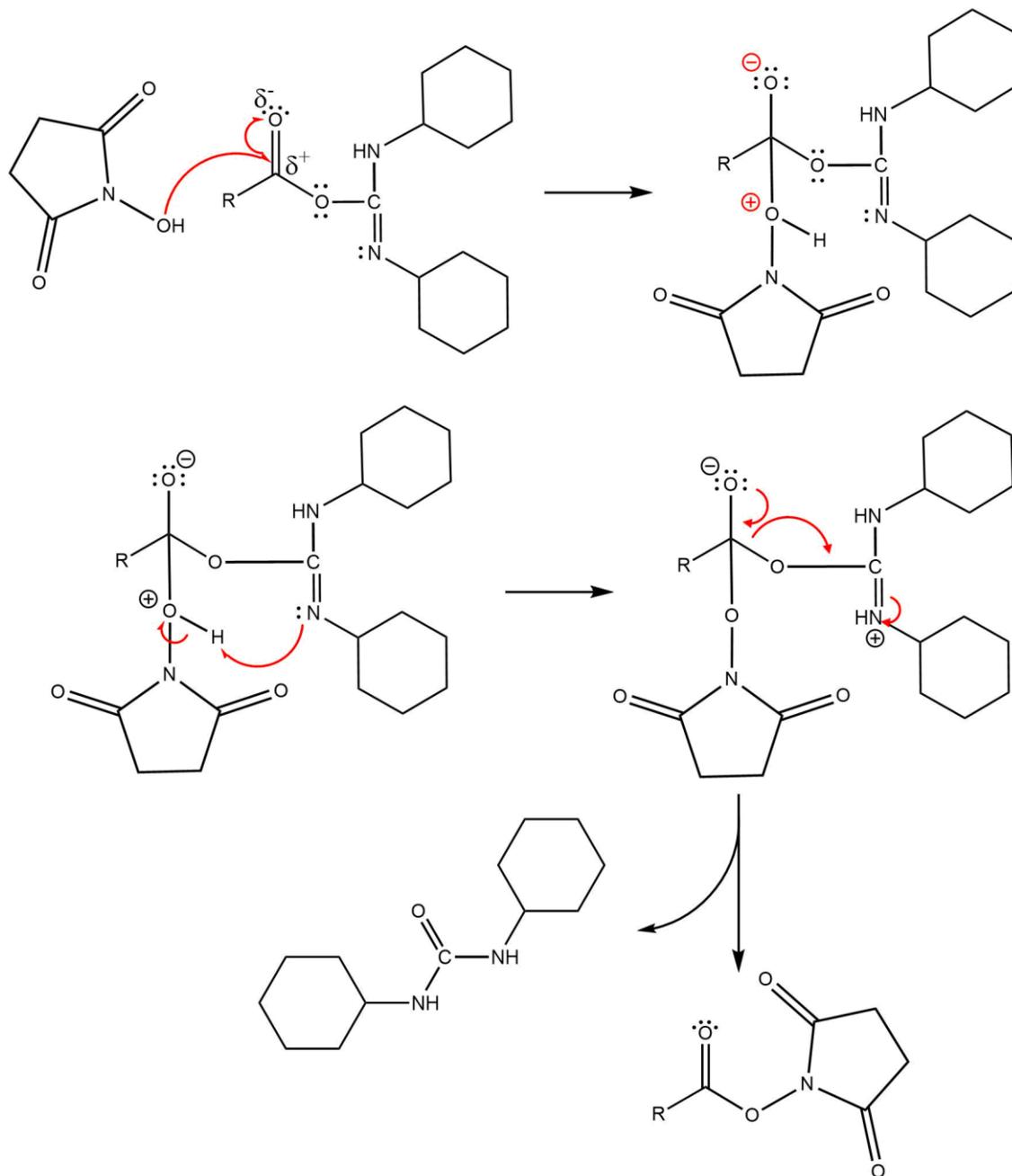


Figura 11. Formación del éster de N-Hidroxisuccinimida y de la Diciclohexilurea como subproducto de reacción.

Durante este paso, la protonación del nitrógeno de la carbodiimida facilita la formación de la O-Acilisourea debido a que dicha protonación reduce la densidad electrónica en el carbono central de la carbodiimida, favoreciendo el ataque nucleofílico del grupo carbonilo como se muestra en la Figura 10.

Tomando en cuenta lo anterior, y considerando que el Ácido Oleico tiene un pKa de 5.02, se agregó la solución de Ácido Oleico y se bajó el pH a 4 utilizando una solución de Ácido Clorhídrico 1 M con el fin de fomentar la protonación necesaria para la formación de la O-Oleilisourea intermedia.

En este paso ocurre la precipitación de la Diciclohexilurea a medida que la N-Hidroxisuccinimida sustituye el acoplamiento de la carbodiimida como se observa en la Figura 11.

3.2.2. Paso 2: Amidación con L-Cisteína

La reacción del éster de N-Hidroxisuccinimida con una amina es un ejemplo de ataque nucleofílico, para lo cual es necesario que la amina permanezca desprotonada. Después de 15 minutos de agitación, se ajustó la solución a pH 9 utilizando una solución de Hidróxido de Sodio 1 M y se agregaron directamente 0.0001 moles de L-Cisteína. La reacción se dejó en agitación por 3 h y posteriormente fue guardada en un tubo Falcon para dejar precipitar por completo el subproducto correspondiente a la Diciclohexilurea y a la N-Hidroxisuccinimida.

3.2.3. Separación de los productos de la Reacción

Se dejó reposar la mezcla por 24 horas para que el sólido se separara por gravedad, haciendo que este descienda y sea posible la extracción de la solución homogénea. Se extrajo dicha solución utilizando una micropipeta y se colocó en

un tubo Falcon. El precipitado fue sometido a tres ciclos de lavado para su purificación y caracterización.

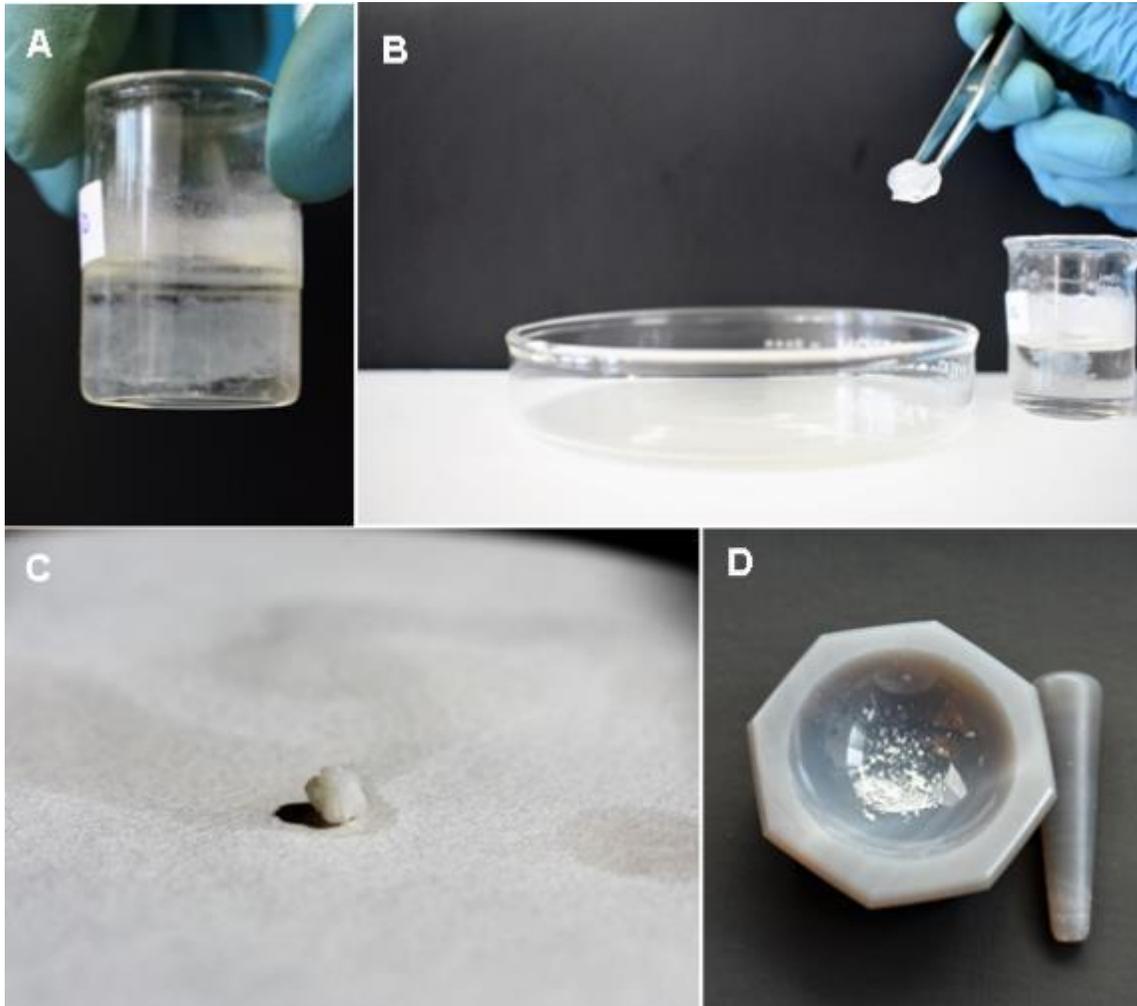


Figura 12. Proceso I de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína: (A) Formación de gel a pH 12, (B) extracción física del gel, (C) secado y (D) trituración de la muestra.

De la solución homogénea se tomó una muestra de 4 ml a la que se le añadió 1 ml de una solución 3 M de Hidróxido de Sodio para inducir la formación de un gel, el cual se dejó reposar por 24 horas para proceder a su separación.

Para extraer lo más posible el DMSO de la muestra, se tomaron dos caminos distintos. Uno de ellos involucró la separación mediante una membrana de diálisis

de 3500 Da por 1 hora, seguida de su secado y trituración, como se muestra en la Figura 13. La segunda vía consistió en la extracción directa del gel utilizando unas pinzas, seguida de dos lavados, su filtrado y su trituración mediante un mortero de ágata como se muestra en la Figura 12.



Figura 13. Proceso II de separación del bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína.

3.3. Métodos de Caracterización

3.3.1. Instrumentación General

Las mediciones de pH fueron realizadas utilizando un pH-metro digital modelo pH 2700 marca OAKTON. Las soluciones para el análisis de $^1\text{H-RMN}$ fueron homogenizadas utilizando un sonicador marca Branson modelo CPX2800H.

3.3.2. Inspección Visual

El análisis de los geles se realizó en primeramente por inspección visual. Además, se observó el comportamiento de la luz en los geles utilizando polarizadores cruzados para revelar el fenómeno de birrefringencia así como la separación de fases.

Se utilizó una cámara profesional Nikon D3400 y un filtro polarizado para realizar las fotografías presentes en este trabajo.

3.3.3. Microscopía Óptica

Las micrografías ópticas de los geles fueron tomadas utilizando un microscopio digital modelo VHX-5000 marca Keyence.



Figura 14. Microscopio Óptico Keyence VHX-5000

3.3.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ^1H fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker Avance 400 a 400 MHz. El polvo seco obtenido tras la

molienda se caracterizó por espectroscopía FT-IR para confirmar la ausencia de solvente y fue disuelto en DMSO deuterado a una concentración de 12 mg/ml utilizando baño ultrasónico.

3.3.5. Espectroscopía de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR)

Para este trabajo se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo marca Thermo Scientific modelo Nicolet iS50. La muestra fue colocada seca, en el caso del producto de la síntesis aislado, y en forma de gel, directamente sobre el cristal en modo ATR (Reflectancia Total Atenuada). El espectro fue medido en un rango entre 4000 y 500 cm^{-1} (64 escaneos por muestra).



Figura 15. Espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS50

3.4. Software

Las gráficas de Espectroscopía FT-IR fueron producidas utilizando OriginPro8. Los espectros de ^1H -RMN fueron analizados usando MestReNova v12.0.0 (Mestrelab Research S.L.). Se utilizó ChemDrawProfessional v16.0 (Cambridgesoft, Perkin Elmer Informatics) como herramienta de dibujo de las estructuras químicas y esquemas de reacciones y Jmol Model Kit v.14.29.22 para la estructura 3D y la estimación de la longitud de la molécula.

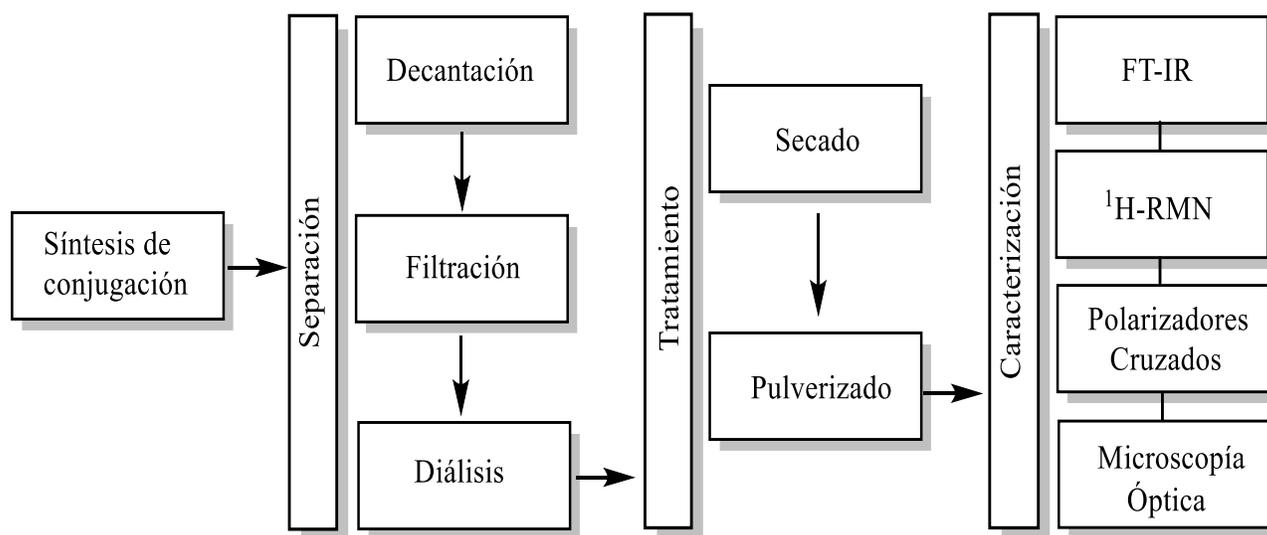


Diagrama 1. Esquema general de la metodología empleada para la síntesis de la molécula conjugada

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del producto de reacción

4.1.1. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 16 se observa la comparación entre el espectro FT-IR del ácido oleico, de la L-Cisteína y el de la molécula sintetizada a partir de la reacción de bioconjugación.

Ácido Oleico. A 3005 cm^{-1} se observa una banda agua correspondiente al estiramiento del enlace C-H adyacente a su insaturación. De igual manera se observan dos bandas muy marcadas en 2921 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos asimétricos y simétricos, respectivamente, de la cadena alquílica CH_2 . A 1710 cm^{-1} se observa la banda característica del grupo carboxilo presente en dicho ácido graso que corresponde al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del carbonilo.

L-Cisteína. A 3163 cm^{-1} se encuentra la banda representativa del estiramiento N-H del grupo amino de la molécula. Alrededor de 2536 cm^{-1} se observan las bandas de las vibraciones características del enlace S-H del grupo tiol y a los 635 cm^{-1} se puede observar también una banda agua correspondiente al enlace C-S [24, 36].

Bioconjugado de Ácido Oleico y L-Cisteína. A 3320 cm^{-1} se observa la primera diferencia respecto al espectro de ácido oleico, la cual corresponde a la vibración de estiramiento N-H del grupo amida. A su vez, se conservan las bandas de 3005 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} pero aparece una nueva banda en 2580 cm^{-1} , la cual se asocia con el estiramiento S-H del grupo tiol presente en la molécula. Se observa en 1705 cm^{-1} un ligero desplazamiento del grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$. En 1624 cm^{-1} aparece una nueva banda correspondiente a la vibración del conjunto denominado amida I, seguida de los estiramientos asimétricos y simétricos del grupo carboxilato COO^- en 1562 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} y 1401 cm^{-1} respectivamente.

Además, la banda correspondiente al enlace C-S se observa de forma pronunciada en 643 cm^{-1} indicando una fuerte presencia de este enlace en el producto formado.

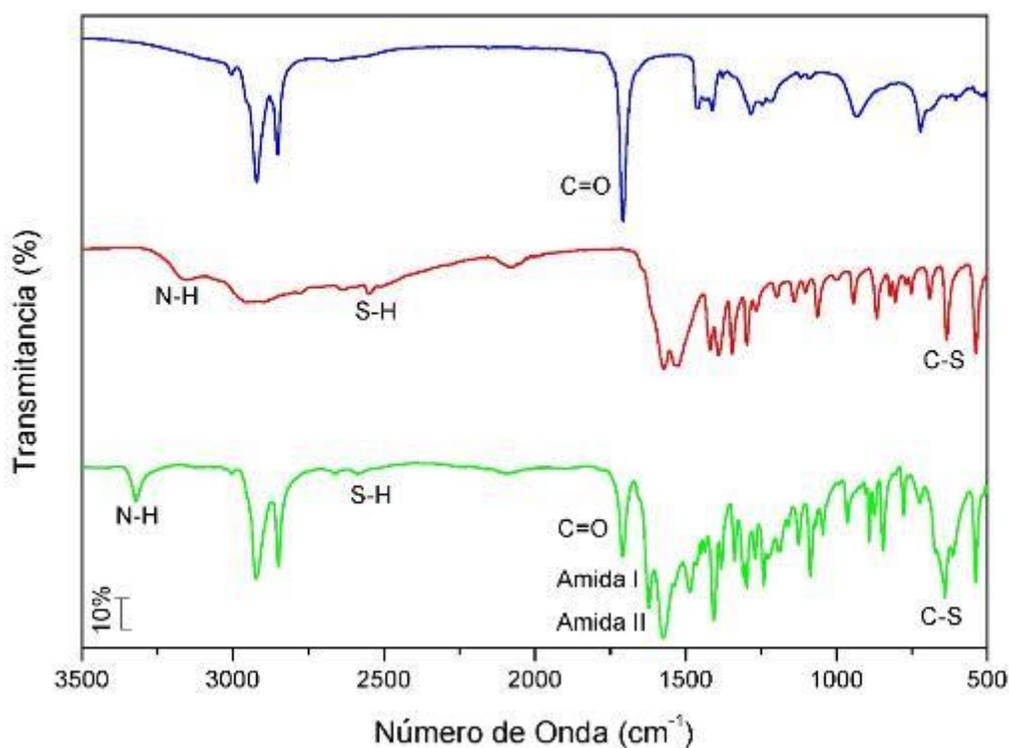


Figura 16. Espectros FT-IR de Ácido Oleico (Azul), L-Cisteína (Rojo) y el producto de reacción (Verde).

Tabla 1. Asignación de bandas de resultados de espectroscopía FT-IR del producto.

Número de Onda (cm^{-1})	Asignación	Referencia
643	$C - S$	[37]
1573	<i>Amida I</i>	[38]
1425 y 1401	COO^- simétrico	[38]
1624	<i>Amida II</i>	[39, 40]
1705	$C = O$	[11]
2580	$S - H$	[37, 38]
3320	$N - H$	[39, 40]

4.1.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H

En la Figura 17 se observa el espectro de resonancia magnética de protón del producto de reacción disuelto en DMSO-d_6 . A partir de las señales encontradas se propone la estructura que se muestra en la Figura 18 como correspondiente al producto de la reacción de bioconjugación.

La señal correspondiente al grupo metilo CH_3 terminal se encontró a $\delta_{\text{H}} = 0.85$ (H-19), seguido de las señales correspondientes a los protones alquílicos CH_2 de la cadena de ácido oleico $\delta_{\text{H}} = 1.23$ (H5-8, H13-18). Los protones del grupo metileno se encontraron en $\delta_{\text{H}} = 5.32$ (H-2 y H-3) y los protones de los carbonos más inmediatos a este se encontraron a $\delta_{\text{H}} = 1.98$ (H-1 y H-4). La señal correspondiente a los protones del grupo tiol $-\text{SH}$ se encontró en $\delta_{\text{H}} = 3.16$ (H-20, H-26, H-32) seguida de la señal de los protones del C_α en $\delta_{\text{H}} = 4.14$ (H-22, H-28, H-34).

Debido a que se utilizó DMSO deuterado como solvente para el análisis de resonancia magnética, no se observó una sustitución representativa de los protones del grupo hidroxilo y del grupo amida como suele observarse cuando se utiliza agua deuterada. Por consiguiente, se encontró la señal del protón del grupo hidroxilo en $\delta_{\text{H}} = 11.95$ (H-37) y en $\delta_{\text{H}} = 6.96-7.22$ (H-24, H-30, H-36) se encontraron las señales de los protones correspondientes a los tres grupos amidas que se encuentran en la molécula sintetizada.

Las señales en $\delta_{\text{H}} = 1.58-1.73$ se asocian con los protones alquílicos de los anillos ciclohexil del producto secundario de la reacción, la N-acilurea . De igual manera, se identifica en $\delta_{\text{H}} = 5.59$ el protón del nitrógeno en el grupo urea.

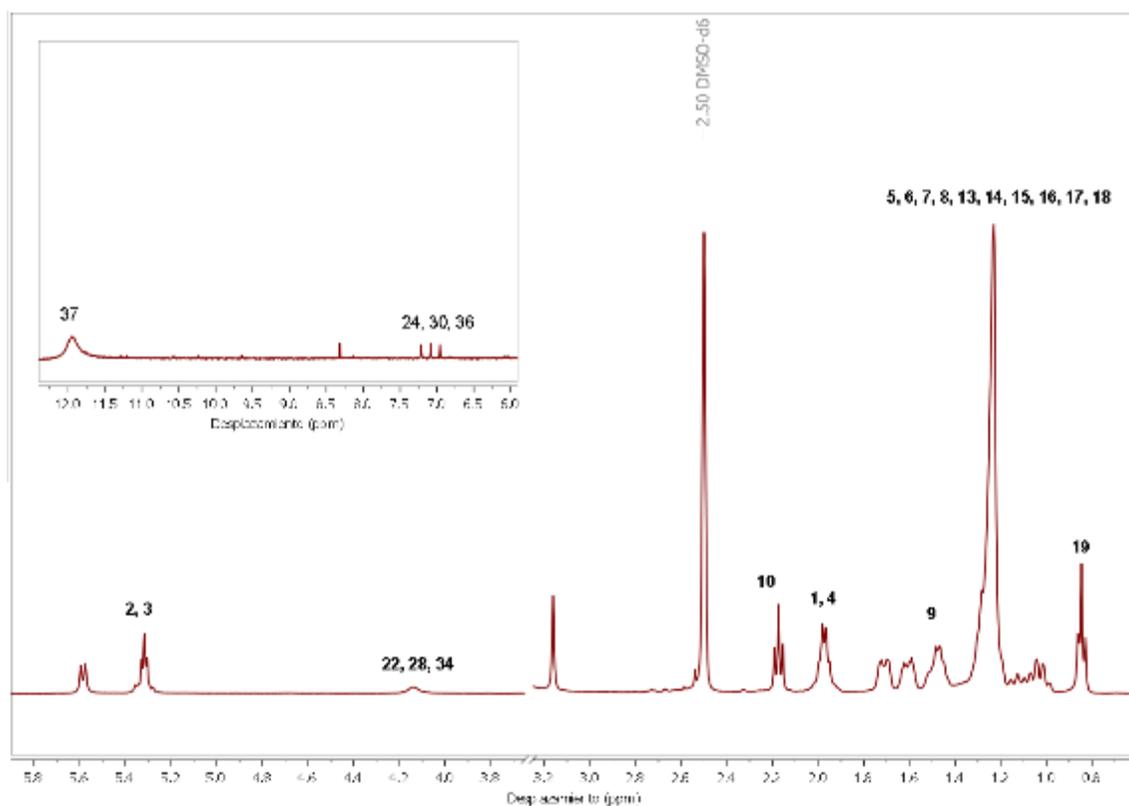


Figura 17. Espectro ^1H -RMN del producto de reacción usando DMSO-d_6 como solvente.

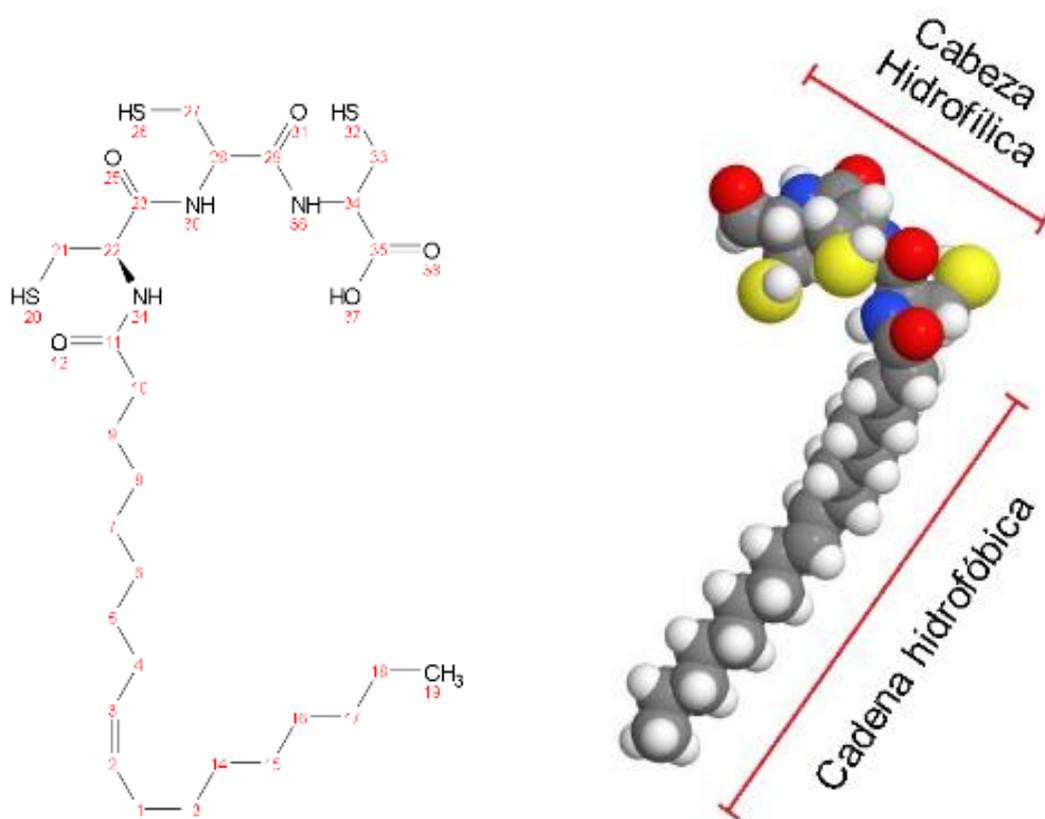


Figura 18. Estructura del producto de reacción elucidada a partir de los resultados del análisis de espectroscopía ^1H -RMN.

Tabla 2. Asignación de bandas de espectroscopía de ^1H -RMN para el producto.

Desplazamiento (ppm)	Asignación
0.85	H-19
1.23	H5-9, H-13-18
1.98	H-1, H-4
3.16	H-20, H-26, H-32
4.14	H-22, H-28, H-34
5.32	H-2, H-3
11.95	H-37
6.96-7.22	H-24, H-30, H-36

4.2. Autoensamblaje de la molécula anfifílica

4.2.1. Gelificación

Uno de los principales inconvenientes de la conjugación de moléculas mediante el uso de carbodiimidas es la cantidad de subproductos que se obtienen durante la síntesis, lo cual dificulta la caracterización del producto buscado. Por esta razón se busca aislar, de manera sencilla, el producto principal de la reacción aprovechando la tendencia a auto ensamblarse que presentan las moléculas anfifílicas de naturaleza similar a la sintetizada.

De acuerdo a la estructura elucidada a partir del análisis de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 18), la molécula posee tres grupos amida y por lo tanto tres grupos tiol en su componente polar.

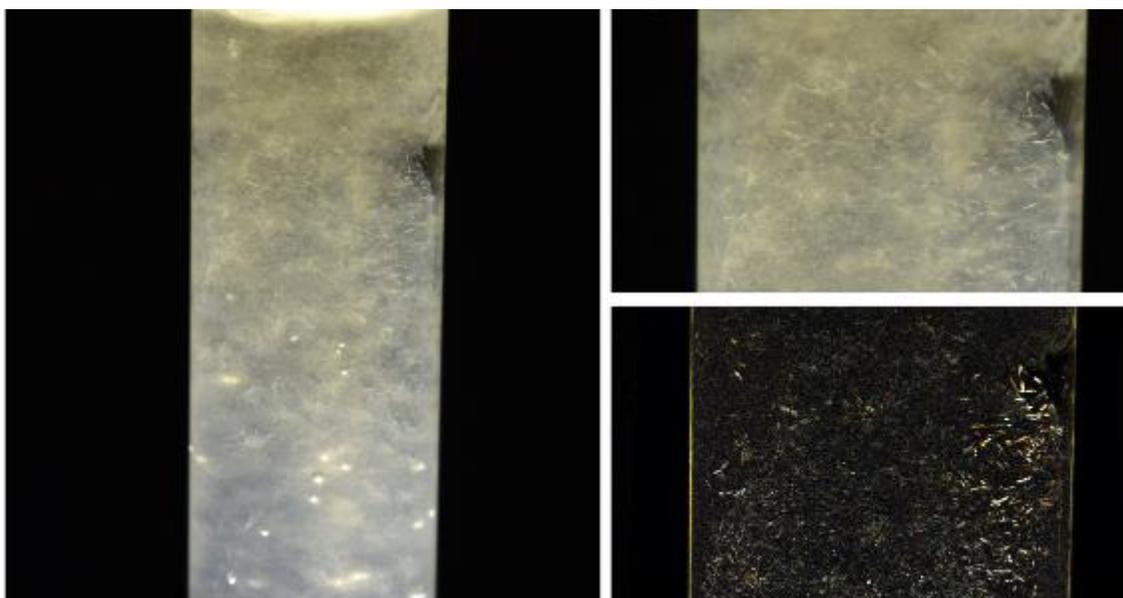


Figura 19. Gelificación del producto crudo de la bioconjugación a pH 12.

Se sabe que el grupo amida es capaz de formar puentes de hidrogeno tanto con otros grupos amida como con agua [42]. A su vez estudios recientes han

mostrado que la habilidad del grupo tiol S-H de formar puentes de hidrogeno con el grupo N-H de la amida es tan fuerte como la de la contraparte con oxígeno [43].

Como consiguiente, después de separar por decantación la Diciclohexilurea, se añade agua y se sube el pH a 12 el crudo del producto utilizando hidróxido de sodio para promover el autoensamblaje de la molécula en una forma más fácilmente separable como se observa en la Figura 19.

Después de extraer el gel y eliminar el solvente mediante los dos métodos descritos en la sección de metodología, no se observó una diferencia significativa entre los dos procesos de eliminación de DMSO. Tras secar y triturar el producto, se obtuvo un polvo blanco que al disolver en agua en una concentración de 2.25 mg/ml (pH 9.5) forma un sistema coloidal tomando como evidencia el efecto Tyndall, como se observa en la primera imagen de la Figura 20. Además, después de subir el pH a 12, se observó la formación de un gel flotando sobre la solución.

De manera comparativa se estudió el comportamiento del producto de reacción utilizando DMSO como cosolvente a dos pH distintos. En la Figura 20 se observa dicho comportamiento. A pH 4 se observa la separación de una fase que flota sobre la superficie. A pH 12 se observa la gelificación del producto de reacción. Para entender el efecto del DMSO como cosolvente es conveniente recordar cómo interactúan las moléculas de agua con moléculas anfifílicas tales como las sintetizadas en este trabajo. Las moléculas de agua poseen dos protones que les permiten formar puentes de hidrógeno; tanto entre ellas como con las cabezas polares de moléculas anfifílicas.

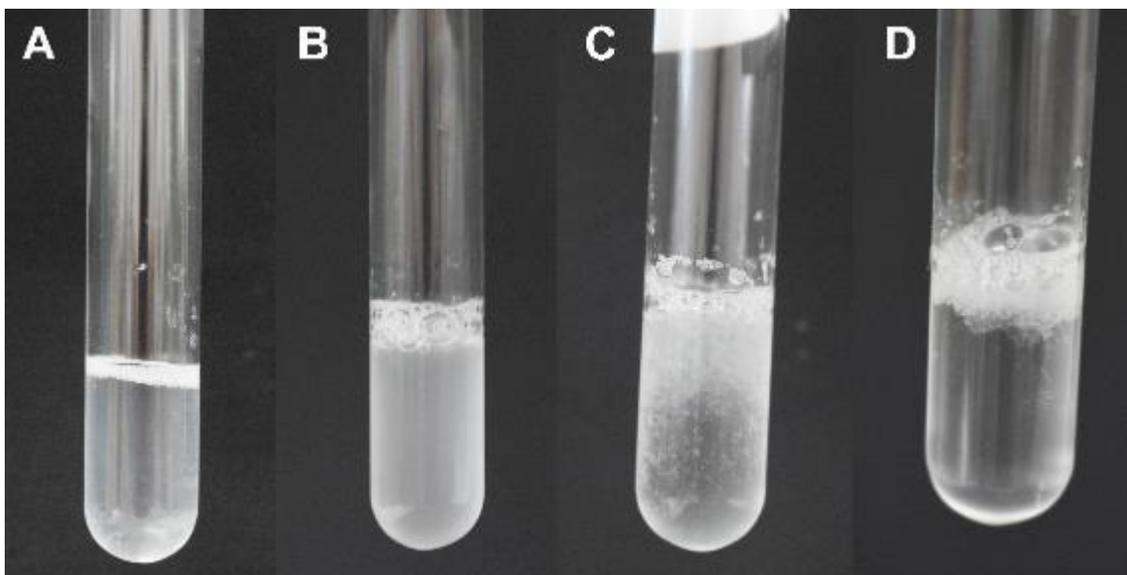


Figura 20. Solución del producto de reacción en agua (A) a pH 9.5, (B) justo después de subir el pH a 12, (C) 30 minutos después y (D) una hora después.

Por su parte, el dimetilsulfóxido es una pequeña molécula anfifílica con el grupo sulfóxido como componente hidrofílico y dos grupos metilos hidrofóbicos. Aunque las moléculas de dimetilsulfóxido no tienen protones capaces de replicar el mismo comportamiento que presentan los protones de las moléculas de agua, su átomo de oxígeno es capaz de formar puentes de hidrógeno.

Su pequeño tamaño y su naturaleza anfifílica le permiten interactuar con los diferentes grupos que coexisten en la interfase entre agua y el surfactante. Algunos autores sugieren que la parte hidrofílica del DMSO interactúa con el agua mediante puentes de hidrógeno, al mismo tiempo que sus grupos metilos interactúan con las cabezas polares del surfactante por fuerzas de van der Waals que afectan la región interna de la membrana hidrofóbica [37–39].

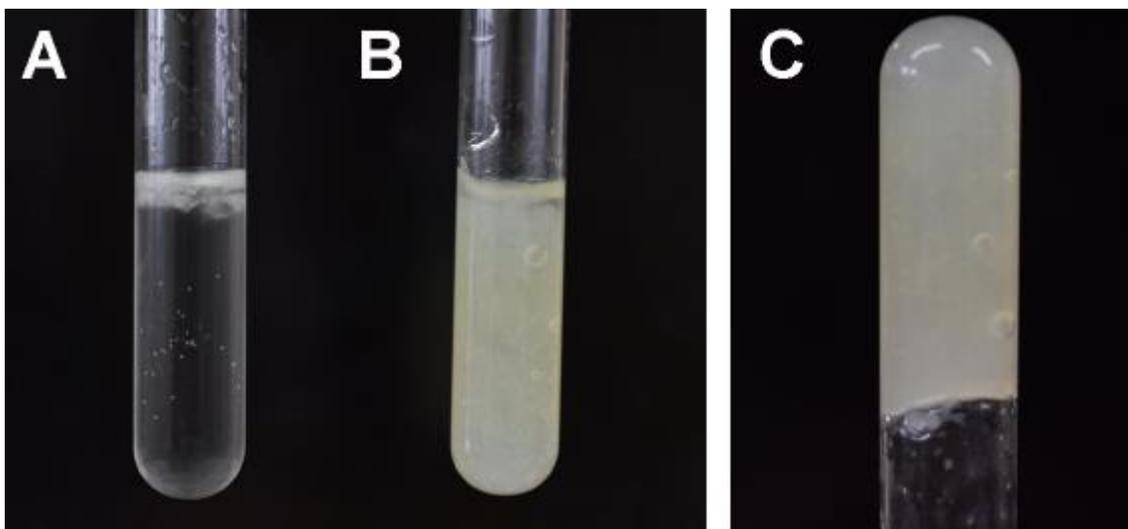


Figura 21. Producto de reacción disuelto en un sistema DMSO-Agua a (A) pH 4 y (B, C) pH 12.

De esta manera el DMSO ocupa la región interna de la interfase donde su carácter dual actúa como estabilizador en presencia de las moléculas de agua, deshidratando parcialmente la región polar de la membrana e incrementando la presencia de agua en las partes más internas de la interfase [44]. De esta forma se asocia la formación de poros de agua estables con la permeabilidad inducida por las moléculas de DMSO [45].

4.2.2. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier

En la Figura 22 se observa el ensanchamiento de la banda característica del enlace N-H del grupo amida, así como el desplazamiento de los enlaces S-H del grupo tiol, del carbonilo C=O y de la banda amida I. Este comportamiento sugiere la formación de puentes de hidrógeno en los geles creados en el sistema DMSO-agua.

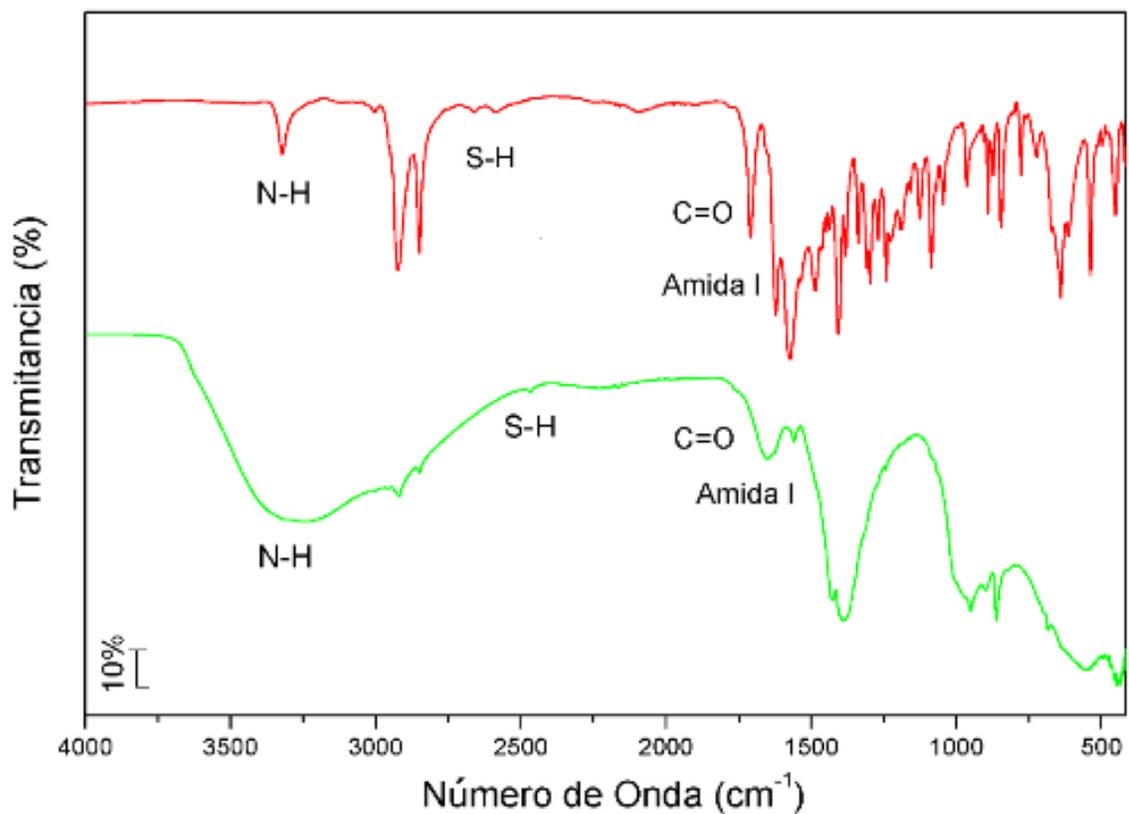


Figura 22. Espectros FT-IR del producto de reacción (rojo) y gel formado en el sistema DMSO-agua (verde).

Tabla 3. Diferencias en las bandas de absorción entre el producto en forma de polvo y en forma de gel en el sistema DMSO-agua.

Asignación	Número de Onda (cm^{-1})	
	Polvo	Gel
Amida I	1573	1561
$C = O$	1705	1649
$S - H$	2580	2468
$N - H$	3320	3260

4.2.3. Microscopía Óptica

En la Figura 23 se muestran las fotomicrográficas obtenidas de los geles formados a pH 12. En la micrografía A se observa la aparición de una fase cristalina en los geles formados en el sistema DMSO-Agua. En la imagen C se observa más de cerca el patrón en el que se ordena la molécula en presencia del cosolvente.

En la imagen B se observa el comportamiento fibroso del gel formado usando únicamente agua como medio de gelificación. En la micrografía D se tiene un acercamiento del mismo gel, donde se observa un patrón similar pero más pequeño que el observado en el sistema DMSO-Agua.

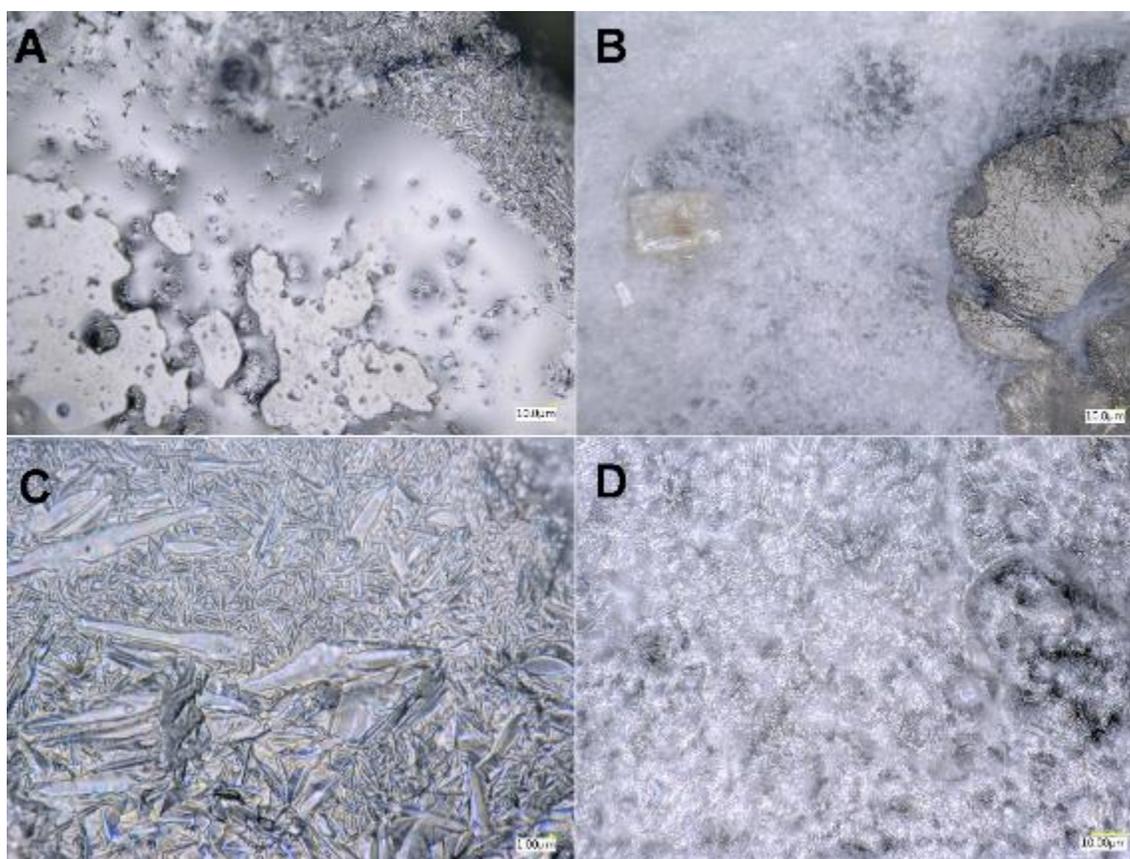


Figura 23. Fotomicrográficas de los geles formados a partir del bioconjugado final. Geles formados a pH 12 (A y C) en un sistema DMSO-agua y (B y D) en agua.

4.2.4. Polarizadores Cruzados

Al observar los geles a través de polarizadores cruzados se observó el fenómeno de birrefringencia, indicando la presencia de algún tipo de mesofase liotrópica capaz de desviar la luz. En la Figura 24 se observa que el producto de reacción en solución de DMSO no presenta birrefringencia. Al subir el pH con una solución acuosa de hidróxido de sodio, esta presenta fases birrefringentes hacia tonalidades azules. Además, se logra apreciar la formación de una capa rígida del material en la superficie.

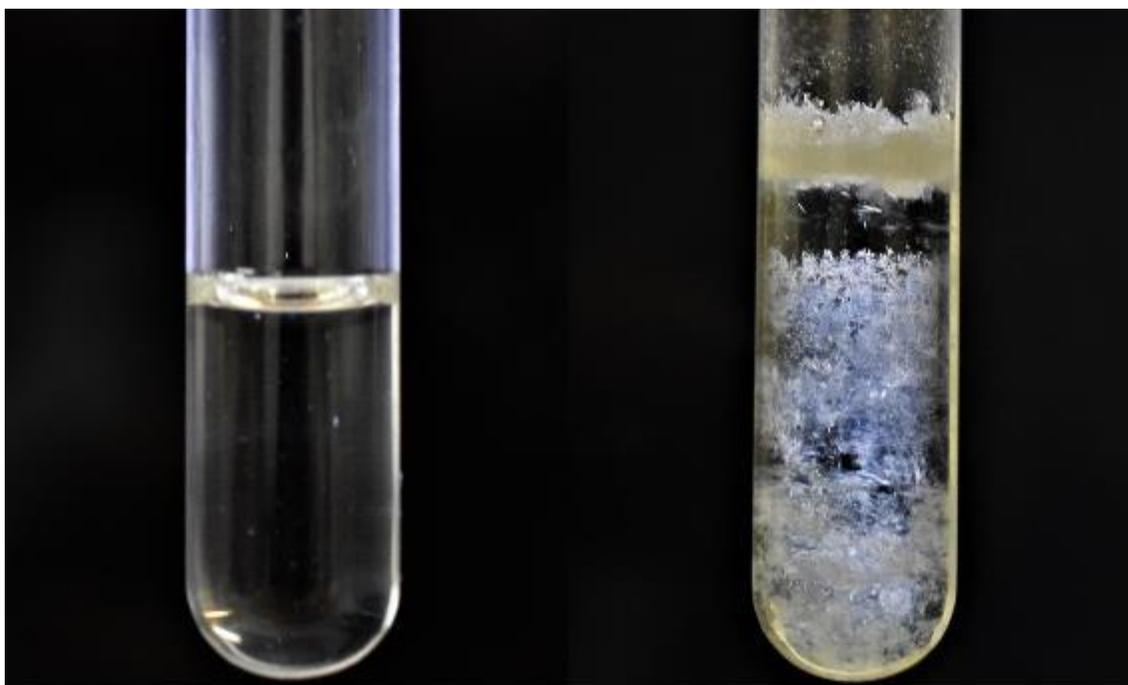


Figura 24. Fotografías del bioconjugado en una solución de DMSO (izquierda) y en el sistema DMSO-agua (derecha) a través de dos polarizadores cruzados.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se logró sintetizar un bioconjugado de L-Cisteína y Ácido Oleico mediante una reacción de acoplamiento asistida por carbodiimidas.
- El análisis de Espectroscopía Infrarroja confirmó la formación de un grupo amida característico del acoplamiento de los componentes y la ausencia de puentes disulfuro para las condiciones de síntesis utilizadas.
- El estudio de Resonancia Magnética Nuclear de protón confirmó el acoplamiento de tres unidades de L-Cisteína a la cadena de ácido oleico y la presencia del subproducto de la reacción de bioconjugación.
- La caracterización por Microscopía Óptica y la inspección visual de los geles a través de polarizadores cruzados confirmó la formación de estructuras anisotrópicas de la molécula sintetizada.
- El análisis cualitativo de inspección visual reveló que al aumentar la concentración del bioconjugado en los sistemas DMSO-Agua, se forman geles más mecánicamente estables.

5.2. Recomendaciones

- Se sugiere realizar un estudio más profundo sobre el comportamiento de la molécula anfifílica en presencia de otros solventes orgánicos y otros cosolventes de naturaleza similar al DMSO.
- Se recomienda realizar un estudio de conductimetría para definir los parámetros de concentración micelar crítica de la molécula sintetizada.
- Se sugiere realizar estudios de dispersión de luz dinámica para medir el tamaño de partícula.
- Además, se propone realizar estudios de dispersión de rayos X de ángulo pequeño para identificar las fases birrefringentes presente en las mezclas DMSO-agua.
- Se sugiere también el uso de otros métodos de separación para aislar la molécula sintetizada tales como cromatografía líquida de alta eficiencia que permitan la estimación del rendimiento de la reacción.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Rondel, I. Alric, Z. Mouloungui, J. F. Blanco, and F. Silvestre, "Synthesis and properties of lipoamino acid-fatty acid mixtures: Influence of the amphiphilic structure," *J. Surfactants Deterg.*, 2009.
- [2] L. Pinheiro and C. Faustino, "Amino Acid-Based Surfactants for Biomedical Applications," in *Application and Characterization of Surfactants*, InTech, 2017.
- [3] R. Bordes and K. Holmberg, "Amino acid-based surfactants – do they deserve more attention?," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 222, pp. 79–91, Aug. 2015.
- [4] Z. M. Ziora, M. A. Blaskovich, I. Toth, and M. A. Cooper, "Lipoamino acids as major components of absorption promoters in drug delivery.," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 12, no. 14, pp. 1562–80, 2012.
- [5] I. A. Nnanna and J. Xia, *Protein-based surfactants: synthesis, physicochemical properties, and applications*. M. Dekker, 2001.
- [6] D. Myers, *Surfactant science and technology*. J. Wiley, 2006.
- [7] D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, and P. Calandra, "Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches," *Adv. Condens. Matter Phys.*, vol. 2015, pp. 1–22, Dec. 2015.
- [8] M. J. Rosen and J. T. Kunjappu, *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [9] X. Zhang and C. Wang, "Supramolecular amphiphiles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 94–101, Dec. 2011.
- [10] J. A. Alkrad, A. Shukla, Y. Mrestani, and R. H. H. Neubert, "Investigation in W/O developed microemulsions with DMSO as a cosurfactant.," *Pharmazie*, vol. 71, no. 5, pp. 258–62, May 2016.
- [11] K. X. Resende, M. A. Corrêa, A. G. de Oliveira, and M. V. Scarpa, "Effect of cosurfactant on the supramolecular structure and physicochemical properties of non-ionic biocompatible microemulsions," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 44, no. 1, pp. 35–42, Mar. 2008.
- [12] V. Sharma, P. Cantero-López, O. Yañez-Osses, and A. Kumar, "Effect of

- Cosolvents DMSO and Glycerol on the Self-Assembly Behavior of SDBS and CPC: An Experimental and Theoretical Approach,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 63, no. 8, pp. 3083–3096, Aug. 2018.
- [13] P. Mehtälä, D. H. Pashley, and L. Tjäderhane, “Effect of dimethyl sulfoxide on dentin collagen,” *Dent. Mater.*, vol. 33, no. 8, pp. 915–922, Aug. 2017.
- [14] N. Kharasch and B. S. Thyagarajan, “Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 411, pp. 391–402, 1983.
- [15] H. H. Szmant, “Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 243, pp. 20–3, Jan. 1975.
- [16] M. C. Morán *et al.*, “‘Green’ amino acid-based surfactants,” *Green Chem.*, vol. 6, no. 5, pp. 233–240, May 2004.
- [17] M. R. Infante *et al.*, “Amino acid-based surfactants,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 7, no. 6–7, pp. 583–592, Jun. 2004.
- [18] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, and C. L. Borders, “Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution,” *Anal. Biochem.*, vol. 184, no. 2, pp. 244–248, Feb. 1990.
- [19] “ADVANCES IN LIPID RESEARCH,” *Index to Rev. Symp. Vol. Monogr. Org. Chem.*, p. 15, Jan. 1966.
- [20] N. J. CARTWRIGHT, “Serratamic acid, a derivative of L-serine produced by organisms of the Serratia group.,” *Biochem. J.*, vol. 60, no. 2, pp. 238–42, Jun. 1955.
- [21] K. Sakamoto, R. Y. Lochhead, H. I. Maibach, and Y. Yamashita, *Cosmetic science and technology : theoretical principles and applications*. .
- [22] G. Bulaj, “Formation of disulfide bonds in proteins and peptides,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 23, no. 1, pp. 87–92, Jan. 2005.
- [23] R. G. Weiss and P. (Pierre) Terech, *Molecular gels : materials with self-assembled fibrillar networks*. Springer, 2006.
- [24] P. Komarov, M. Ovchinnikov, S. Khizhnyak, V. Alekseev, I. Mikhailov, and P. Pakhomov, “On Molecular Gelation Mechanism of L-Cysteine Based Hydrogel,” *Nanosci. Nanoeng.*, vol. 1, no. 1, pp. 23–35, 2013.

- [25] H. J. Reich, "No Title," *Proton chemical shifts*, 2018. [Online]. Available: <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/h-data/hdata.htm>.
- [26] J. R. Dunetz, J. Magano, and G. A. Weisenburger, "Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 20, no. 2, pp. 140–177, Feb. 2016.
- [27] S. Sarkar, P. Choudhury, S. Dinda, and P. K. Das, "Tailor-Made Self-Assemblies from Functionalized Amphiphiles: Diversity and Applications," *Langmuir*, vol. 34, no. 36, pp. 10449–10468, Sep. 2018.
- [28] C. Fong, T. Le, and C. J. Drummond, "Lyotropic liquid crystal engineering—ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 1297–1322, Jan. 2012.
- [29] M. Bhuyan, *Measurement and control in food processing*. CRC/Taylor & Francis, 2007.
- [30] S. S. Z. Hindi, "Birefringences of bio-based liquid crystals." 2017.
- [31] B. Amos, "Birefringence for facetors I : what is birefringence?"
- [32] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. Wiley, 2004.
- [33] B. Fürtig, C. Richter, J. Wöhnert, and H. Schwalbe, "NMR Spectroscopy of RNA," *ChemBioChem*, vol. 4, no. 10, pp. 936–962, Oct. 2003.
- [34] J. B. Lambert, E. P. Mazzola, and C. Ridge, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*. .
- [35] S. A. Madison and J. O. Carnali, "pH Optimization of Amidation via Carbodiimides," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 52, no. 38, pp. 13547–13555, Sep. 2013.
- [36] F. Kogelheide *et al.*, "FTIR spectroscopy of cysteine as a ready-to-use method for the investigation of plasma-induced chemical modifications of macromolecules," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 2016.
- [37] A. López-Millán *et al.*, "Aqueous-Organic Phase Transfer of Gold and Silver

- Nanoparticles Using Thiol-Modified Oleic Acid,” *Appl. Sci.*, 2017.
- [38] D. G. Cameron, J. Umemura, P. T. T. Wong, and H. H. Mantsch, “A fourier transform infrared study of the coagel to micelle transitions of sodium laurate and sodium oleate,” *Colloids and Surfaces*, 1982.
- [39] D. N. Yea, S. M. Lee, S. H. Jo, H. P. Yu, and J. C. Lim, “Preparation of Environmentally Friendly Amino Acid-Based Anionic Surfactants and Characterization of Their Interfacial Properties for Detergent Products Formulation,” *J. Surfactants Deterg.*, 2018.
- [40] D. Bajani, D. Gharai, and J. Dey, “A comparison of the self-assembly behaviour of sodium N-lauroyl sarcosinate and sodium N-lauroyl glycinate surfactants in aqueous and aqueo-organic media,” *J. Colloid Interface Sci.*, 2018.
- [41] L. J. Bellamy, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1975.
- [42] A. Johansson, P. Kollman, S. Rothenberg, and J. McKelvey, “Hydrogen bonding ability of the amide group,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 96, no. 12, pp. 3794–3800, Jun. 1974.
- [43] V. R. Mundlapati, S. Ghosh, A. Bhattacharjee, P. Tiwari, and H. S. Biswal, “Critical Assessment of the Strength of Hydrogen Bonds between the Sulfur Atom of Methionine/Cysteine and Backbone Amides in Proteins,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 6, no. 8, pp. 1385–1389, Apr. 2015.
- [44] M.-A. de Ménorval, L. M. Mir, M. L. Fernández, and R. Reigada, “Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e41733, Jul. 2012.
- [45] A. A. Gurtovenko and J. Anwar, “Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 35, pp. 10453–10460, Sep. 2007.
- [46] D. Mandal, S. Dinda, P. Choudhury, and P. K. Das, “Solvent Induced Morphological Evolution of Cholesterol Based Glucose Tailored

Amphiphiles: Transformation from Vesicles to Nanoribbons," *Langmuir*, vol. 32, no. 38, pp. 9780–9789, Sep. 2016.