



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Estudio estructural y supramolecular de pequeñas moléculas de relevancia biológica: síntesis de materiales bioinspirados y sus potenciales aplicaciones

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física

Lic. Federico Movilla

Directora de Tesis: Dra. Florencia Di Salvo

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Alborés

Lugar de Trabajo: Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambientes y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2024

*Sueña siempre. Sueña, intenta,
y así pronto triunfarás.
Hazlo todo con amor,
y pon mucha atención.*

*Sueña siempre. Sueña, intenta,
y así pronto triunfarás.
Confío en ti, lo lograrás.
¡No pares de correr!*

Agradecimientos

Ichi-go ichi-e (一期一会, «una vida, un encuentro»)

Stephen King en su obra “Un Saco de Huesos” ilustra de manera muy clara lo desafiante que resulta emplear palabras cuando uno quiere describir personas:

“Comparado con el hombre más vulgar que camina por la faz de la tierra y proyecta allí su sombra, el más brillante de los personajes de una novela no es más que un saco de huesos.”

Este apartado no tiene como fin ser una lista exhaustiva de todas las instituciones que propiciaron de peldaños para llegar hasta acá. Eso sería casi una falta de respeto al rol esencial que tuvieron, todas y cada una de las personas que pusieron su granito de arena, en ayudar a transformar una red conceptual de ideas y decisiones en esta travesía que está por culminar.

Difícilmente sea posible dejar plasmado en palabras el impacto que tuvieron en mi vida, y en esta tesis, las personas que están a punto de ser nombradas. Aunque, en un humilde intento de dejar al menos un registro de quienes formaron parte de este camino, presento a continuación una lista de protagonistas y roles.

Sería fácil recaer en el cliché de empezar diciendo “a mi familia”. Particularmente en mi caso, en donde este término abarca a una cantidad abrumadora de personas que me han regalado la oportunidad y el privilegio de permitirme formar parte de sus familias. Los Katz, los Ferreyra, los Romero-Ratell, los Defelice, los Balderrama, los Bontempi, los Vaquero y, por sobre todos, los Movilla-Zucchi-Paire.

También sería un poco tibio ir a lo seguro y decir “a mis viejos, Graciela y Claudio” o “A mis hermanas, La Trini y La Mili.” (Si, con el “La” adelante que denota unicidad. Difícilmente, y gracias a dios, existan otras dos hermanas iguales). Es bien sabido que sería necesario ser un gran lingüista para encontrar las palabras que describan de forma precisa el impacto que tuvieron, tienen y tendrán en todas y cada una de las decisiones que me atraviesan cotidianamente. Esta tesis, más allá de su rol académico, es fruto y testimonio de las consecuencias que trae una vida vivida con amor, ternura, cariño, curiosidad y sensibilidad. Los cinco pilares sobre los que se construyó esta familia y que, a día de hoy, siguen sentando las bases para su crecimiento.

Así como cada apartado de esta tesis fue diseñado específicamente para cumplir un rol esencial, intransferible, y trascendental, en lo académico, creo que este es el espacio donde ese academicismo encuentra su contrapunto sociocultural. Así como uno enumera el instrumental empleado a la hora de informar los resultados de un trabajo, también me parece necesario dejar en claro el conjunto de instituciones que permitieron que esta tesis pueda ser llevada a cabo.

Mi jardín de infantes, donde empecé a entender que pensar era una herramienta espectacular para resolver problemas para los que el cuerpo no había diseñado un órgano

en específico; mi escuela primaria, donde adquirí esas primeras herramientas que me supieron acompañar a lo largo de todo estos años; mi escuela secundaria, en donde enfrenté por primera vez a la ciencia y me asomé a ese abismo de incertezas que hoy se refleja con una fuerza desmedida en este trabajo; y mi universidad, la cual me dio las bases para ser el profesional que ahora acude a doctorarse. Universidad que también me permitió encontrar en el camino a personas hermosas: A Florencia Di Salvo, A Juan Manuel Rey, a José Hodak, a Rosario Borda, A Maricel Rodriguez, a Leo Cantoni, a Vicente Povse, a Walter, y a un enorme grupo de científicas, científicos y profesionales que son el vivo ejemplo de lo espectacular y desafiante que es hacer ciencia, más aún en este país. Ojalá, quien quiera que esté leyendo esto, haya leído hasta esta parte estando sentado. Porque realmente ameritaba ponerse de pie a medida que todos eran nombrados.

Aunque no solo la academia es el espacio donde se desarrolla una idea, en tanto esta hace mecha en una mente, pero luego debe hacer carne y llevarse a cabo. Y esta materialización de la mente no podría haberse llevado a cabo sin mi Dojo, Shoshin, y mi Dojang, Chumok. Espacios indispensables para el correcto funcionamiento de un Fede cualquiera.

Pero todas estas instituciones, que no son más que un conjunto de materiales, albergan en su interior a una muchedumbre de maestras, seños, docentes, ayudantes, compañeros, estudiantes, practicantes, artistas y, por sobre todas las cosas, historias. Porque esta tesis no es más que el fruto del entrelazamiento de un montón de historias.

Y entre todas esas historias me atrevería a decir que tuve el placer y la enorme fortuna de haber podido vivir una de las más hermosas. Ojalá algún día esta constante aventura de utilizar las palabras me enfrente a la oportunidad de acuñar ese término que la represente. Por ahora, creo que “amor” e “incondicional” pueden ser las dos más cercanas. Esta tesis no sería lo que es sin su enorme esfuerzo y su ternura constante. Si logran encontrar los destellos de sensibilidad y buen gusto que decoran este trabajo, adjudíquenlos todos a ella.

A todos, y a cada uno, les estoy infinitamente agradecido. Esta tesis es de ustedes.

¡Salud!

Resumen

Estudio estructural y supramolecular de pequeñas moléculas de relevancia biológica: síntesis de materiales bioinspirados y sus potenciales aplicaciones

La química supramolecular es definida como “la química más allá de una molécula” y se basa en el estudio de las interacciones no covalentes que puede desarrollar una molécula, con su entorno. Un importante número de fenómenos biológicamente relevantes, como el correcto plegamiento de ciertas proteínas, la especificidad catalítica de las enzimas, y la síntesis de materiales biogénicos con roles bien definidos, están regidos total o parcialmente por la naturaleza de la interacción no covalente entre las moléculas involucradas en el proceso. Asimismo, muchos de los mecanismos a través de los cuales se desarrollan diversos eventos fisicoquímicos, como la separación de fases en una solución, el desarrollo de sistemas organizados no-covalentes, como micelas y cristales líquidos, o los procesos de selección de enantiómeros en las síntesis asimétricas, para nombrar solo algunos ejemplos relevantes, también están gobernados por la química supramolecular. Este rol ubicuo y fundamental de la química supramolecular en tantas y tan diversas ramas de la ciencia despertó un interés especial en el desarrollo de nuevas herramientas para su estudio y predicción. Al mismo tiempo, desde hace unas décadas se han propuesto múltiples maneras de abordar el estudio de la relación que existe entre la estructura molecular, la química supramolecular y las propiedades de una dada especie química, lo cual sentó las bases del diseño racional de estructuras moleculares con propiedades específicas.

Con la finalidad de contribuir a desenmarañar el entramado de factores que pueden afectar la química supramolecular de un sistema, y alterar la interacción con su entorno, durante este trabajo de tesis doctoral se diseñaron y sintetizaron varias familias de moléculas derivadas de aminoácidos y aldehídos de interés biológico, y se investigó su química supramolecular al ser sometidas a distintas condiciones experimentales. En particular, se exploró la capacidad de estas moléculas de desarrollar fases sólidas ordenadas y se estudiaron las propiedades en solución empleando solventes de diversa naturaleza. Esto dio como resultado la obtención de distintos materiales supramoleculares como cristales, mesoestructuras, y organogeles. Para cumplir con los objetivos propuestos se emplearon diferentes técnicas espectroscópicas, difracción y dispersión de rayos X, microscopía confocal y de luz polarizada, y cálculos de estructura electrónica empleando la teoría del funcional de densidad (DFT).

El parentesco observado entre los ensamblajes supramoleculares desarrollados por estos derivados de aminoácidos con las estructuras del tipo amiloide, y el impacto que este tipo de nanoestructuras patológicas ha despertado en los últimos años, motivó el estudio de la capacidad amilogénica de estos compuestos. Se estudió el potencial carácter citotóxico de los filamentos elongados obtenidos en condiciones fisiológicas sobre neuroblastos de ratón no diferenciados empleando microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia resuelta en el tiempo. Para algunos de los compuestos se pudo observar el desarrollo del proceso de apoptosis en las células y la presencia de estructuras filamentosas en la matriz extracelular.

Por último, se estudiaron las propiedades estructurales, mecánicas y ópticas de monocrstales obtenidos a partir de diferentes fases cristalinas derivadas de las purinas adenina, guanina y cafeína. El análisis estructural se llevó a cabo mediante técnicas de difracción de rayos X, simulaciones por DFT y el estudio de las redes de energía desarrolladas en cada sistema, lo que permitió comprender la relación entre el empaquetamiento cristalino, las interacciones intermoleculares y las propiedades mecánicas observadas (fragilidad, flexibilidad plástica o elástica, dependiendo del sistema). Estos resultados proveen, además, las herramientas predictivas necesarias para el diseño de nuevos sólidos cristalinos bioinspirados. Asimismo, se obtuvieron nuevos materiales cristalinos híbridos empleando las fases sólidas de las purinas como huéspedes de colorantes incorporados de forma intracristalina. Estos nuevos materiales presentaron una respuesta mecánica y óptica muy innovadora.

Palabras clave: *Química Supramolecular – Materiales Bioinspirados – Aminoácidos – Purinas – Fibras amiloides – Cristales Flexibles.*

Abstract

Structural and supramolecular study of small molecules: synthesis of bioinspired materials and potential applications

Supramolecular chemistry is defined as the “chemistry beyond the molecule” and is focused on the comprehension of the nature of the interaction between a molecule, with its surroundings. A wide range of biologically relevant phenomena, as the correct folding of proteins, the specific catalytic activity of enzymes, and the development of biogenic materials with specific purpose, are totally or partially, modulated, by the interactions between the molecules involved in each process. Moreover, multiples events in other fields of science, such as the phase separation in precipitation process, enantiomeric selection during asymmetric reactions, or the development of hierarchical no-covalent ordered aggregates as micelles or liquid crystals, are also ruled by the supramolecular chemistry. This ubiquitous and fundamental role of supramolecular chemistry in different fields of science has attracted a special interest in the development of new tools for its study. Simultaneously, in the last decades, multiples approaches have been proposed to understand the relationship between molecular structure, supramolecular behavior, and the properties of a substance, which have settled the bases for the rational design of molecular structure with specific properties.

In spite of unraveling the complex network of factors that could be affecting the supramolecular chemistry of a certain chemical species and also, the ones that are ruling the interaction between the molecule and its surrounding, during this doctoral thesis different families of amino acid-based compounds derivatized with biologically relevant aldehydes, have been design and synthetized, and its supramolecular chemistry have been fully investigated under different experimental conditions. In particular, the ability of these molecules to develop ordered solid phases, such as single crystals and mesostructures, was investigated, and also, the properties in solution were studied using different solvents, what gave place to multiples organogels. To achieve the objectives of the work, several characterization techniques have been employed, as spectroscopies, X-ray diffraction and dispersion, light-polarized and confocal microscopy, and electronic structure calculation using density functional theory (DFT).

Structural similarities between the supramolecular aggregates developed by these molecules and the structures reported for amyloid-forming substances, in addition with the huge impact that these kinds of pathologic nanostructure have shown in the last decade, motivated the study of the amylogeic capability of these compounds. The capability of developing supramolecular filaments with cytotoxic effect under physiological conditions was studied by fluorescence lifetime imaging microscopy on undifferentiated mouse neuroblasts. For some of the tested compounds, the cell apoptosis process was observed in the presence of elongated filaments on the extracellular matrix.

Lastly, the structural, mechanical and optical properties of single crystalline materials obtained for different solid phases of the purines adenine, guanine and caffeine, was studied. Structural analysis was performed employing X-ray diffraction techniques, with the complement of DFT and Energy Framework calculations, which contributed to the understanding of the relationship between crystal packing, non-covalent interactions,

and the observed mechanical properties (brittleness, plastic, or elastic flexibility, depending on the system). These results provided the tools to rationally design new bioinspired crystalline materials. Furthermore, a set of new hybrid crystalline materials were obtained due to the capability of these solid phases to act as host of dyes. Characterization showed that these dyes were allocated intracrystallinely inside the structure. Additionally, these new crystalline materials showed remarkable mechanical and optical response.

Keywords: *Supramolecular Chemistry – Bioinspired Materials – Amino acids – Purines – Amyloid Fibrils – Flexible Crystals.*

Capítulo I. Introducción

Química Supramolecular y Química Conformacional.....	23
Materiales supramoleculares.....	24
Concepto general	24
Correlación entre la estructura del bloque de construcción y las propiedades del material	26
Materiales bioinspirados.....	27
Ingeniería Cristalina	28
Mecanismos de separación de fase y propiedades del material resultante	29
Pequeñas moléculas con actividad biológica como bloques de construcción de nuevos materiales	31
Aminoácidos y aldehídos aromáticos.....	31
Purinas.....	33
Diseño racional de pequeñas moléculas para el desarrollo de nuevos materiales	37
Raíces supramoleculares de patologías humanas.39	
Definición, detección y cuantificación del carácter amiloide.41	
Objetivos generales y estructura de la tesis.....	43
Bibliografía.....	45

Capítulo II. Materiales y Métodos

Consideraciones generales	58
Reactivos y solventes	58
Metodología de síntesis	58
Técnicas de rayos X	60
Interacción de los rayos X con la materia.....	60
Difracción de rayos X de monocrystal (mDRX).....	60
Difracción de rayos X de polvos (pDRX)	62
Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)	63

Cristalización y crecimiento cristalino	65
Cristalización por evaporación del solvente.....	66
Cristalización por difusión de vapor de solvente	67
Cristalización por enfriamiento de una solución saturada	67
Cristalización por alteración controlada del pH del medio	68
Espectroscopías	68
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	68
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	69
Espectrometría de masas	69
Espectroscopía por absorción Ultravioleta–visible (UV–Vis)	70
Espectroscopía de emisión molecular	71
Técnicas térmicas.....	72
Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)	72
Microscopías	72
Microscopía electrónica de barrido en alto vacío y en condiciones ambientales (SEM).....	72
Microscopía óptica de luz polarizada (MOLP).....	73
Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)	73
Metodología Computacional.....	74
Teoría del funcional de la densidad (DFT)	74
Sobre la metodología de trabajo y la elección de bases y funcionales	77
Análisis de la estructura supramolecular.....	79
 Superficies de Hirshfeld, Gráficos dactilográficos (2D– Fingerprint plot) y Estructura de Energías	79
Determinación del factor de forma	84
Determinación de la convergencia supramolecular	85
Bibliografía	87

Capítulo III. Química configuracional y supramolecular y fenómenos de autoensamblado de pequeñas moléculas derivadas de aminoácidos	
Introducción	97
Resultados y discusiones.....	102
Derivados de aminoácidos como estrategia de modulación de las propiedades moleculares y de autoensamblado	102
Caracterización estructural en estado sólido	104
Estructuras resueltas a partir de experimentos de Difracción de Rayos X (DRX)	104
La inversión de quiralidad en aminoácidos y sus derivados .	117
Conformaciones y factor de forma.....	120
Generalidades	120
Determinación del factor de forma de los derivados de aminoácido en distintas estructuras cristalinas.....	121
Mecanismos de precipitación y su relación con las propiedades del material obtenido	125
Mecanismos de descomposición de sistemas homogéneos.	125
Caracterización del mecanismo de ensamblado y precipitación	127
Química en solución	132
Dímeros, confórmeros y agregados.....	132
Estudios mediante espectroscopía electrónica.....	138
Estudios mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear	144
Simulación computacional para el estudio conformacional en solución	149
Materiales autoensamblados: Mesocristales y organogeles.....	160
Materiales cristalinos	160
Organogeles supramoleculares	165
Conclusiones y Perspectivas	178

Experimental.....	182
Instrumentación	182
Síntesis de los compuestos	184
Caracterización	185
Síntesis de los materiales mesoestructurados	193
Información Suplementaria del Capítulo III.....	194
Apéndice	210
Publicaciones y presentaciones en eventos científicos de los resultados de este capítulo	219
Bibliografía.....	221
 Capítulo IV. Estudio estructural y supramolecular de las propiedades de autoensamblado de plataformas poliderivatizadas con aminoácidos	
Introducción	231
Resultados y discusiones.....	236
Estructuras poliderivatizadas con L-Fenilalanina.....	236
Estructuras propuestas, análisis conformacional y de factor de forma.....	237
Química en solución	239
Dímeros, confórmeros y agregados.....	239
Caracterización espectroscópica en solución.....	241
Cálculos de estructura electrónica de parámetros termoquímicos	245
Mecanismo de precipitación y propiedades del material resultante	249
Materiales supramoleculares.....	255
Materiales mesoestructurados.....	255
Geles supramoleculares	259
Conclusiones y Perspectivas	262
Experimental.....	263

Instrumental.....	263
Síntesis y caracterización espectroscópica	265

Capítulo V. Nanoestructuras con potencial actividad amilogénica obtenidas a partir de derivados de aminoácidos: estudio estructural y evaluación citotóxica

Introducción	280
Primeras definiciones de la entidad.....	280
Una definición basada en la estructura	281
Correlación entre el orden parcial de los cristales líquidos y las estructuras amiloides	283
Resultados y Discusión	287
Autoensamblado en solución de la L-Fenilalanina y la L-Tirosina.....	287
Análisis del carácter amiloide de sus arquitecturas supramoleculares.....	287
Actividad amilogénica de la L-Fenilalanina	288
Actividad amilogénica de la L-Tirosina	293
Autoensamblado de derivados de L-Fenilalanina y la L-Tirosina.....	295
Bases para una relación entre la estructura molecular y la arquitectura supramolecular	295
Convergencia supramolecular y arreglos apilados de planos electroestáticos	298
Divergencia Supramolecular y el desarrollo de redes extendidas de interacción	300
El factor de forma y la convergencia como predictores de arquitecturas supramoleculares.....	303
Texturas de cristal líquido.....	307
Extensión a otros derivados de L-Fenilalanina y L-Tirosina.	309
Estudios de formación en solución de estructuras con potencial actividad amilogénica	314
Estudio de alteraciones en la emisión de una sonda fluorescente sensible al entorno	314

Estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares.....	315
Estudios de citotoxicidad	318
Estudios en tiempo real empleando microscopía de imagen por tiempo de decaimiento	319
Conclusiones	329
Experimental.....	331
Síntesis de los compuestos	331
Instrumentación	331
Estudios de citotoxicidad	331
Protocolo de trabajo empleado para los estudios sobre neuritas de ratón.....	332
Protocolo para la interacción entre neuroblastos de ratón y moléculas libres o filamentos	333
Ánálisis de la formación de estructuras con carácter amiloide por ratiometría empleando una sonda fluorescente sensible al entorno	334
Protocolo para el estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares empleando la sonda AQui y la sonda ThT	334
Glosario.....	335
Bibliografía	337

Capítulo VI. Propiedades mecánicas y ópticas de materiales cristalinos bioinspirados

Introducción	350
Ingeniería cristalina para el diseño de biomateriales innovadores	350
Formas cristalinas y métodos de selección experimental	356
Adenina.....	356
Guanina.....	357
Cafeína.....	359

Resultados y Discusión	362
Análisis de las estructuras cristalinas reportadas para adenina, guanina y cafeína	362
Incidencia de aparición de las distintas formas cristalinas ..	362
Estudio de las propiedades estructurales y mecánicas de las estructuras cristalinas reportadas	363
Materiales basados en adenina, guanina y cafeína	369
Síntesis y caracterización estructural	369
Estudio de propiedades mecánicas	374
Síntesis de materiales híbridos bioinspirados	376
Herramientas para la predicción de la capacidad de albergar moléculas exógenas emparentadas estructuralmente	376
Estudio de las propiedades mecánicas de los materiales híbridos.....	383
Estudio de las propiedades ópticas en los materiales híbridos	386
Conclusiones y perspectivas	393
Experimental.....	395
Instrumentación	395
Síntesis de los materiales cristalinos	397
Medidas de la propiedad de guiado de ondas.....	398
Medidas de elasticidad.....	398
Información suplementaria del capítulo VI.....	400
Publicaciones y presentaciones de los resultados de este capítulo	404
Bibliografía	405

Capítulo VII. Conclusiones y Perspectivas

"La creatividad es la inteligencia divirtiéndose"

M. y P.

Capítulo I

Introducción

ÍNDICE DEL CAPÍTULO I

Química Supramolecular y Química Conformacional.....	23
Materiales supramoleculares.....	24
Concepto general	24
Correlación entre la estructura del bloque de construcción y las propiedades del material	26
Materiales bioinspirados.....	27
Ingeniería Cristalina	28
Mecanismos de separación de fase y propiedades del material resultante	29
Pequeñas moléculas con actividad biológica como bloques de construcción de nuevos materiales	31
Aminoácidos y aldehídos aromáticos.....	31
Purinas.....	33
Diseño racional de pequeñas moléculas para el desarrollo de nuevos materiales	37
Raíces supramoleculares de patologías humanas.	39
Definición, detección y cuantificación del carácter amiloide.41	41
Objetivos generales y estructura de la tesis.....	43
Bibliografía.....	45

Química Supramolecular y Química Conformacional

Desde que Friedrich Wohler logró sintetizar la urea en 1828,¹ la química ha puesto su foco en nutrir el formidable abanico de reacciones que permiten generar, sustraer o alterar en casi cualquier medida el enlace covalente. Esto ha permitido diseñar estructuras casi tan complejas y diversas como la propia imaginación del científico que las sintetiza. No son pocos los ejemplos de moléculas complejas y de gran tamaño,²⁻⁴ que han sido sintetizadas en las últimas décadas con el afán de responder una plétora de diversas interrogantes que van desde el interés por el desarrollo de formas específicas,³ la búsqueda de alcanzar extensiones que imiten las observadas para moléculas biológicas,² o pruebas de concepto de los límites actuales de las herramientas de síntesis.⁴

Sin embargo, una atención muchísimo menor se ha puesto en entender cómo son los fenómenos que rigen la interacción de estas entidades moleculares con su entorno. Irónicamente, cuando un sustrato se une a una enzima, una droga se adhiere a su blanco, o una señal se propaga entre células, son estos fenómenos de interacción entre estructuras los que gobiernan y determinan la selectividad, la afinidad y la eficacia de todo el proceso.⁵ El estudio de esta química que excede el enlace covalente y pone su foco en racionalizar y comprender qué mecanismos se desarrollan durante la interacción entre especies químicas se denomina **Química Supramolecular**.

La Química Supramolecular ha sabido ser definida, en palabras de unos de sus máximos exponentes, el ganador del premio Nobel Jean-Marie Lehn, como “la química más allá de la molécula”.⁶ Según Lehn, la Química Supramolecular “busca diseñar e implementar sistemas químicos funcionales basados en componentes moleculares que se mantienen unidos a través de interacciones intermoleculares no covalentes.”

Debido a que resulta necesario tener un control estricto y riguroso sobre la posición y orientación de los grupos funcionales que están presentes en un bloque de construcción para poder predecir eficazmente qué tipo de interacciones pueden ser desarrolladas, es necesario tener una idea clara del estado conformacional de una estructura. Se define como isomería conformacional a una forma de la estereoquímica en la que los isómeros pueden interconvertirse entre sí, a través de rotaciones de sus enlaces. Aunque generalmente a cualquier par de arreglos atómicos en una molécula se le puede denominar “conformaciones”, en líneas generales se le suele asignar el rótulo “confórmero” a todas aquellas conformaciones que se corresponden con un mínimo local en la energía potencial del sistema.⁷

Al análisis y la descripción de las diversas conformaciones accesibles por una dada estructura, así como el estudio de los factores que alteran y seleccionan una dada conformación por sobre el resto de posibles estados accesibles, se la denominará a lo largo de este Trabajo de Tesis como **Química Conformacional**.

Se advierte a simple vista que existe una relación muy estrecha entre estas dos ramas del análisis estructural. Así como la Química Supramolecular se nutre del análisis conformacional para conocer con precisión la locación y orientación de los fragmentos

moleculares encargados de establecer interacciones con el entorno, la Química Conformacional se basa en estos mismos fragmentos y la naturaleza de sus interacciones para seleccionar los estados conformacionales más estables, en tanto estos serán los que favorezcan la mayor cantidad y la mejor calidad de enlaces no covalentes desarrollados.

A lo largo de esta tesis se presentarán varios ejemplos que ilustrarán no solamente esta relación cooperativa y sinérgica entre ambas ramas sino también demostrarán el enorme potencial que brinda realizar un análisis estructural empleando un abordaje conjunto tanto de la libertad conformacional y como la capacidad supramolecular de una especie. En particular, se propondrán nuevas herramientas descriptivas para el estudio de pequeñas moléculas con el fin de proponer una primera aproximación a la predicción de propiedades de sistemas supramoleculares autoensamblados. Finalmente, y como prueba de concepto, se presentarán una serie de diversos materiales moleculares sintetizados a partir de estas moléculas con el fin de verificar la relación predicha entre estructura molecular, libertad conformacional, capacidad supramolecular y propiedades del sistema material obtenido.

Materiales supramoleculares

Concepto general

Los materiales cumplen un rol transformador en la historia de la humanidad. La relación entre los materiales y el ser humano es tan estrecha e íntima que muchas eras son nombradas en base al rol casi social que estos desempeñaban, como la edad de piedra,⁸ del bronce,⁹ o de hierro.¹⁰ No obstante, aunque en todos estos períodos se le ha dado un papel protagónico a los “materiales duros”, detrás de todos ellos existen múltiples “materiales blandos” que han sabido acompañar al humano a lo largo de cada una de estas etapas.¹¹ Podemos distinguir entre materiales “duros” y “blandos” considerando la energía necesaria para producir una deformación. Los materiales blandos pueden ser deformados empleando alteraciones térmicas o mecánicas cuya magnitud se encuentra en el rango de las propias fluctuaciones térmicas del sistema a esa temperatura.¹² Por el contrario, los materiales duros requieren energías con magnitudes mucho mayores para poder ser alterados perceptiblemente.

Cada vez es más frecuente encontrar materiales blandos basados en moléculas (también conocidos como *materiales moleculares*) en la vida cotidiana, formando parte de máquinas y dispositivos que podemos encontrar fácilmente a nuestro alrededor (Figura 1).¹³

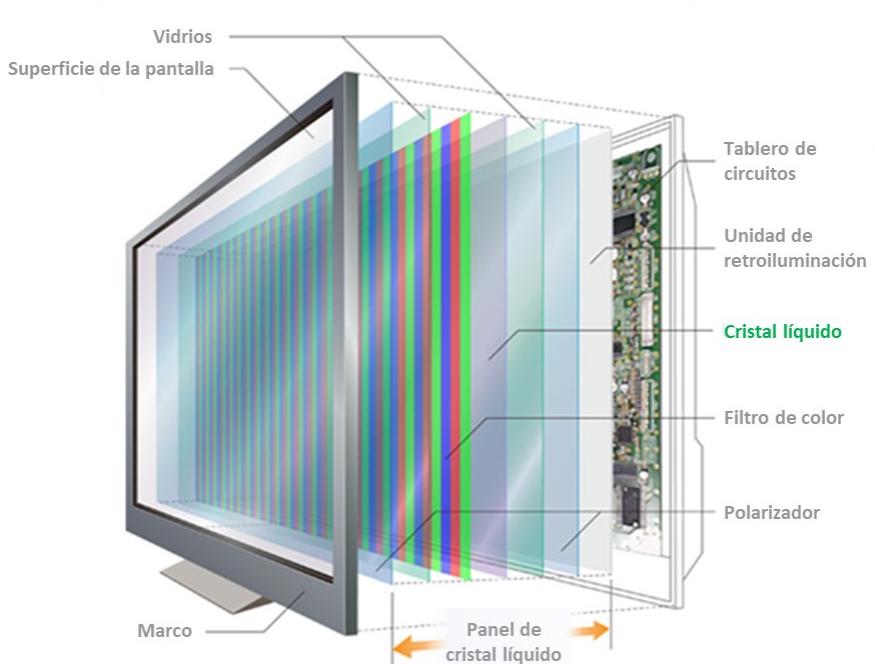


Figura 1. Esquema de los componentes de una pantalla de cristal líquido. Imagen adaptada del sitio [How The Technology of LCD Displays Works - Xenarc Technologies Blog](#).

Todas las propiedades de un material dependen de forma directa, tanto de los contactos que se desarrollan entre sus bloques de construcción, como del orden que estos presenten. Por este motivo, en las últimas décadas, acompañando el surgimiento de nuevos materiales basados en moléculas, la Química Supramolecular ha tomado un rol troncal en el diseño y su desarrollo.

Es interesante notar que la Química Supramolecular también ha sido central en los sistemas naturales desde sus orígenes.¹¹ Los fenómenos de autoensamblado que se dan a escala supramolecular son fundamentales para todos los sistemas naturales debido a que permiten el desarrollo de estructuras de distintos tamaños y con una amplia variedad de funcionalidades. Los materiales obtenidos a través de esta estrategia poseen claras ventajas comparativas respecto a otros sistemas extendidos similares. Esto es debido a que la reversibilidad intrínseca a las interacciones no covalentes durante el desarrollo del material les confiere la capacidad de corregir desperfectos, lo que permite obtener una estructura final con gran complementariedad entre sus bloques de construcción.¹¹ Bloques de construcción que se reconocen y ensamblan solos,¹⁴ sistemas capaces de regenerarse,¹⁵ o sistemas multiresponsivos,¹⁶ son solo algunos ejemplos del fascinante universo de nuevos materiales que la Química Supramolecular ha permitido desarrollar a lo largo de los últimos años.

Sin embargo, contar con la capacidad de controlar y predecir las diversas estructuras que pueden ser generadas a partir de un dado conjunto de especies, considerando principalmente la cinética y la termodinámica que rigen los mecanismos que subyacen, sigue siendo un desafío en la actualidad.^{17,18}

Durante este Trabajo de Tesis Doctoral se presentará el estudio pormenorizado de los fenómenos de autoensamblado de una familia de compuestos derivados de los

aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina y de purinas de interés biológico como la adenina, la guanina y la cafeína. Se mostrará cómo todos estos compuestos dan lugar a la obtención de diversos materiales supramoleculares y se analizará en detalle las arquitecturas estructurales que podrían estar generándose en todos estos sistemas.

Adicionalmente, en este trabajo se ilustra de manera clara el rol fundamental que cumplen tanto la Química Supramolecular como la Química Conformatacional, en el desarrollo de nuevos sistemas con propiedades fácilmente predecibles en términos de conceptos estructurales claves, como el factor de forma y la naturaleza convergente o divergente de la Química Supramolecular. Los ejemplos acá presentados y los conceptos introducidos durante las discusiones permiten sentar las bases para el desarrollo de un marco conceptual que aborde manera holística una compresión en detalle de los fenómenos que reinan sobre el autoensamblado de diversas estructuras moleculares con interés biológico.

Correlación entre la estructura del bloque de construcción y las propiedades del material

El concepto detrás de "la química más allá de la molécula" está basado en el estudio de las interacciones no covalentes, las cuales son débiles y reversibles por naturaleza, y se generan tanto por motivo de la forma y el tamaño de la especie, como de su carga y los grupos funcionales presentes.⁵ Por lo tanto, para diseñar un bloque de construcción que cumpla un dado rol en un sistema, es necesario introducir distintos grupos funcionales sobre plataformas afines. Esto implica tener un control minucioso no solamente del tipo, sino también de la posición y la orientación de estas interacciones no covalentes.¹³

Esta relación directa entre la estructura de una especie y su capacidad de interactuar con el entorno motiva la necesidad de poder contar con "principios de construcción". Idealmente, estos deberían de basarse en la presencia de ciertos arreglos atómicos/moleculares comunes y deberían ayudar a predecir o, al menos, acotar el número de estructuras supramoleculares que se desarrollarán en un sistema. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se representan algunos de los fragmentos moleculares más comúnmente utilizados a la hora de diseñar bloques de construcción para el desarrollo de estructuras supramoleculares helicoides.

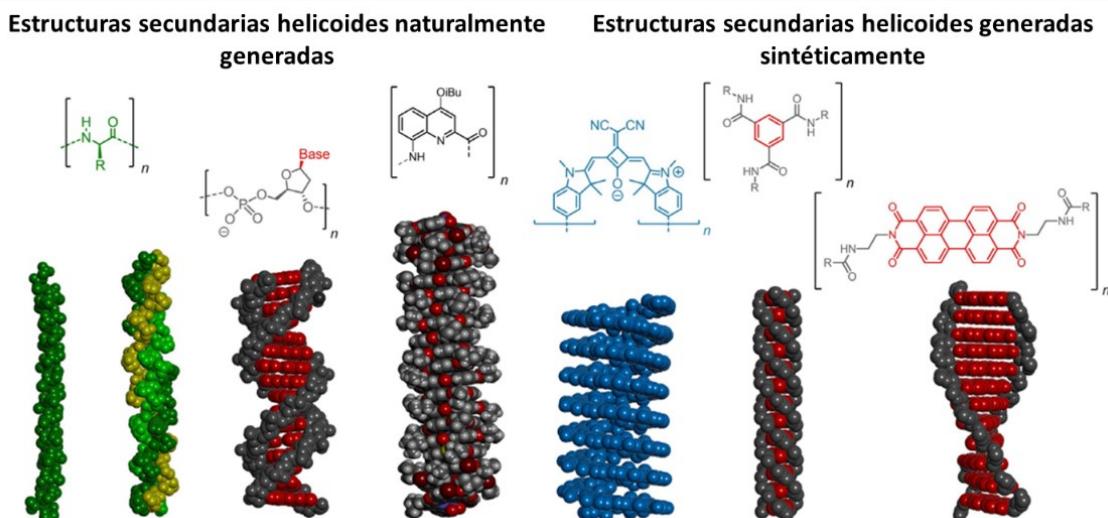


Figura 2. Algunos de los fragmentos moleculares frecuentemente empleados para el diseño racional de nuevos bloques de construcción supramolecular y las arquitecturas helicoides más comúnmente generadas por estos. Imagen adaptada del trabajo de Schmidt y Würthner.¹⁸

Resulta particularmente interesante notar que el primer grupo presentado, el grupo amida en una entidad polimérica, también puede emplearse para desarrollar láminas β . Este ejemplo ilustra claramente las dificultades que implica querer predecir el arreglo supramolecular desarrollado si se pone el foco únicamente en la unidad de construcción.

La síntesis orgánica cuenta con una enorme colección de reacciones disponibles para enfrentar esta tarea.¹³ Esta pléthora de herramientas estructurales puesta a disposición de la Química Supramolecular puede ser, como poco, avasallante. Adicionalmente, los retos asociados al trabajo sintético, y el desarrollo de nuevas rutas de obtención de estructuras orgánicas, son un enorme agregado al ya de por sí desafiante universo de preguntas que la Química Supramolecular intenta responder. Por este motivo, es frecuente observar cómo la Química Supramolecular se nutre de la síntesis de nuevos bloques de construcción partiendo de pequeñas porciones estructurales previamente conocidas, como moléculas o fragmentos moleculares con propiedades bien definidas, y estudia el impacto que producen estos cambios controlados sobre las propiedades supramoleculares de esta nueva entidad.^{17,19-21}

A lo largo de este Trabajo de Tesis se pondrá el foco en estudiar cómo se construyen las propiedades supramoleculares de un nuevo sistema a partir de sus componentes, cuáles y cuántas de estas propiedades pueden heredarse desde los bloques parentales al derivado final, y cuál es la susceptibilidad de todas estas propiedades a los diversos cambios estructurales introducidos a lo largo de la tesis.

Materiales bioinspirados

Las fascinantes propiedades que presentan los biomateriales son el resultado de años de evolución. Generalmente, estos son ensamblados en condiciones moderadas, muchas veces fisiológicas, y con un acceso muy acotado a distintos bloques de construcción. Por este motivo, en la inmensa mayoría de los casos, las propiedades tan sorprendentes de estos materiales provienen principalmente de arquitecturas jerárquicas sofisticadas.²² Poder encontrar una manera de “simular las vías de formación de estos materiales” para sintetizar de manera artificial sistemas similares ha despertado un enorme interés a lo largo de las últimas décadas debido a su aplicación en la ciencia de los materiales y la ingeniería.

El diseño de nuevos materiales que tengan la resistencia mecánica de las telas de araña,²³ el color estructural de algunos peces²⁴ o camaleones,²⁵ o la capacidad de regeneración de la propia piel humana,²⁶ son solo algunos ejemplos en los que imitar a la naturaleza tendría un impacto directo y trascendental en el desarrollo de nuevas tecnologías. Por este motivo, resulta fundamental comprender cuáles son los mecanismos que subyacen en los fenómenos de reconocimiento y ensamblado molecular que parecen estar presentes en todos y cada uno de estos sistemas.

Uno de los principales requerimientos para el desarrollo de materiales bioinspirados es emplear bloques de construcción o bien idénticos a los empleados en la naturaleza, o emparentados estructuralmente. Esto último, aunque abre las posibilidades

a un sinfín de posibles derivatizaciones que facilitarían el desarrollo directo de nuevos sistemas, también introduce el riesgo de perder la biocompatibilidad y terminar obteniendo materiales con propiedades estupendas, pero imposibles de aplicar sin implicar riesgos para la salud o el medio ambiente. Por este motivo, poder diseñar, desarrollar y estudiar nuevos sistemas supramoleculares partiendo de bloques de construcción biocompatibles o con una citotoxicidad bien caracterizada, resulta esencial para garantizar una aplicación directa y exitosa del material obtenido.

Durante este Trabajo de Tesis se presentará la síntesis y caracterización de diversos materiales bioinspirados que van desde sólidos cristalinos con propiedades mecánicas sorprendentes, hasta geles supramoleculares y cristales líquidos. En todos los casos se empleó para su diseño bloques de construcción basados en moléculas biocompatibles como aminoácidos, aldehídos y purinas. En los casos aislados en que se emplearon colorantes que implican un potencial riesgo para la salud, estos fueron empleados como dopantes en concentraciones traza y embebidos en matrices que disminuyen la exposición directa con el usuario.

Ingeniería Cristalina

Poder predecir las propiedades de un sistema conociendo la identidad de cada uno de sus componentes es una de las principales motivaciones de la ciencia, en general. En particular, en la ciencia de los materiales, predecir y controlar las propiedades del sistema resultante a partir del diseño racional de los bloques de construcción sigue siendo uno de los principales desafíos. En este contexto, la ingeniería cristalina es la rama de las ciencias encargada de estudiar el diseño y la síntesis de estructuras en estado sólido con el fin de controlar las interacciones intermoleculares que gobiernan las propiedades materiales.²⁷ Entre las principales estrategias que se han desarrollado para lograr este cometido se encuentra el uso de interacciones fuertes y direccionaladas como el puente de hidrógeno, el puente halógeno o los enlaces de coordinación metal-ligando.²⁸

Más allá de que la Ingeniería Cristalina es una rama que viene siendo desarrollada desde hace casi 30 años,²⁹ su evolución en la última década la ha llevado a estudiar la frontera que separa el estudio de los materiales duros y los materiales blandos, usualmente relegados a la Química Supramolecular.¹¹ Debido la gran cantidad de objetivos y herramientas en común entre ambas ramas, en muchos casos se han empleado conjuntamente para abordar la resolución de diversos desafíos, como el diseño y desarrollo de nuevos bloques de construcción con formas y modos de interacción específicos, o el estudio de materiales que se encuentran parados en la frontera que distingue “lo duro” y “lo blando”, como los cristales líquidos. Este desvanecimiento en los límites del campo de aplicación de la Ingeniería Cristalina ha permitido que el batallón de herramientas y conceptos desarrollados originalmente para estudiar y comprender los materiales cristalinos ahora sean empleados frecuentemente para el estudio de geles, coloides, cristales líquidos y otros sistemas supramoleculares, más allá de su capacidad de deformarse o su grado de orden.

A lo largo de esta tesis se presentarán diversos materiales sólidos que serán estudiados empleando tanto las herramientas como los conceptos desarrollados por esta disciplina, que van desde los cristales únicos, plásticos, elásticos y rígidos, y los materiales policristalinos, hasta los geles supramoleculares. En todos los casos se presentará una relación entre la estructura molecular de los bloques de construcción, el orden que estos adquieren en cada sistema y las propiedades del material resultante.

Mecanismos de separación de fase y propiedades del material resultante

Luego de que, por muchos años, las arquitecturas de los materiales hayan sido dominadas principalmente por arreglos basados en láminas, núcleos, carcasas y redes con una dada periodicidad, la última década ha visto la aparición de nuevas topologías aperiódicas de la mano de los materiales espinodales.³⁰ Aunque existen reportes de la presencia de este tipo de materiales en la naturaleza, como en el desarrollo de los materiales óseos en los huesos,^{31,32} o la formación de algunas espinelas,³³ fue necesario un enorme esfuerzo, teórico y experimental, para dominar los fenómenos que permiten tanto seleccionar, como estabilizar esta vía de separación de fases.^{34,35}

Inspirados en los procesos de autoensamblado observados en la naturaleza, los materiales construidos a partir de una separación de fase espinodal (*materiales espinodales*) se caracterizan por presentar cierto grado de anisotropía en algunas de sus propiedades, como la dureza o la densidad, la cual puede ser modulada a través del control riguroso de las condiciones de precipitación.

Esta distribución asimétrica de sus propiedades contrasta con la homogeneidad e isotropía usualmente observada en las propiedades de los materiales cristalinos o policristalinos. En estos, su estructura inherentemente periódica implica heredar esta simetría espacial sobre sus propiedades. Un arreglo simétrico de entidades distribuidas en el espacio implica, de manera excluyente, una distribución de igual simetría de sus propiedades, debido a que estas se generan a partir de la respuesta colectiva de sus bloques de construcción.²⁸ Cualquier heterogeneidad en la distribución de los bloques de construcción, o de sus interacciones, se verá reflejada de forma directa en la distribución de sus propiedades, como sucede con la birrefringencia.³⁶

Gracias a la capacidad de controlar la orientación, forma y tamaño del poro durante la optimización topológica de los materiales espinodales, se logra abarcar una enorme porción del espacio, alojando el material de manera eficiente sobre las principales regiones donde se produce el estrés mecánico al cual se someterá el sistema.³⁵ Adicionalmente, la naturaleza bicontinua, aperiódica, desestructurada y estocástica de este tipo de arquitecturas promueve una serie de funciones, tanto biológicas como mecánicas, como la tolerancia a las imperfecciones³⁷ o la formación de regiones de tensión y relajación que brindan una respuesta mecánica sorprendente.³⁸

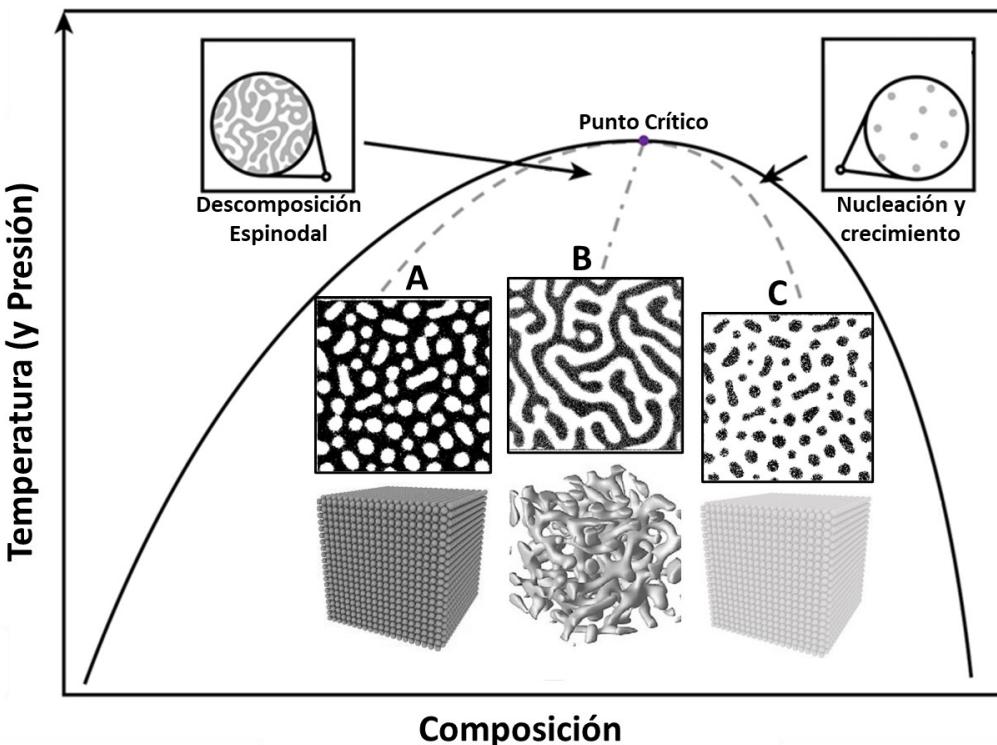


Figura 3. Diagrama de separación de fases para un sistema binario en función de la temperatura y la composición. Se detallan las texturas esperadas para materiales obtenidos a partir de fenómenos de nucleación y crecimiento (A y C) y la región de descomposición espinodal (B).

En contraposición con los materiales estructurados y periódicos desarrollados a través de los fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino, los materiales espinodales presentan una enorme capacidad biomimética, motivo por el cual fueron propuestos como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos materiales bioinspirados con aplicación en ramas tan diversas como la ingeniería de tejidos,²² o la reconstrucción de material óseo.³² Actualmente se encuentran reportadas en bibliografía un tipo de arreglo cristalino de orden local frecuentemente observado durante la formación de materiales blandos denominado “esferulita”, cuyo mecanismo de formación propuesto se centra en una concatenación de fenómenos de nucleación, crecimiento cristalino y descomposición espinodal.³⁹ Este es solo uno de los ejemplos reportados en bibliografía en los que es necesario desdibujar las barreras que distinguen ambos mecanismos de descomposición para describir de manera satisfactoria un fenómeno.

Durante este Trabajo de Tesis, puntualmente durante los Capítulos III, IV, y V, se abordará en detalle una relación directa entre ambos mecanismos de descomposición en términos de la teoría de fluctuación de concentraciones de Cahn-Hilliard,⁴⁰ y se propondrá una manera de entender la relación entre ambos en base a la facilidad o dificultad con que un componente puede difundir en un sistema y el grado de orden que imponen las fuerzas entrópicas en su empaquetamiento.

Pequeñas moléculas con actividad biológica como bloques de construcción de nuevos materiales

Aminoácidos y aldehídos aromáticos

La formación de arquitecturas supramoleculares ordenadas empleando metabolitos y pequeñas moléculas de relevancia biológica ha ganado interés en los últimos años debido a la simplicidad de estos bloques de construcción, su gran abundancia natural y su biocompatibilidad intrínseca. Adicionalmente, en la bibliografía cada vez son más los reportes de estructuras supramoleculares con actividades biológicas diversas que van desde la citotoxicidad hasta la formación de entramados fibrilares para la encapsulación de diversas sustancias.⁴¹⁻⁴³ En este contexto, resultan especialmente relevantes los aminoácidos aromáticos debido a que tienen la capacidad de desarrollar una gran variedad de interacciones supramoleculares en medios acuosos debido a su limitada solubilidad.⁴⁴ Esto los vuelve candidatos ideales para desarrollar estructuras supramoleculares empleando diversas técnicas de precipitación como el salto de pH, la remoción controlada de solvente o la difusión de cosolventes.

La L-Fenilalanina es uno de los nueve aminoácidos esenciales y se encuentra principalmente en la naturaleza formando parte de una diversa variedad de proteínas. La L-Tirosina, por el contrario, es un aminoácido condicionalmente esencial, lo que implica que sólo algunas poblaciones específicas no pueden sintetizarlo a través de las rutas metabólicas convencionales y requieren suplir esta carencia a través de la ingesta.⁴⁵ Debido a la presencia de anillos aromáticos en ambos residuos, estos dos aminoácidos son considerados aromáticos. Sorprendentemente, a pesar de la presencia del grupo hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático de la L-Tirosina, esta presenta una solubilidad en agua muy baja, aún menor que la observada para L-Fenilalanina (Figura 4).⁴⁴ Por este motivo, y para los fines prácticos, muchas veces es considerada como un aminoácido no polar e hidrofóbico, más allá de la presencia de este grupo hidroxilo.

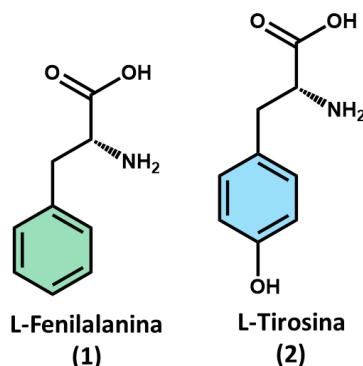


Figura 4. Aminoácidos utilizados

Gracias a la capacidad de autoensamblarse dando lugar a la formación de estructuras supramoleculares fibrilares, la L-Fenilalanina ha sido estudiada como bloque de construcción de diversos tipos de materiales, entre los que resaltan los geles supramoleculares,⁴⁶ las estructuras amiloides,⁴⁷ y las redes nanofibrilares.^{48,49} Además, la facilidad con que este compuesto puede ser derivatizado para obtener diversas estructuras moleculares con características variadas que heredan la capacidad de formar filamentos supramoleculares la vuelven una plataforma muy versátil para diseñar racionalmente nuevos compuestos con propiedades específicas.^{19,50-52}

Sorprendentemente, esta habilidad de formar arquitecturas supramoleculares extendidas no se observa de manera tan pronunciada en la L-Tirosina, a pesar de contar con un grupo hidroxilo adicional cuya posición y orientación debería de estimular el desarrollo de este tipo de interacciones. Esta diferencia con respecto de lo que se observa para la L-Fenilalanina parece estar directamente relacionada con la formación de dímeros estables, lo cual conlleva a emplear todo el potencial de su Química Supramolecular e inhibe la interacción de estos bloques de construcción con otros elementos del entorno.⁴⁴ No obstante, existen casos en los que se han reportado materiales fibrilares constituidos a partir de estos dímeros, cuya morfología y aspecto macroscópico se asemeja a lo observado para la estructura cristalina de la L-Tirosina.⁵³

Los aldehídos aromáticos son ampliamente utilizados industrialmente en diversas aplicaciones entre las que destaca su uso como aromatizantes, saborizantes y precursores en la industria farmacéutica. La vainillina, que es el ingrediente principal de la esencia de vainilla,⁵⁴ el benzaldehído, que es el principal componente en los saborizantes artificiales de almendras y cerezas,⁵⁵ o el piperonal, una especie con aroma dulce y floral,⁵⁶ son algunos aldehídos aromáticos empleados en la industria alimenticia y cosmética, por estas propiedades tan particulares.⁵⁷ Más allá de su uso como agentes organolépticos, gracias a la reactividad que ofrece el grupo carbonilo, tanto estos como otros aldehídos aromáticos son además, ampliamente utilizados como intermediarios y precursores en diversas industrias, como la farmacéutica.⁵⁸ El empleo de estos compuestos en el diseño bloques de construcción para la síntesis de nuevos materiales permite introducir diversos motivos moleculares con una variada polaridad pero una estructura conservada, lo que propicia el estudio de manera sistemática del impacto que tienen pequeños cambios estructurales en las propiedades finales. Además, contar con la presencia de más de un grupo carbonilo en la estructura extiende las capacidades de derivatización, dando como resultado entidades polifuncionalizadas.

En particular, a través de la reacción de condensación que puede desarrollarse entre el carbonilo y un grupo amino, es posible incorporar moléculas como los aminoácidos, a una plataforma aldehídica. En esta tesis se emplearon diversos aldehídos, que se presentan en la Figura 5, para el diseño de las moléculas estudiadas, las cuales fueron obtenidas a través de la reacción de formación de base de Schiff (condensación entre el carbonilo y el grupo amino) y posterior reducción.

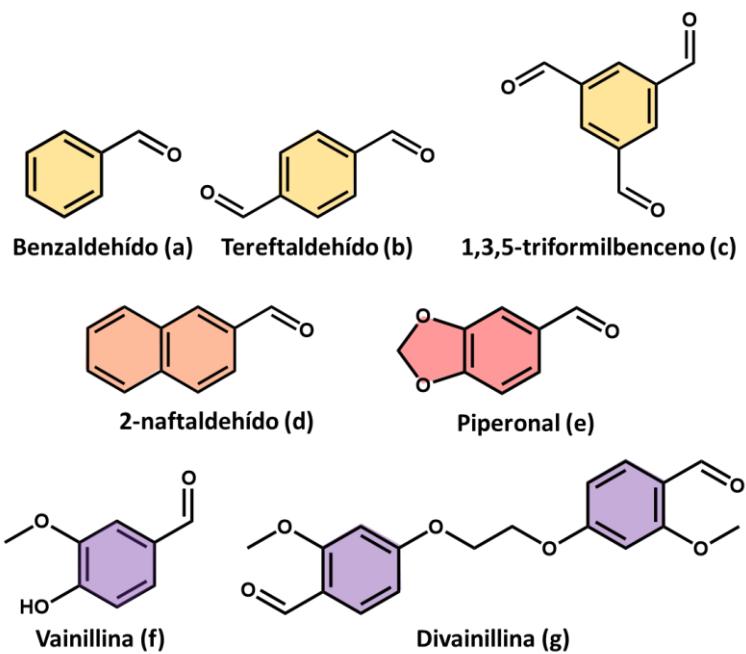


Figura 5. Aldehídos empleados

Purinas

La purina es el heterociclo nitrogenado más ampliamente distribuido en la naturaleza. Irónicamente, más allá de que aparece de forma frecuente en una inmensa variedad de estructuras, como el Adenosin-5-trifosfato (ATP),⁵⁹ el Adenosin-3,5-ciclofosfato (cAMP),⁶⁰ el Nicotin Adenin Dinucleótido (NAD),⁶¹ o el Flavin Adenin Dinucleótido (FAD),⁶² no se ha reportado hasta ahora la presencia de purina sin sustituir en ningún organismo. La versión más simple encontrada hasta el momento es la Nebularina, una especie aislada del hongo *Agaricus Nebularis* que presenta propiedades antimicrobianas.⁶³ No obstante, existen muchas moléculas ubicuas en sistemas biológicos derivadas de esta estructura, como son la Adenina, la Guanina, la Hipoxantina, la Xantina, la Teofilina, la Teobromina, la Cafeína, el ácido Úrico y la Isoguanina (Figura 6). Todas estas pequeñas moléculas cumplen roles fundamentales en sistemas biológicos⁶⁴ o están directamente relacionadas con trastornos en la nutrición y patologías asociadas a la acumulación de sustancias nitrogenadas en el organismo.^{65,66}

Considerando la relevancia de las purinas, y teniendo en cuenta que la presencia de los distintos grupos funcionales en cada una de ellas permite estudiar el rol que cumplen estos en el desarrollo de nuevos sistemas, en esta tesis se eligieron la adenina, la guanina y la cafeína como bloques de construcción para la síntesis de nuevos materiales bioinspirados.

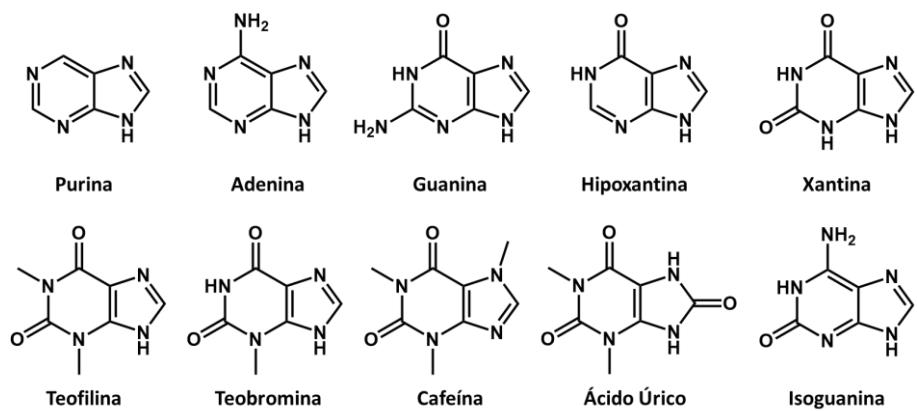


Figura 6. Estructura molecular de la purina y sus derivados naturales más frecuentes.

Tanto la adenina como la guanina son moléculas consideradas “fundamentales” para la vida. Debido a que forman parte de las bases nitrogenadas que conforman el ADN, tienen un rol esencial tanto en el correcto apareamiento de los nucleótidos en las hebras de ADN, como en la síntesis ribosomal de proteínas. Todos estos estos procesos, y su relevancia biológica, se debe principalmente a su Química Supramolecular.⁶⁷ Debido a su rol fundamental en todos estos fenómenos, la química de estas dos sustancias viene siendo ampliamente estudiada desde hace varios años.⁶⁸ Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en su comportamiento en solución, omitiendo y relegando así el estudio de sus fases sólidas.

Si estudiamos el caso particular de la adenina podemos observar que, aunque existen varios ejemplos de agregados supramoleculares o sistemas organometálicos que emplean esta molécula como bloque de construcción,^{69–71} muy poco se sabe actualmente sobre la química en estado sólido de la adenina por sí misma. Por el contrario, el universo de materiales sólidos biogénicos obtenidos a partir de guanina ha crecido enormemente en los últimos años.⁷² Esto es debido principalmente a su elevado índice de refracción que, junto con su gran abundancia natural, la vuelven ideal para ser empleada en el desarrollo de materiales refractantes, arreglos fotónicos y espejos naturales.⁷³

Por otro lado, la cafeína es un ingrediente farmacológicamente activo que presenta varias aplicaciones terapéuticas, entre las que resaltan su capacidad de reducir la fatiga e incrementar el estado de alerta, mejorar el desempeño de tareas asociadas a la vigilancia y el control,⁷⁴ y disminuir la incidencia de diabetes Tipo II y la enfermedad de Alzheimer.⁷⁵ Adicionalmente, en los últimos años ha despertado gran interés debido a su uso innovador como estimulante de la performance deportiva de alto rendimiento.⁷⁶ Es interesante notar que, aunque es considerado el compuesto psicoactivo más consumido a nivel mundial desde hace décadas,⁷⁷ el estudio de sus sales sigue despertando interés. Esto se debe a que recientemente se han postulado tanto a la cafeína como a sus sales como fuentes nutricionales de nitrógeno y de aniones de relevancia biológica, como el nitrato.⁷⁸

Tener una idea clara de la estructura y las propiedades fisicoquímicas más básicas de la purina y sus derivados es un prerequisito fundamental para comprender los mecanismos de acción de los productos naturales y los principios activos farmacológicos que encontramos en los seres vivos. Estas propiedades pueden modular varios de los mecanismos de algunas reacciones directamente implicadas en rutas metabólicas,⁷⁹

involucrarse en los procesos reguladores,⁸⁰ o hasta disparar mutaciones en el código genético.⁸¹

Se define como tautomerismo a la propiedad de poder desarrollar isómeros que se diferencian sólo en la posición de un grupo funcional. Estos isómeros están relacionados entre sí a través de un equilibrio que regula la distribución poblacional de las distintas especies. Los mecanismos que rigen estos equilibrios implican la migración de un grupo o átomo. Debido a su pequeño tamaño y la labilidad intrínseca de algunos de sus enlaces, de todos los posibles fenómenos de migración intramolecular, la reubicación de un protón es uno de los más frecuentes. A esta alteración de la locación de un protón en la estructura se la conoce como prototropía y es la forma más común de tautomería.⁸²

La tautomería prototrópica puede considerarse como una consecuencia estructural del comportamiento ácido-base. Estas tautomerizaciones son catalizadas por la presencia de ácidos o bases que asisten en los procesos de intercambio protónico transitorio y la formación de iones, la estabilización de los distintos estados de deslocalización de cargas, y la re-obtención de las estructuras iniciales a través de la migración asistida del protón intercambiado.⁸³

Considerando que todos los equilibrios tautoméricos están regidos principalmente por su carácter ácido-base, resulta esencial tener una idea clara de los rangos de pH en los cuales podemos encontrar de manera mayoritaria a cada una de las correspondientes especies ionizadas. Para eso es necesario construir sus diagramas de especiación empleando las constantes de acidez reportadas en bibliografía (Figura 7).⁸⁴⁻⁸⁸ Al mismo tiempo, estos rangos de pH permitirán seleccionar de manera racional los bloques de construcción empleados para la obtención de materiales basados en estos compuestos. Como se discutirá más adelante, el estado de carga será fundamental para racionalizar las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos en términos del número de pares iónicos presentes en la estructura y la disposición de estos en la red cristalina.

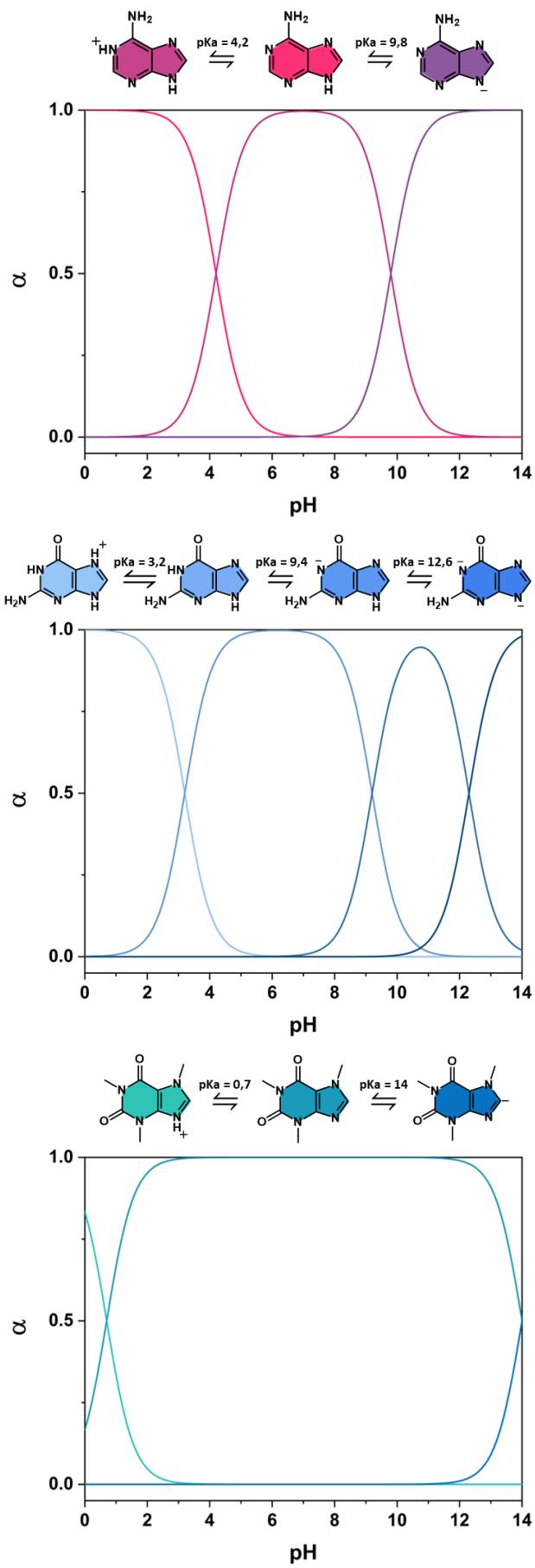


Figura 7. Diagramas de especiación de los compuestos utilizados durante en esta tesis.

La gran demanda que se ha generado en los últimos años a nivel mundial por drogas más eficientes ha llevado a la necesidad de mejorar el desempeño de muchos de los principios activos conocidos y al desarrollo de nuevas formulaciones que faciliten la dosificación, administración y el control sobre la farmacocinética de un medicamento.⁸⁹ En la actualidad existen varias estrategias utilizadas para diseñar formulaciones innovadoras con propiedades específicas como es el uso de sales⁹⁰ o la formación de co-cristales.⁹¹

Durante este Trabajo de Tesis se presentarán nuevos materiales bioinspirados obtenidos a partir de sales o hidratos de adenina, cafeína y guanina y se analizará de forma exhaustiva tanto sus propiedades mecánicas como su actividad como hospedadores de moléculas exógenas. Ambas cualidades se presentan detalladamente en el apartado de “Ingeniería Cristalina”.

Diseño racional de pequeñas moléculas para el desarrollo de nuevos materiales

Durante este Trabajo de Tesis se emplearán la L-Fenilalanina y la L-Tirosina para obtención de los diversos compuestos derivatizados con distintos aldehídos de relevancia biológica mediante la ruta sintética presentada anteriormente. A continuación, se detallan las distintas familias sintetizadas junto con la nomenclatura empleada a lo largo de la tesis para su identificación.

Todos los derivados de L-Fenilalanina se reconocerán como **1.x**, mientras que los derivados de L-Tirosina se nombrarán como **2.x**. (Figura 4)

Para identificar cada una de las plataformas carbonílicas empleadas, la “x” será reemplazada por, (Figura 5)

- a.** Benzaldehído
- b.** Tereftaldehído
- c.** 1,3,5-triformilbenceno
- d.** 2-Naftaldehido
- e.** Piperonal
- f.** Vainillina
- g.** 4,40-(Etano-1,2-diylbis(oxi))bis(3-metoxibenzaldehido). (*Divainillina*)

En todos los casos se considera que la cantidad de aminoácidos ligados a la plataforma aldehídica es la máxima posible. Por esto es por lo que no se indicará, en los casos en los que se emplea plataformas policarbonílicas, el número de aminoácidos ligados. A modo de ejemplo, empleando esta nomenclatura el derivado proveniente de la derivatización de Piperonal (**e**) con la L-Fenilalanina (**1.x**) será indicado como “**1.e**”. Mientras que el derivado del 1,3,5,-triformilbenceno (**c**) con la L-Tirosina (**2.x**) se indicará como “**2.c**”.

Por simplificación, para los motivos de esta tesis se propone una clasificación fundamentada principalmente en las similitudes estructurales entre compuestos, con una separación en subgrupos según el aminoácido. Esta propuesta de clasificación estructural es a fines de facilitar discusiones parciales y comparaciones directas dentro y entre las familias, y dista de ser la única posible. Teniendo como criterio principal de clasificación las diversas plataformas aromáticas empleadas, los compuestos sintetizados durante la tesis pueden englobarse en las siguientes categorías.

1) Derivados de plataformas aromáticas monocarbonílicas (Figura 8)

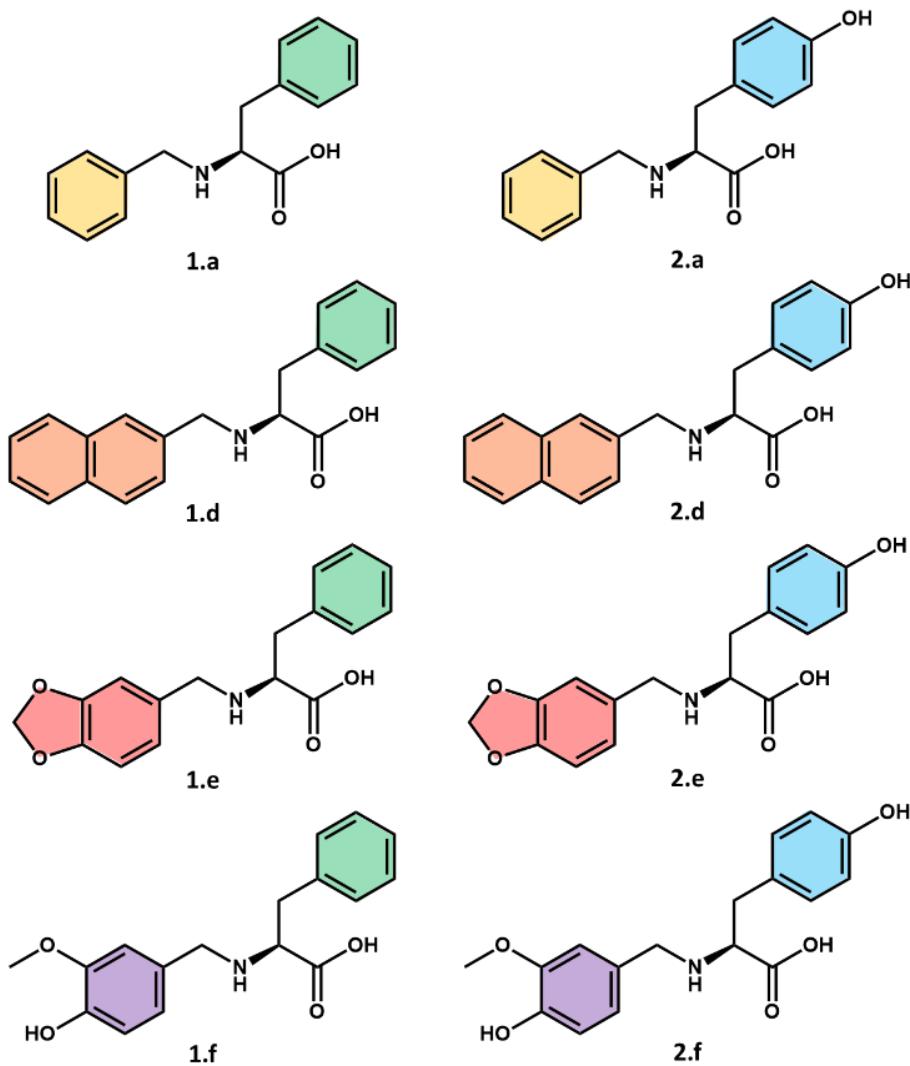


Figura 8

2) Poliderivados de plataformas carbonílicas con L-Fenilalanina (Figura 9).

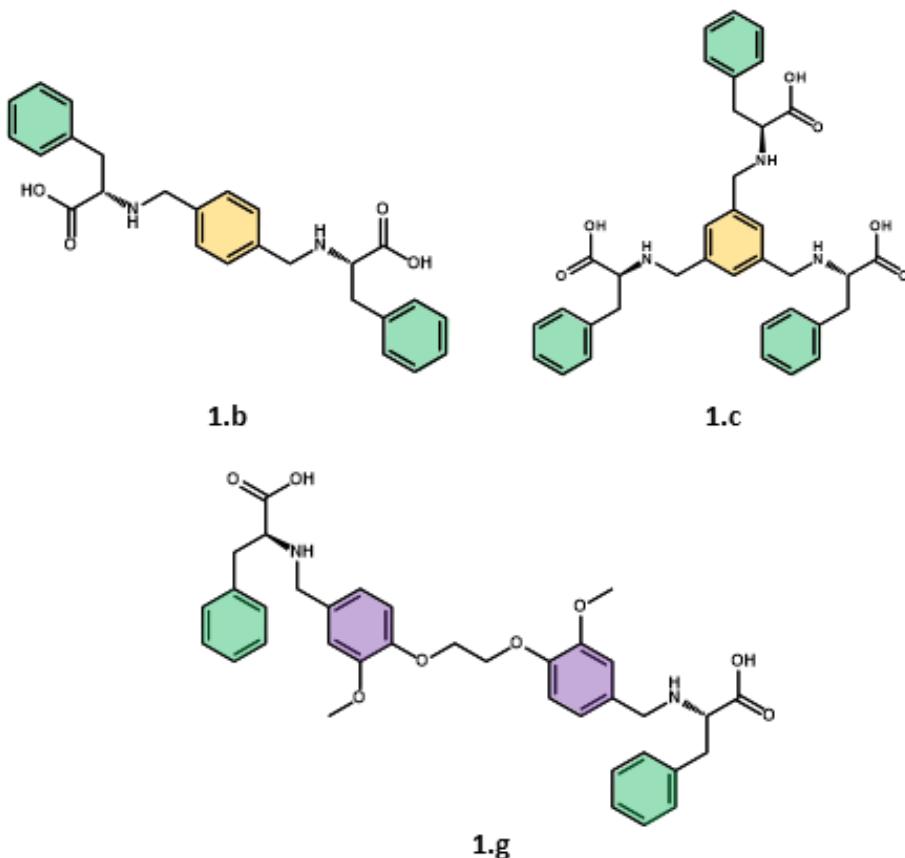


Figura 9.

Durante este Trabajo de Tesis se estudiará en detalle la Química Supramolecular y Conformacional de todos estos nuevos derivados, tanto en solución como en diversos materiales sólidos obtenidos a partir de distintas técnicas de precipitación. En base a un exhaustivo análisis realizado empleando espectroscopías dinámicas, técnicas de rayos X y cálculos computacionales se propondrá un modelo de autoensamblado en solución para todas estas sustancias y se propondrá un paralelismo entre este y la arquitectura estructural presente en diversas estructuras amiloides. Al mismo tiempo, se centrará la discusión en la capacidad de heredar ciertas propiedades supramoleculares de las moléculas parentales y como la introducción de una derivatización simple puede dar lugar a la modulación de estas.

Raíces supramoleculares de patologías humanas

La fenilcetonuria es un trastorno neuropsicológico que se genera debido a una concentración elevada del aminoácido L-Fenilalanina en el organismo. La concentración fisiológica de L-Fenilalanina en estas condiciones puede alcanzar valores de hasta 1,2mM, 20 veces lo esperado para un paciente sano. Esta elevada concentración de L-Fenilalanina en el organismo dispara la formación de estructuras filamentosas que han presentado una

marcada actividad citotóxica,⁹² y una sorprendente similitud estructural con las estructuras reportadas para proteínas amiloïdes⁴⁷

Aunque actualmente el rol de las estructuras amiloïdes sigue siendo motivo de debate,⁹³⁻⁹⁵ se considera que existe un carácter citotóxico íntimamente ligado a los primeros estadios de formación de las fibras o filamentos característicos de estas estructuras.

Una de las particulares que caracterizan a estas estructuras es su ubicuidad en el organismo, lo cual ha generado que se las haya relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas,⁹⁶ patologías cardíacas,⁹⁷ o actividad citotóxica en distintos órganos.⁹⁸⁻¹⁰² Entre las más estudiadas de estas patologías se encuentra la enfermedad de Alzheimer, considerada una amiloidosis neuro localizada. Una de las principales características de esta enfermedad es la formación de placas seniles en el cerebro,¹⁰³ como consecuencia del empaquetamiento de agregados fibrilares del péptido A β , que se depositan extracelularmente en la materia gris del cerebro (Figura 10).¹⁰⁴

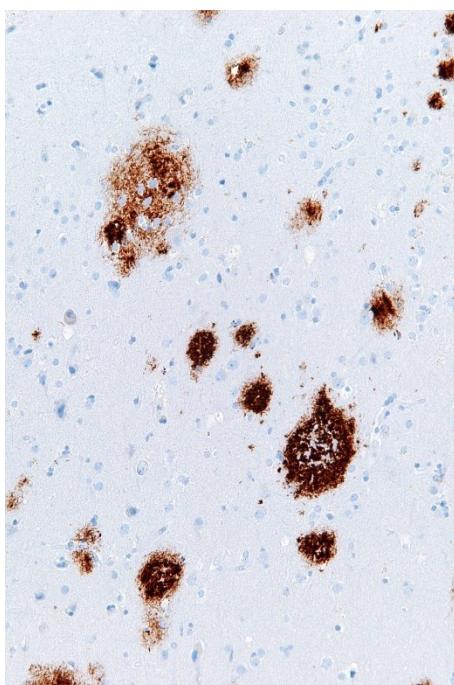


Figura 10. Micrografía de una angiopatía cerebral producida por placas amiloïdes (marrón) depositadas en el córtex cerebral. Imagen tomada de la referencia ¹⁰³.

Sorprendentemente, se considera que el péptido A β no presenta una estructura terciaria intrínseca, lo cual ha generado grandes desafíos en lo que respecta a su caracterización en estado sólido. Aunque existen trabajos que reportan una estructura enriquecida en conformaciones del tipo lámina beta en las placas amiloïdes,¹⁰⁵ motivo por el cual el péptido obtuvo su nombre, no existen actualmente estructuras reportadas con resolución atómica para el péptido en condiciones fisiológicas.

La principal diferencia entre el rol fisiológico y el desarrollo de la actividad citotóxica parece estar dado por la formación de agregados supramoleculares en concentraciones tales que se aprecia la agregación, pero no es suficiente para precipitar.¹⁰⁶ La precipitación da como resultado la formación de placas amiloïdes, cuyo rol parecen ser

únicamente acumulativo, sin una actividad patológica formalmente asignada.¹⁰⁷ La hipótesis actual propone que las placas amiloïdes son solo una vía de eliminación del β -amiloide soluble.⁹⁴ Esto implica que existe un delicado equilibrio de precipitación en el cual se encuentran involucradas especies individuales, agregados supramoleculares y partículas macroscópicas, de forma similar al establecido en la termodinámica clásica para describir los procesos de formación de materiales cristalinos a través del mecanismo de nucleación y crecimiento.¹⁰⁸

La capacidad de desarrollar estructuras fibrilares con actividad citotóxica no solo se encuentra reportada para el péptido beta amiloide ($A\beta$), sino también para varias proteínas y metabolitos endógenos, incluyendo algunos ejemplos de moléculas pequeñas no proteicas como el uracilo, la cisteína y la adenina.⁴¹ Además, algunos de los agregados supramoleculares desarrollados por estas pequeñas moléculas ya han demostrado su capacidad de actuar como semillas para inducir la formación de estructuras amiloïdes en ciertas proteínas.¹⁰⁹

En vista a lo discutido anteriormente es esencial contar con una descripción clara y precisa que nos permita identificar cuales estructuras fibrilares implican un riesgo potencial para la salud celular. Esto dispara el interrogante que impulsó el estudio de la Química Supramolecular de los derivados de aminoácidos sintetizados en esta tesis en el contexto de la formación de estructuras amiloïdes y sus propiedades.

Definición, detección y cuantificación del carácter amiloide

Uno de los mayores desafíos que existe a la hora de poder identificar la presencia de un amiloide en un sistema reside principalmente en los enormes cambios que ha sufrido la definición de “estructura amiloide” a lo largo de la última década¹¹⁰. Aunque este término viene siendo empleado desde 1854,¹¹¹ la masiva diversificación estructural asociada a este término, fruto del rápido avance que tuvo el estudio de este tipo de materiales en los últimos años dio lugar a una serie de abusos no intencionados en la nomenclatura.

A modo de ejemplo, en los primeros reportes registrados de estructuras amiloïdes se consideraba que estas estaban conformadas casi de manera exclusiva del péptido $A\beta$, debido a su rol en el desarrollo de las placas amiloïdes.¹¹⁰ Adicionalmente, las primeras acepciones de la palabra “amiloide” estaban directamente relacionadas con compuestos que dieran un resultado positivo del ensayo de tinción por iodo, que es inespecífico y puede dar lugar a falsos positivos en presencia de diversos polímeros y materiales cristalinos si estos no son correctamente eliminados de la matriz con anterioridad.¹¹² Debido a la carencia de una definición rigurosa, tanto desde lo cualitativo como desde lo estructural, el término fue adoptando varias formas y su uso se fue alterando de manera casi arbitraria para describir a un conjunto de estructuras fibriformes asociadas al incorrecto plegamiento proteico, y con una implicancia potencial en patologías relacionadas con la actividad citotóxica.¹¹³

Sin embargo, en la actualidad la hipótesis general de formación de estructuras amiloïdes ha sido extendida hasta el campo de las moléculas pequeñas, llegando a alcanzar un gran número de metabolitos, incluyendo algunos no proteicos.⁴¹ Esta explosiva

expansión en el grupo de estructuras con potencial actividad amilogénica puso en jaque las técnicas de detección y diagnóstico actuales y llevó a la necesidad de revisar el modelo amiloide actual para incluir todos estos nuevos agentes formadores.¹¹⁰ Al mismo tiempo, a medida que el objeto de estudio se amplía para incluir moléculas nuevas y diversas, cada vez es más fácil observar sustancias capaces de dar lugar a la formación de agregados con aspecto fibrilar pero que responden de manera limitada o nula a las técnicas clásicas de identificación de estructuras amiloides.¹¹⁴

Las técnicas empleadas actualmente, tinción con Rojo Congo y registro de la emisión de Tioflavina T, aunque rápidas y simples, presentan fuertes limitaciones en su selectividad y sensibilidad, y ya se encuentran reportadas varias restricciones para su uso en presencia de sustancias exógenas o matrices complejas.^{115,116} Esto se debe a que los mecanismos implicados en la interacción entre sonda y estructura durante ambos ensayos no requieren la presencia de una característica que sea única y específica de las estructuras amiloides. Esta baja especificidad genera que estos ensayos sean poco confiables cuando se estudian matrices complejas y pueden dar lugar a errores tanto de Tipo I (Falsos positivos) como de Tipo II (falsos negativos).^{117,118} La utilización de ensayos colorimétricos, aunque ampliamente aceptados e implementados en la histoquímica diagnóstica por su velocidad y bajo costo,¹⁰⁴ no son del todo satisfactorios a la hora de garantizar una detección eficaz de las primeras etapas de formación de este tipo de agregados.^{104,115,119} Adicionalmente, a medida que el número de sustancias estudiadas aumenta y se diversifica, se vuelve más desafiante encontrar un ensayo simple, selectivo, sensible y universal que permita detectar y/o confirmar la naturaleza amiloide de un agregado supramolecular. Esta limitación se vuelve más apremiante si tenemos en cuenta que una misma molécula puede dar lugar a la formación de agregados con estructura amiloide en ciertas condiciones experimentales y luego desarrollar un material completamente distinto cuando esas condiciones son alteradas levemente.¹²⁰

Esta imprecisión en la definición de estructura amiloide nos obliga a buscar una metodología rigurosa y sistemática de detección y categorización de estos agregados supramoleculares fibriformes que pueda extenderse a todos los posibles compuestos capaces de desarrollarlos. Por lo tanto, es necesario pensar en un nuevo paradigma para la interpretación de la naturaleza amiloide. Durante el Capítulo V se discutirá en detalle una nueva definición y se mostrarán varios ejemplos en que esta metodología de detección de estructuras con carácter amilogénico puede ser empleada de manera directa para el estudio de nuevas sustancias. Además, se sentarán las bases para pensar el carácter amiloide ya no como una característica binaria que se “tiene” o “no se tiene” en un sistema sino, más bien, como una propiedad continua que aumenta o disminuye en tanto el agregado se apegue en mayor o menor medida a una dada propuesta estructural específica. A esta propuesta estructural se la denominará el “carácter amiloide”, y se relacionará con la presencia de una distribución específica de planos de interacción fuerte y débil, los cuales permiten explicar la inmensa mayoría de las propiedades y características usualmente asociadas a estos compuestos.

Durante este Trabajo de Tesis se ilustrará cómo emplear esta nueva definición del carácter amiloide para el análisis de las estructuras supramoleculares de la familia de nuevos compuestos sintetizados a partir de L-Fenilalanina y L-Tirosina con diversas

plataformas aldehídicas. Al mismo tiempo, se estudiará la naturaleza de la interacción entre estas sustancias y células nerviosas extraídas de neuroblastos de ratón, con el fin de ensayar la potencial actividad amilogénica, citotóxica o estimuladora de la reprogramación neuronal de estas sustancias.

Objetivos generales y estructura de la tesis

Durante este Trabajo de Tesis Doctoral se presentará el estudio pormenorizado de los fenómenos de autoensamblado de una familia de compuestos derivados de los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina y de purinas de interés biológico como la adenina, la guanina y la cafeína. Se mostrará cómo todas estas sustancias dan lugar a la obtención de diversos materiales supramoleculares y se analizará en detalle las arquitecturas estructurales que podrían estar generándose en todos estos sistemas.

Los objetivos generales del trabajo se detallan a continuación:

- 1) Sintetizar y caracterizar dos familias de nuevos compuestos basados en los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina empleando diversos aldehídos de interés biológico.
- 2) Estudiar en detalle la Química Supramolecular y Conformacional de todos estos nuevos derivados, tanto en solución como en los diversos materiales sólidos, obtenidos a partir de distintas técnicas de precipitación. Particularmente, se pondrá el foco en estudiar la capacidad de heredar ciertas propiedades supramoleculares desde las moléculas parentales y entender cómo la introducción de derivatizaciones puede dar lugar a su modulación. Al mismo tiempo, se ilustrará la relación directa que existe entre los ensambles moleculares desarrollados por estas sustancias y sistemas biológicamente activos reportados previamente en la bibliografía.
- 3) Emplear estas nuevas moléculas, junto con algunas purinas de interés biológico, para obtener diversos materiales bioinspirados que van desde sólidos cristalinos hasta geles supramoleculares y cristales líquidos.
- 4) Extender el estudio la Química Supramolecular y Conformacional de todos estos bloques de construcción, y entender su impacto en el diseño racional de nuevos ensambles supramoleculares, empleando el marco conceptual que ofrece la Ingeniería Cristalina. Para esto se utilizarán conceptos como las fuerzas restitutivas y las regiones de respuesta colectiva, y descriptores estructurales como el factor de forma o el carácter convergente o divergente de un bloque de construcción.

En el presente Capítulo I, “**Introducción**”, se presenta el contexto histórico, los antecedentes y el estado del arte relacionado a la Química Supramolecular, la Química Conformacional y la Ingeniería Cristalina. Adicionalmente, se introducen algunos

conceptos fundamentales sobre el análisis estructural en términos de la relación entre empaquetamiento y hábito cristalino y la respuesta mecánica del material resultante. Finalmente, se ilustran las dificultades que enfrenta actualmente la definición de una estructura amiloide basada en sus propiedades y características, y se presenta una nueva propuesta en relación a su descripción en términos estructurales.

En el Capítulo II, “**Materiales y Métodos**”, se detallan las distintas técnicas experimentales utilizadas, el instrumental empleado para el análisis y la caracterización, la metodología usada durante los cálculos computacionales y se introducen los dos descriptores estructurales que serán empleados luego a lo largo de todo el Trabajo de Tesis.

En los Capítulos III y IV, “**Química Conformacional y Supramolecular y fenómenos de autoensamblado de pequeñas moléculas derivadas de aminoácidos**” y “**Estudio estructural y supramolecular de las propiedades de autoensamblado de plataformas poliderivatizadas con aminoácidos**” se presenta la síntesis y caracterización de dos nuevas familias de compuestos basadas en los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina y el análisis pormenorizado de su Química Supramolecular tanto en solución como en estado sólido, así como una serie de diversos materiales moleculares sintetizados a partir de estas moléculas con el fin de verificar la relación predicha entre estructura molecular, libertad conformacional, capacidad supramolecular y propiedades del sistema material obtenido.

En el Capítulo V, “**Nanoestructuras con potencial actividad amilogénica obtenidas a partir de derivados de aminoácidos: estudio estructural y evaluación citotóxica**”, se ilustra cómo emplear la definición estructural del carácter amiloide para el análisis de las estructuras supramoleculares de la familia de nuevos compuestos sintetizados a partir de L-Fenilalanina y L-Tirosina con diversas plataformas aldehídicas. Como prueba de concepto, se estudia la naturaleza de la interacción entre estas sustancias y células nerviosas extraídas de neuroblastos de ratón, con el fin de investigar la potencial actividad amilogénica, citotóxica o estimuladora de la reprogramación neuronal de estas sustancias.

En el Capítulo VI, “**Propiedades mecánicas y ópticas de materiales cristalinos bioinspirados**”, se presenta una familia de materiales bioinspirados obtenidos a partir de sales o hidratos de adenina, cafeína y guanina, y se realiza un análisis exhaustivo tanto sus propiedades mecánicas como su actividad como hospedadores de moléculas exógenas, y las alteraciones que introduce la presencia de estas moléculas tanto en la estructura cristalina como en las propiedades ópticas del material resultante.

Finalmente, en el capítulo VII, “**Conclusiones y Perspectiva**”, se detallan las conclusiones generales y se analizan las posibles perspectivas y continuaciones del trabajo presentado durante esta tesis.

Bibliografía

- (1) Wohler, M. F. Artificial Formation of Urea. *Philos. Mag.* **1828**, 4 (22), 309–310. <https://doi.org/10.1080/14786442808674820>.
- (2) Zhang, B.; Wepf, R.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Besse, S.; Lindner, P.; King, B. T.; Sigel, R.; Schurtenberger, P.; Talmon, Y.; Ding, Y.; Kröger, M.; Halperin, A.; Schlüter, A. D. The Largest Synthetic Structure with Molecular Precision: Towards a Molecular Object. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (3), 737–740. <https://doi.org/10.1002/anie.201005164>.
- (3) Fessner, W. D.; Sedelmeier, G.; Spurr, P. R.; Rihs, G.; Prinzbach, H. “Pagodane”: The Efficient Synthesis of a Novel, Versatile Molecular Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109 (15), 4626–4642. <https://doi.org/10.1021/ja00249a029>.
- (4) Chanteau, S. H.; Tour, J. M. Synthesis of Anthropomorphic Molecules: The NanoPutians. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (23), 8750–8766. <https://doi.org/10.1021/jo0349227>.
- (5) Lehn, J.-M. Supramolecular Chemistry. *Science* **1993**, 260 (5115), 1762–1763. <https://doi.org/10.1126/science.8511582>.
- (6) Lehn, J.-M. Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29 (11), 1304–1319. <https://doi.org/10.1002/anie.199013041>.
- (7) Isomería conformacional. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (8) Edad de Piedra. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (9) Edad del Bronce. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (10) Edad del Hierro. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (11) Amabilino, D. B.; Smith, D. K.; Steed, J. W. Supramolecular Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (9), 2404–2420. <https://doi.org/10.1039/C7CS00163K>.
- (12) *Soft Matter Physics: An Introduction*; Kleman, M., Lavrentovich, O. D., Eds.; Springer: New York, NY, 2003. <https://doi.org/10.1007/b97416>.
- (13) Stupp, S. I.; Palmer, L. C. Supramolecular Chemistry and Self-Assembly in Organic Materials Design. *Chem. Mater.* **2014**, 26 (1), 507–518. <https://doi.org/10.1021/cm403028b>.
- (14) Vicent, C.; Hirst, S. C.; Garcia-Tellado, F.; Hamilton, A. D. Conformational Selectivity in Molecular Recognition: The Influence of Artificial Receptors on the Cis-Trans Isomerization of Acylprolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113 (14), 5466–5467. <https://doi.org/10.1021/ja00014a055>.
- (15) Sinawang, G.; Osaki, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Supramolecular Self-Healing Materials from Non-Covalent Cross-Linking Host–Guest Interactions. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (32), 4381–4395. <https://doi.org/10.1039/D0CC00672F>.
- (16) Beck, J. B.; Rowan, S. J. Multistimuli, Multiresponsive Metallo-Supramolecular Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (46), 13922–13923. <https://doi.org/10.1021/ja038521k>.
- (17) Lommel, R. V.; Zhao, J.; Borggraeve, W. M. D.; Proft, F. D.; Alonso, M. Molecular Dynamics Based Descriptors for Predicting Supramolecular Gelation. *Chem. Sci.* **2020**, 11 (16), 4226–4238. <https://doi.org/10.1039/D0SC00129E>.
- (18) Schmidt, H.-W.; Würthner, F. A Periodic System of Supramolecular Elements. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59 (23), 8766–8775. <https://doi.org/10.1002/anie.201915643>.

- (19) Li, L.; Chen, J.; Wang, Z.; Xie, L.; Feng, C.; He, G.; Hu, H.; Sun, R.; Zhu, H. A Supramolecular Gel Made from an Azobenzene-Based Phenylalanine Derivative: Synthesis, Self-Assembly, and Dye Adsorption. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, 628, 127289. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127289>.
- (20) Huang, Z.; Zhang, J.; Liu, Y.; Song, A.; Hao, J. Phenylalanine-Based Ionic Liquid Crystals with Water-Induced Phase Transition Behaviors. *J. Mol. Liq.* **2020**, 301, 112399. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112399>.
- (21) Wu, J.; Yi, T.; Xia, Q.; Zou, Y.; Liu, F.; Dong, J.; Shu, T.; Li, F.; Huang, C. Tunable Gel Formation by Both Sonication and Thermal Processing in a Cholesterol-Based Self-Assembly System. *Chem. - Eur. J.* **2009**, 15 (25), 6234–6243. <https://doi.org/10.1002/chem.200900409>.
- (22) Siemers, B.; Stempien, A.; Craven, R.; Napiwocki, B.; Crone, W. Biomaterials with Functionally Graded Stiffness. *FASEB J.* **2019**, 33 (S1), 785.9–785.9. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.785.9.
- (23) Lu, W.; Lee, N. A.; Buehler, M. J. Modeling and Design of Heterogeneous Hierarchical Bioinspired Spider Web Structures Using Deep Learning and Additive Manufacturing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2023**, 120 (31), e2305273120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2305273120>.
- (24) Gur, D.; Palmer, B. A.; Leshem, B.; Oron, D.; Fratzl, P.; Weiner, S.; Addadi, L. The Mechanism of Color Change in the Neon Tetra Fish: A Light-Induced Tunable Photonic Crystal Array. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54 (42), 12426–12430. <https://doi.org/10.1002/anie.201502268>.
- (25) Teyssier, J.; Saenko, S. V.; van der Marel, D.; Milinkovitch, M. C. Photonic Crystals Cause Active Colour Change in Chameleons. *Nat. Commun.* **2015**, 6 (1), 6368. <https://doi.org/10.1038/ncomms7368>.
- (26) Chen, J.; Wang, L.; Xu, X.; Liu, G.; Liu, H.; Qiao, Y.; Chen, J.; Cao, S.; Cha, Q.; Wang, T. Self-Healing Materials-Based Electronic Skin: Mechanism, Development and Applications. *Gels* **2022**, 8 (6), 356. <https://doi.org/10.3390/gels8060356>.
- (27) Braga, D.; Desiraju, G. R.; Miller, J. S.; Orpen, A. G.; Price, S. (Sally) L. Innovation in Crystal Engineering. *CrystEngComm* **2002**, 4 (83), 500–509. <https://doi.org/10.1039/B207466B>.
- (28) Novoa, J. J.; Braga, D.; Addadi, L. *Engineering of Crystalline Materials Properties: State of the Art in Modeling, Design and Applications*; Springer Science & Business Media, 2007.
- (29) Schmidt, G. M. J. Photodimerization in the Solid State. *Pure Appl. Chem.* **1971**, 27 (4), 647–678. <https://doi.org/10.1351/pac197127040647>.
- (30) Senhora, F. V.; Sanders, E. D.; Paulino, G. H. Optimally-Tailored Spinodal Architected Materials for Multiscale Design and Manufacturing. *Adv. Mater.* **2022**, 34 (26), 2109304. <https://doi.org/10.1002/adma.202109304>.
- (31) Sundar, V.; Rusin, R. P.; Rutiser, C. A. *Bioceramics: Materials and Applications V: Proceedings of the 106th Annual Meeting of The American Ceramic Society, Indianapolis, Indiana, USA 2004*; John Wiley & Sons, 2012.
- (32) Hsieh, M.-T.; Begley, M. R.; Valdevit, L. Architected Implant Designs for Long Bones: Advantages of Minimal Surface-Based Topologies. *Mater. Des.* **2021**, 207, 109838. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109838>.
- (33) Moore, A. C.; Crawford, D. Spinodal Decomposition in Naturally Occurring Non-Cubic Spinels. *Nature* **1978**, 274 (5668), 237–239. <https://doi.org/10.1038/274237a0>.
- (34) Kim, S.; Lee, J. Spinodal Decomposition: A New Approach to Hierarchically Porous Inorganic Materials for Energy Storage. *Natl. Sci. Rev.* **2020**, 7 (11), 1635–1637. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz217>.

- (35) Kumar, S.; Tan, S.; Zheng, L.; Kochmann, D. M. Inverse-Designed Spinodoid Metamaterials. *Npj Comput. Mater.* **2020**, *6* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41524-020-0341-6>.
- (36) Tudi, A.; Han, S.; Yang, Z.; Pan, S. Potential Optical Functional Crystals with Large Birefringence: Recent Advances and Future Prospects. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *459*, 214380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214380>.
- (37) Hsieh, M.-T.; Endo, B.; Zhang, Y.; Bauer, J.; Valdevit, L. The Mechanical Response of Cellular Materials with Spinodal Topologies. *J. Mech. Phys. Solids* **2019**, *125*, 401–419. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2019.01.002>.
- (38) Guell Izard, A.; Bauer, J.; Crook, C.; Turlo, V.; Valdevit, L. Ultrahigh Energy Absorption Multifunctional Spinodal Nanoarchitectures. *Small* **2019**, *15* (45), 1903834. <https://doi.org/10.1002/smll.201903834>.
- (39) Imai, M.; Kaji, K. Polymer Crystallization from the Metastable Melt: The Formation Mechanism of Spherulites. *Polymer* **2006**, *47* (15), 5544–5554. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.109>.
- (40) Cahn, J. W.; Hilliard, J. E. Free Energy of a Nonuniform System. I. Interfacial Free Energy. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28* (2), 258–267. <https://doi.org/10.1063/1.1744102>.
- (41) Shaham-Niv, S.; Adler-Abramovich, L.; Schnaider, L.; Gazit, E. Extension of the Generic Amyloid Hypothesis to Nonproteinaceous Metabolite Assemblies. *Sci. Adv.* **2015**, *1* (7), e1500137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500137>.
- (42) Li, J.-L.; Liu, X.-Y. Architecture of Supramolecular Soft Functional Materials: From Understanding to Micro-/Nanoscale Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (19), 3196–3216. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000744>.
- (43) Aizen, R.; Tao, K.; Rencus-Lazar, S.; Gazit, E. Functional Metabolite Assemblies—a Review. *J. Nanoparticle Res.* **2018**, *20* (5). <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4217-3>.
- (44) Ji, W.; Xue, B.; Arnon, Z. A.; Yuan, H.; Bera, S.; Li, Q.; Zaguri, D.; Reynolds, P.; Li, H.; Chen, Y.; Gilead, S.; Rencus-Lazar, S.; Li, J.; Cao, Y.; Gazit, E. Rigid Tightly-Packed Amino Acid Crystals as Functional Supramolecular Materials. *18*.
- (45) *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation*; [Geneva, 9 - 16 April 2002]; Weltgesundheitsorganisation, FAO, Vereinte Nationen, Eds.; WHO technical report series; WHO: Geneva, 2007.
- (46) Nartowski, K. P.; Ramalhete, S. M.; Martin, P. C.; Foster, J. S.; Heinrich, M.; Eddleston, M. D.; Green, H. R.; Day, G. M.; Khimyak, Y. Z.; Lloyd, G. O. The Plot Thickens: Gelation by Phenylalanine in Water and Dimethyl Sulfoxide. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17* (8), 4100–4109. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00213>.
- (47) Adler-Abramovich, L.; Vaks, L.; Carny, O.; Trudler, D.; Magno, A.; Caflisch, A.; Frenkel, D.; Gazit, E. Phenylalanine Assembly into Toxic Fibrils Suggests Amyloid Etiology in Phenylketonuria. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (8), 701–706. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1002>.
- (48) Singh, P.; Wangoo, N.; Sharma, R. K. Phenylalanine Dimer Assembly Structure as the Basic Building Block of an Amyloid like Photoluminescent Nanofibril Network. *Soft Matter* **2020**, *16* (17), 4105–4109. <https://doi.org/10.1039/D0SM00387E>.
- (49) Zaguri, D.; Shaham-Niv, S.; Chakraborty, P.; Arnon, Z.; Makam, P.; Bera, S.; Rencus-Lazar, S.; Stoddart, P. R.; Gazit, E.; Reynolds, N. P. Nanomechanical Properties and Phase Behavior of Phenylalanine Amyloid Ribbon Assemblies and Amorphous Self-Healing Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (19), 21992–22001. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c01574>.

- (50) Das, T.; Häring, M.; Haldar, D.; Díaz, D. D. Phenylalanine and Derivatives as Versatile Low-Molecular-Weight Gelators: Design, Structure and Tailored Function. *Biomater. Sci.* **2018**, *6* (1), 38–59. <https://doi.org/10.1039/c7bm00882a>.
- (51) Singh, V.; Snigdha, K.; Singh, C.; Sinha, N.; Thakur, A. K. Understanding the Self-Assembly of Fmoc–Phenylalanine to Hydrogel Formation. *Soft Matter* **2015**, *11* (26), 5353–5364. <https://doi.org/10.1039/C5SM00843C>.
- (52) Manna, U.; Roy, R.; Datta, H. K.; Dastidar, P. Supramolecular Gels from Bis-Amides of L-Phenylalanine: Synthesis, Structure and Material Applications. *Chem. – Asian J.* **2022**, *17* (19), e202200660. <https://doi.org/10.1002/asia.202200660>.
- (53) Banik, D.; Kundu, S.; Banerjee, P.; Dutta, R.; Sarkar, N. Investigation of Fibril Forming Mechanisms of L-Phenylalanine and L-Tyrosine: Microscopic Insight toward Phenylketonuria and Tyrosinemia Type II. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (7), 1533–1543. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b12220>.
- (54) Kaur, B.; Chakraborty, D. Biotechnological and Molecular Approaches for Vanillin Production: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169* (4), 1353–1372. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0066-1>.
- (55) Jain, A. N.; Khan, T. R.; Daugulis, A. J. Bioproduction of Benzaldehyde in a Solid–Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor Using *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1649–1654.
- (56) Akash, J.; Dushyant, C.; Jasmine, C. Piperonal: The Journey so Far. *Mini Rev. Med. Chem.* **2020**, *20* (18), 1846–1856. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200711173149>.
- (57) Shetty, K. *Food Biotechnology*; Taylor & Francis Group, 2006.
- (58) Pohl, M.; Lingen, B.; Müller, M. Thiamin-Diphosphate-Dependent Enzymes: New Aspects of Asymmetric C=C Bond Formation. *Chem. – Eur. J.* **2002**, *8* (23), 5288–5295. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20021202\)8:23<5288::AID-CHEM5288>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20021202)8:23<5288::AID-CHEM5288>3.0.CO;2-F).
- (59) Adenosín trifosfato. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (60) Adenosín monofosfato cíclico. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (61) Nicotinamida adenina dinucleótido. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2023.
- (62) Flavín adenín dinucleótido. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; 2022.
- (63) Löfgren, N.; Lüning, B.; Hedström, H. The Isolation of Nebularine and the Determination of Its Structure. *Acta Chem Scand* **1954**, *8* (4), 670–680.
- (64) Legraverend, M.; Grierson, D. S. The Purines: Potent and Versatile Small Molecule Inhibitors and Modulators of Key Biological Targets. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (12), 3987–4006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.12.060>.
- (65) Lockyer, S.; Stanner, S. Diet and Gout – What Is the Role of Purines? *Nutr. Bull.* **2016**, *41* (2), 155–166. <https://doi.org/10.1111/nbu.12205>.
- (66) Villegas, R.; Xiang, Y.-B.; Elasy, T.; Xu, W. H.; Cai, H.; Cai, Q.; Linton, M. F.; Fazio, S.; Zheng, W.; Shu, X.-O. Purine-Rich Foods, Protein Intake, and the Prevalence of Hyperuricemia: The Shanghai Men’s Health Study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2012**, *22* (5), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.07.012>.
- (67) Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry*; Wiley New York, 2002.
- (68) Broomhead, J. M. The Structures of Pyrimidines and Purines. IV. The Crystal Structure of Guanine Hydrochloride and Its Relation to That of Adenine Hydrochloride. *Acta Crystallogr.* **1951**, *4* (2), 92–100. <https://doi.org/10.1107/S0365110X51000349>.

- (69) Verma, S.; Mishra, A. K.; Kumar, J. The Many Facets of Adenine: Coordination, Crystal Patterns, and Catalysis. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (1), 79–91. <https://doi.org/10.1021/ar9001334>.
- (70) Burneo, I.; Stylianou, K. C.; Rodríguez-Hermida, S.; Juanhuix, J.; Fontrodona, X.; Imaz, I.; MasPOCH, D. Two New Adenine-Based Co(II) Coordination Polymers: Synthesis, Crystal Structure, Coordination Modes, and Reversible Hydrochromic Behavior. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (7), 3182–3189. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00218>.
- (71) Fu, H.-R.; Zhang, J. Flexible Porous Zinc-Pyrazole-Adenine Framework for Hysteretic Sorption of Light Hydrocarbons. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (3), 1210–1213.
- (72) Hu, H.; Xue, R.; Chen, F. Biominerization and Properties of Guanine Crystals. *Molecules* **2023**, *28* (16), 6138. <https://doi.org/10.3390/molecules28166138>.
- (73) Gur, D.; Palmer, B. A.; Weiner, S.; Addadi, L. Light Manipulation by Guanine Crystals in Organisms: Biogenic Scatterers, Mirrors, Multilayer Reflectors and Photonic Crystals. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (6), 1603514. <https://doi.org/10.1002/adfm.201603514>.
- (74) Smith, A. Effects of Caffeine on Human Behavior. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40* (9), 1243–1255. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00096-0).
- (75) Grossi, G.; Godos, J.; Galvano, F.; Giovannucci, E. L. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annu. Rev. Nutr.* **2017**, *37* (1), 131–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064941>.
- (76) Ganio, M. S.; Klau, J. F.; Casa, D. J.; Armstrong, L. E.; Maresh, C. M. Effect of Caffeine on Sport-Specific Endurance Performance: A Systematic Review. *J. Strength Cond. Res.* **2009**, *23* (1), 315. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31818b979a>.
- (77) Nawrot, P.; Jordan, S.; Eastwood, J.; Rotstein, J.; Hugenholtz, A.; Feeley, M. Effects of Caffeine on Human Health. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20* (1), 1–30. <https://doi.org/10.1080/0265203021000007840>.
- (78) Gao, C.; Gupta, S.; Adli, T.; Hou, W.; Coolsaet, R.; Hayes, A.; Kim, K.; Pandey, A.; Gordon, J.; Chahil, G.; Belley-Cote, E. P.; Whitlock, R. P. The Effects of Dietary Nitrate Supplementation on Endurance Exercise Performance and Cardiorespiratory Measures in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2021**, *18* (1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00450-4>.
- (79) Golankiewicz, B.; Ostrowski, T.; Goslinski, T.; Januszczak, P.; Zeidler, J.; Baranowski, D.; de Clercq, E. Fluorescent Tricyclic Analogues of Acyclovir and Ganciclovir. A Structure-Antiviral Activity Study. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (24), 4284–4287. <https://doi.org/10.1021/jm010922s>.
- (80) Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- (81) Florián, J.; Leszczyński, J. Spontaneous DNA Mutations Induced by Proton Transfer in the Guanine-Cytosine Base Pairs: An Energetic Perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (12), 3010–3017. <https://doi.org/10.1021/ja951983g>.
- (82) Chemistry (IUPAC), T. I. U. of P. and A. *IUPAC - tautomerism (T06252)*. <https://doi.org/10.1351/goldbook.T06252>.
- (83) Kumar, M.; Busch, D. H.; Subramaniam, B.; Thompson, W. H. Barrierless Tautomerization of Criegee Intermediates via Acid Catalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (42), 22968–22973. <https://doi.org/10.1039/C4CP03065F>.

- (84) Taylor, H. F. W. 152. The Dissociation Constants of Benziminazole and Certain Purine Derivatives. *J. Chem. Soc. Resumed* **1948**, No. 0, 765–766. <https://doi.org/10.1039/JR9480000765>.
- (85) Albert, A.; Brown, D. J. Purine Studies. Part I. Stability to Acid and Alkali. Solubility. Ionization. Comparison with Pteridines. *J. Chem. Soc. Resumed* **1954**, No. 0, 2060–2071. <https://doi.org/10.1039/JR9540002060>.
- (86) Jang, Y. H.; Goddard, W. A.; Noyes, K. T.; Sowers, L. C.; Hwang, S.; Chung, D. S. pKa Values of Guanine in Water: Density Functional Theory Calculations Combined with Poisson–Boltzmann Continuum–Solvation Model. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (1), 344–357. <https://doi.org/10.1021/jp020774x>.
- (87) Bonati, M.; Garattini, S. Interspecies Comparison of Caffeine Disposition. In *Caffeine: Perspectives from Recent Research*; Dews, P. B., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1984; pp 48–56. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69823-1_3.
- (88) Mattoo, B. N.; Pai, P. P. Caffeine, Its Basicity, Acidity, Hydrolysis & Spectrophotometric Assay. **1977**.
- (89) Palucki, M.; Higgins, J. D.; Kwong, E.; Templeton, A. C. Strategies at the Interface of Drug Discovery and Development: Early Optimization of the Solid State Phase and Preclinical Toxicology Formulation for Potential Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (16), 5897–5905. <https://doi.org/10.1021/jm1002638>.
- (90) Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.010>.
- (91) Vishweshwar, P.; McMahon, J. A.; Bis, J. A.; Zaworotko, M. J. Pharmaceutical Co-Crystals. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95* (3), 499–516. <https://doi.org/10.1002/jps.20578>.
- (92) Chowdhury, T.; Bardhan, S.; Maiti, R. A Review on the Self-Assembly of Phenylalanine as the Hallmark of the Neurological Disorder Phenylketonuria (PKU): Origin to Therapeutic Strategy. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **2023**, *89* (4), 802–810. <https://doi.org/10.1007/s43538-023-00203-8>.
- (93) Esteban, J. A. Living with the Enemy: A Physiological Role for the β -Amyloid Peptide. *Trends Neurosci.* **2004**, *27* (1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.10.008>.
- (94) Morley, J. E.; Farr, S. A. The Role of Amyloid-Beta in the Regulation of Memory. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88* (4), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>.
- (95) Brothers, H. M.; Gosztyla, M. L.; Robinson, S. R. The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*.
- (96) Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nat. Med.* **2004**, *10* (S7), S10–S17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- (97) Quarta, C. C.; Kruger, J. L.; Falk, R. H. Cardiac Amyloidosis. *Circulation* **2012**, *126* (12), e178–e182. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069195>.
- (98) Rowe, K.; Pankow, J.; Nehme, F.; Salyers, W. Gastrointestinal Amyloidosis: Review of the Literature. *Cureus* **9** (5), e1228. <https://doi.org/10.7759/cureus.1228>.
- (99) Nguyen, T. X.; Naqvi, A.; Thompson, T. L.; Wilson, R. H. Musculoskeletal Manifestations of Amyloidosis: A Focused Review. *J. Surg. Orthop. Adv.* **2018**, *27* (1), 1–5.
- (100) Garner, A. Amyloidosis of the Cornea. *Br. J. Ophthalmol.* **1969**, *53* (2), 73–81.
- (101) Demer, L. M. Amyloidosis-Associated Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17* (12), 3458. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050460>.
- (102) Ebert, E. C.; Nagar, M. Gastrointestinal Manifestations of Amyloidosis. *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. ACG* **2008**, *103* (3), 776.

- (103) Amyloid Plaques. *Wikipedia*; 2023.
- (104) Beach, T. G. A History of Senile Plaques: From Alzheimer to Amyloid Imaging. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2022**, *81* (6), 387–413.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nlac030>.
- (105) Kirschner, D. A.; Abraham, C.; Selkoe, D. J. X-Ray Diffraction from Intraneuronal Paired Helical Filaments and Extraneuronal Amyloid Fibers in Alzheimer Disease Indicates Cross-Beta Conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83* (2), 503–507.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.503>.
- (106) Cirrito, J. R.; Yamada, K. A.; Finn, M. B.; Sloviter, R. S.; Bales, K. R.; May, P. C.; Schoepp, D. D.; Paul, S. M.; Mennerick, S.; Holtzman, D. M. Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- β Levels In Vivo. *Neuron* **2005**, *48* (6), 913–922.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.028>.
- (107) Hardy, J. Amyloid, the Presenilins and Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* **1997**, *20* (4), 154–159. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)01030-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01030-2).
- (108) Coelfen, H.; Antonietti, M. *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization*; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2008.
- (109) Anand, B. G.; Prajapati, K. P.; Shekhawat, D. S.; Kar, K. Tyrosine-Generated Nanostructures Initiate Amyloid Cross-Seeding in Proteins Leading to a Lethal Aggregation Trap. *Biochemistry* **2018**, *57* (35), 5202–5209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00472>.
- (110) Iadanza, M. G.; Jackson, M. P.; Hewitt, E. W.; Ranson, N. A.; Radford, S. E. A New Era for Understanding Amyloid Structures and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19* (12), 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>.
- (111) Virchow, R. On a Substance Presenting the Chemical Reaction of Cellulose, Found in the Brain and Spinal Cord of Man. *J. Cell Sci.* **1854**, *s1-2* (6), 101–108.
<https://doi.org/10.1242/jcs.s1-2.6.101>.
- (112) Hiramatsu, T.; Yamamoto, N.; Ha, S.; Masuda, Y.; Yasuda, M.; Ishigaki, M.; Yuzu, K.; Ozaki, Y.; Chatani, E. Iodine Staining as a Useful Probe for Distinguishing Insulin Amyloid Polymorphs. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 16741. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73460-y>.
- (113) Buxbaum, J. N.; Linke, R. P. A Molecular History of the Amyloidoses. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421* (2), 142–159. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.024>.
- (114) Khurana, R.; Uversky, V. N.; Nielsen, L.; Fink, A. L. Is Congo Red an Amyloid-Specific Dye? *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (25), 22715–22721.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M011499200>.
- (115) Noormägi, A.; Primar, K.; Tõugu, V.; Palumaa, P. Interference of Low-Molecular Substances with the Thioflavin-T Fluorescence Assay of Amyloid Fibrils. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2012**, *18* (1), 59–64. <https://doi.org/10.1002/psc.1416>.
- (116) Howie, A. J. Origins of a Pervasive, Erroneous Idea: The “Green Birefringence” of Congo Red-Stained Amyloid. *Int. J. Exp. Pathol.* **2019**, *100* (4), 208–221.
<https://doi.org/10.1111/iep.12330>.
- (117) Cooper, J. H. An Evaluation of Current Methods for the Diagnostic Histochemistry of Amyloid. *J. Clin. Pathol.* **1969**, *22* (4), 410–413.
<https://doi.org/10.1136/jcp.22.4.410>.
- (118) Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Kee, T. W.; Carver, J. A. The Thioflavin T Fluorescence Assay for Amyloid Fibril Detection Can Be Biased by the Presence of Exogenous Compounds. *FEBS J.* **2009**, *276* (20), 5960–5972. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x>.

- (119) Yakupova, E. I.; Bobyleva, L. G.; Vikhlyantsev, I. M.; Bobylev, A. G. Congo Red and Amyloids: History and Relationship. *Biosci. Rep.* **2019**, 39 (1), BSR20181415. <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>.
- (120) Movilla, F.; Rey, J. M.; Huck-Iriart, C.; Di Salvo, F. Amine-Derivatized L-Phenylalanine and L-Tyrosine as Versatile Self-Assembled Platforms of Diverse Supramolecular Architectures: From Mesocrystals to Organogels. *Cryst. Growth Des.* **2021**, 21 (6), 3487–3499. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00274>.

"La sabiduría no estaba en la cima de montaña, ni en la escuela de graduados.

Sino en la montaña de arena del jardín"

T.

Capítulo II

Materiales y Métodos

ÍNDICE DEL CAPÍTULO II

Consideraciones generales	58
Reactivos y solventes	58
Metodología de síntesis	58
Técnicas de rayos X	60
Interacción de los rayos X con la materia.....	60
Difracción de rayos X de monocrystal (mDRX)	60
Difracción de rayos X de polvos (pDRX)	62
Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)	63
Cristalización y crecimiento cristalino.....	65
Cristalización por evaporación del solvente.....	66
Cristalización por difusión de vapor de solvente	67
Cristalización por enfriamiento de una solución saturada	67
Cristalización por alteración controlada del pH del medio	68
Espectroscopías	68
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	68
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	69
Espectrometría de masas	69
Espectroscopía por absorción Ultravioleta-visible (UV-Vis)	70
Espectroscopía de emisión molecular	71
Técnicas térmicas.....	72
Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)	72
Microscopías.....	72
Microscopia electrónica de barrido en alto vacío y en condiciones ambientales (SEM).....	72
Microscopia óptica de luz polarizada (MOLP).....	73

Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)	73
Metodología Computacional.....	74
Teoría del funcional de la densidad (DFT)	74
Sobre la metodología de trabajo y la elección de bases y funcionales	77
Análisis de la estructura supramolecular.....	79
Superficies de Hirshfeld, Gráficos dactilográficos (2D–Fingerprint plot) y Estructura de Energías.....	79
Determinación del factor de forma	84
Determinación de la convergencia supramolecular.....	85
Bibliografía.....	87

Consideraciones generales

Reactivos y solventes

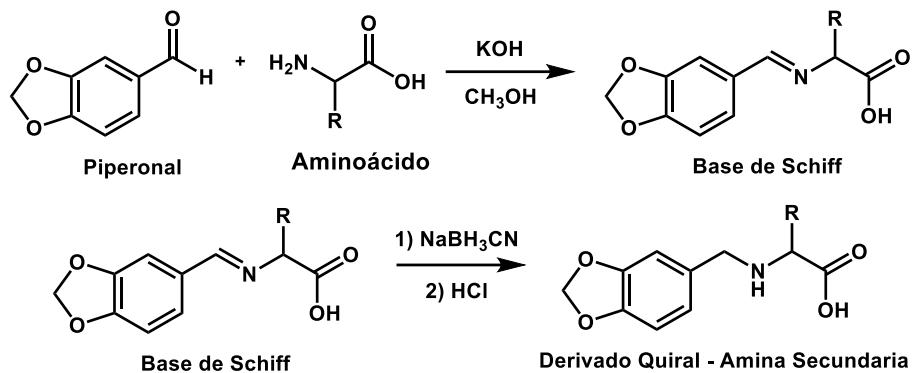
Los reactivos empleados como precursores de las reacciones de síntesis, así como todos los solventes (con y sin deuteración), agentes reductores, sales reguladoras del pH y la fuerza iónica, y colorantes fueron adquiridos de los proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación ni acondicionamiento previo a excepción de la sonda 9-(azetidin-1-il)-5-butil-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5H)-diona (AQui) que fue provista por el grupo del Prof. Dr. Angel Orte de la Universidad de Granada.

Metodología de síntesis

Uno de los objetivos principales de este trabajo se centra en el diseño racional de moléculas quirales con potencial actividad biológica partiendo de L- α -aminoácidos (L- α -AA) y aldehídos aromáticos de interés biológico para su uso en la obtención de nuevos materiales. Gracias a los diferentes grupos funcionales que presentan los L- α -AA estos son plataformas idóneas para desarrollar distintos derivados quirales con estructuras diversas. Entre las alteraciones más frecuentes observadas para los L- α -AA en la bibliografía se encuentran las derivatizaciones realizadas sobre los grupos amino y carboxilo para dar lugar a la formación de amidas, esteres e iminas. Este tipo de reacciones son utilizadas frecuentemente tanto para la obtención de nuevos compuestos con un interés intrínseco, como para la formación de estructuras intermedias en una dada ruta sintética. En muchos casos, estas estructuras derivadas presentan una reactividad parcialmente disminuida frente a ciertas condiciones experimentales específicas, lo cual puede ser utilizado para proteger ciertos grupos funcionales de cambios inesperados, para luego poder ser re obtenido gracias a la reversibilidad de la reacción.¹

Específicamente, las reacciones típicas de formación de iminas o bases de Schiff (-CH=N) son de gran relevancia para este trabajo de tesis. En estas reacciones se produce un ataque nucleofílico de una amina primaria al grupo carbonilo de un aldehído o cetona que actúa como electrófilo. Como intermediario se forma un hemiaminal y posteriormente se obtiene la imina por deshidratación. La reactividad de la imina resultante es extremadamente interesante ya que esta puede ser modulada controlando el tipo de conjugación que pueda establecer el doble enlace carbono – nitrógeno con alguno de los sustituyentes inmediatamente enlazados a este. Al mismo tiempo, debido a la reversibilidad intrínseca a este tipo de reacciones, pueden resultar extremadamente sensibles a la humedad y son capaces de sufrir alteraciones estructurales debido a la isomerización imina – enamina.² Sin embargo, es esta misma capacidad de reversibilidad la que las ha puesto en el foco de las nuevas metodologías de síntesis orgánicas gracias a su capacidad de “verificar y corregir” errores de conectividad en moléculas complejas y sistemas extendidos, y favorecer la obtención de especies termodinámicamente estables frente a otros productos competitivos cinéticamente favorecidos.³

Debido a que esta reactividad tan particular puede ser contraproducente para la obtención de moléculas estables frente a las condiciones experimentales que se proponen estudiar en esta Tesis Doctoral (condiciones aeróbicas en medio acuoso y bajo diversas condiciones de acidez), se decidió anexar a la reacción de formación de iminas una reducción selectiva que permitiera obtener una amina secundaria como producto final de reacción (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis empleada para la obtención de los compuestos estudiados durante este trabajo

Esto no solamente permite “congelar” la estructura obtenida en un compuesto que ya no sufre alteraciones frente a la humedad o las potenciales isomerizaciones si no que, además, presenta un parentesco estructural mucho mayor con al aminoácido empleado como precursor al carecer del doble enlace carbono-nitrógeno.⁴ Esto resulta particularmente interesante a la hora de pensar los efectos estudiados sobre sistemas vivos, como alteraciones a la actividad biológica intrínseca a los precursores empleados para cada compuesto. Esta similitud estructural facilita el análisis de la relación entre la estructura química y las propiedades físicas y químicas de estos compuestos,⁵ y permite pensar las ideas extraídas de este trabajo como un estudio potencial de como se ve alterada la actividad biológica de algunos aminoácidos esenciales que están asociados a determinados procesos metabólicos luego de sufrir alteraciones estructurales específicas.⁶

Para las síntesis llevadas a cabo durante este trabajo de tesis se emplearon los aminoácidos y aldehídos presentados durante la introducción. Debido a la gran diversidad de estructuras sintetizadas fue necesario estudiar exhaustivamente las condiciones de síntesis para cada una de ellas, con el fin de optimizar y poner a punto la reacción para cada conjunto de precursores utilizados. La solubilidad, la reactividad, el número de puntos de unión y la estabilidad tanto de la base de Schiff intermedia como del producto final fueron todos parámetros a tener en cuenta a la hora de diseñar las síntesis. En cada capítulo se discutirán en detalle las consideraciones experimentales específicas asociadas a cada familia de compuestos.

Técnicas de rayos X

Interacción de los rayos X con la materia

Cuando un haz de rayos X incide sobre un material sólido, una parte de este haz se ve dispersado isotrópicamente en todas las direcciones debido a una interacción elástica con los electrones asociados a los átomos o iones que componen el sistema. La intensidad de esta dispersión dependerá de la forma, el tamaño la textura y el material sobre el cual impactó el haz incidente. Este efecto es conocido como Dispersión de rayos X y es la base en la que se sostienen los experimentos de dispersión de rayos X a bajo ángulo.⁷

Por otro lado, desde la interpretación propuesta por Lawrence y William Henry Bragg del evento de difracción, el resto del haz, que interactúa con la materia de manera coherente antes de ser dispersado, puede dar lugar a difracción de rayos X. Pero, para que pueda generarse el evento de difracción y este de lugar a un patrón de intensidades, tiene que existir una disposición ordenada de sitios desde donde el haz interactuante pueda ser difractado. La familia Bragg propuso una interpretación de este fenómeno en términos de reflexiones de haces, que permite obtener una ecuación que relaciona la longitud de onda de los rayos X (λ) y la distancia que separa los planos de difracción (d) con el ángulo de incidencia del haz difractado (θ) (Ecuación 1).⁸

Ecuación 1. Ecuación de la Ley de Bragg

$$n\lambda = 2dsen(\theta)$$

Esta ecuación es conocida como Ley de Bragg e impone restricciones a los valores de distancia entre planos de difracción para que estos puedan dar lugar a la obtención de interferencia constructiva entre los haces de luz difractados. Si no se cumple la ley de Bragg, la interferencia es de naturaleza no constructiva y el haz difractado resultante presentará una intensidad muy baja.

El resto de los fenómenos que devienen de la interacción de los rayos X con la materia, como son la reflexión, la refracción y la absorción, no serán presentados en detalle en esta sección en tanto no son de relevancia para las técnicas empleadas durante este trabajo de Tesis Doctoral.

Difracción de rayos X de monocristal (mDRX)

Max von Laue comprendió que el estudio de cristales empleando rayos X sería posible gracias a que su longitud de onda se encuentra en el orden 10^{-10} m, y que los centros difractantes (en este caso los electrones de los átomos en un cristal) deberían tener una periodicidad en este mismo orden de magnitud.⁹ Esto sentó las bases de la cristalográfia moderna al permitir demostrar dos conceptos fundamentales al mismo tiempo. Primero, la naturaleza ondulatoria de los rayos X, que resulta indispensable para generar fenómenos de difracción que den lugar a patrones de interferencia constructiva y segundo, la naturaleza periódica de los componentes de un cristal, lo cual les permitía actuar como rendijas de difracción frente a la radiación electromagnética. Actualmente, la difracción de rayos X es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de estructuras de

diversos compuestos debido a que es una de las pocas técnicas de laboratorio que permite alcanzar la resolución atómica.

Poder contar con una técnica que permita “observar” las estructuras moleculares de los compuestos sintetizados resulta particularmente interesante en este trabajo de Tesis Doctoral, no solo por la capacidad de caracterización que brinda a nivel general, si no por la gran cantidad de información supramolecular que puede extraerse al estudiar como un compuesto interacciona con su entorno para dar lugar a un empaquetamiento denso y ordenado.

Otra de las principales ventajas de esta técnica reside en la posibilidad de distinguir inequívocamente entre enantiómeros de una molécula quiral. La quiralidad es una característica esencial en muchos sistemas biológicos y puede cumplir un rol trascendental en una gran cantidad de propiedades de las moléculas pequeñas, como su actividad biológica o la capacidad de autoensamblarse. Teniendo en cuenta que todas las moléculas estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral son sintetizadas a partir de moléculas de interés biológico y donde una de sus partes es intrínsecamente quiral (la parte aminoacídica) resulta esencial determinar la quiralidad final de la molécula obtenida, así como corroborar que no haya sufrido cambios durante el proceso de síntesis. Los archivos .cif fueron generados con empleando el programa Olex2 y la verificación se llevó a cabo utilizando el sistema de verificación online de la unión internacional de cristalográfia ([CheckCIF \(iucr.org\)](http://CheckCIF.iucr.org)). En los casos en que fue necesario, un análisis exhaustivo de la simetría estructural en términos de topología y la correspondiente verificación de ausencia de pseudo-simetría se llevó a cabo utilizando el software ToposPRO¹⁰ y la base cristalográfica de Bilbao,¹¹ respectivamente. Los archivos .cif de las estructuras incluidas en esta tesis se encuentran depositados en la base de datos cristalográfica de Cambridge ([Advancing Structural Science | CCDC \(cam.ac.uk\)](http://Advancing Structural Science | CCDC (cam.ac.uk)))¹² y en el apartado experimental de cada capítulo se incluyen los códigos de cada una de ellas.

Los experimentos de difracción de rayos X de monocrystal presentados en esta Tesis Doctoral se realizaron en tres equipos distintos.

Las líneas MX2-LNLS y MANACÁ-Sirius del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil) usando longitud de onda $\lambda = 0,80$ o $0,67 \text{ \AA}$, según el experimento. En ambos casos los datos fueron colectados usando un detector de área PILATUS2M (Dectris). Debido a que ambas líneas de difracción están diseñadas especialmente para macromoléculas, fue necesario colectar datos de múltiples ángulo Kappa para evitar la carencia de completitud a grandes ángulos.¹³ Para esto se empleó una cabeza goniométrica mini-kappa.¹³ Las medidas fueron realizadas a 100 K y la reducción de datos fue hecha con el software XDS,¹⁴ empleando el protocolo de trabajo MANACAutoproc.¹⁵ Los datos fueron corregidos por los efectos de absorción utilizando un método empírico implementado en el software XDS.¹⁶

El difractómetro Oxford Diffraction Gemini E con radiación Mo K α ($\lambda = 0,71 \text{ \AA}$) y Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) con un monocromador de grafito, disponible en el INQUIMAE (FCEN-UBA). Las estrategias de medida fueron planificadas con la herramienta de CrysAlis Pro.¹⁷ Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente y el procesamiento de datos fue hecha utilizando el programa CrysAlis Pro.

Para los tres *set-up* experimentales, todas las estructuras fueron resueltas y refinadas empleando diferentes estrategias del programa Olex2.¹⁸

Difracción de rayos X de polvos (pDRX)

Una muestra policristalina está constituida por una población de pequeños monocristales. Idealmente, se consideran orientados al azar, aunque la morfología y distribución de tamaños de las muestras pueden dar lugar a orientaciones preferenciales. A diferencia del material monocrystalino, que impone la necesidad de tener todo el material de la muestra distribuido en grandes regiones muy ordenadas, el material policristalino permite tener un gran número de pequeñas regiones ordenadas internamente pero que no necesariamente se encuentran ordenadas entre sí. Esto facilita mucho su obtención, pero al mismo tiempo, restringe la cantidad de información que se puede extraer de la misma si es sometida a un experimento de difracción de rayos X.

Una muestra policristalina cuyos componentes se encuentran aleatoriamente distribuidos se comporta de forma equivalente a una muestra monocrystalina que es irradiada múltiples veces en ángulos aleatorios. Esto da lugar a una superposición de patrones de difracción que ahora ya no se detectan como puntos en un plano si no como anillos concéntricos alrededor del haz incidente. En esto consiste el experimento de difracción de rayos X de polvos.

El patrón de difracción obtenido por esta metodología se basa en una secuencia de picos de distinta intensidad a medida que se recorre el valor del ángulo incidente y el ángulo de detección. Cada pico corresponde a una porción de un anillo generado por la superposición de múltiples destellos de difracción. Las posiciones de estos picos proveen la información de las dimensiones de la celda unidad de la estructura cristalina mientras que sus intensidades brindan información relacionada con la densidad electrónica en el interior de la celda. Al mismo tiempo, el ancho y el perfil de las señales proporcionan información acerca de la dimensión promedio de los dominios cristalinos.

La difracción de rayos X de polvos es una metodología que permite abordar de manera simple y rápida la identificación de fases cristalinas, lo cual la vuelve una técnica esencial para estudiar fenómenos de polimorfismo y transiciones de fase. Adicionalmente, el estudio teórico de los difractogramas de rayos X empleando el método de Rietveld permite la determinación de la estructura del compuesto analizado de manera equivalente a lo que se puede obtener por un experimento de difracción de rayos X de monocrystal.

Para este trabajo de Tesis Doctoral las medidas de pDRX fueron realizadas en un difractómetro PANalytical Empyrean equipado con un tubo de rayos X con radiación Cu K α de 4-kW (K-Alpha1=1,541 Å, K-Alpha2=1,544 Å, generador de potencia regulada: 60 kV y 100 mA), filtro beta de níquel y un detector de área PIXcel3D que emplea una geometría de haz paralelo (rendijas adaptadas según cada determinación, mascara incidente 15mm). Las muestras fueron medidas sobre un portamuestra de silicio monocrystalino. Para todos los experimentos de pDRX los datos fueron medidos en un intervalo 2θ de 4° a 90° o 4° a 50°, según corresponda, con barrido continuo, velocidad de

barrido de 200 s por paso y con $0,026^\circ$ por paso. Equipo disponible en el Laboratorio de Servicios del INQUIMAE, FCEN-UBA.

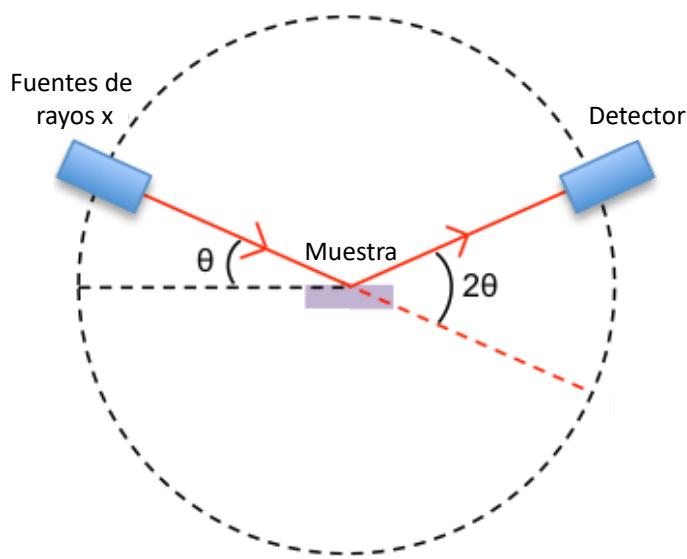


Figura 1. Esquema del experimento de difracción de rayos X para muestras policristalinas.

Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

La dispersión de rayos X es uno de los fenómenos que suceden cuando un haz de rayos X interactúa con un material. Este fenómeno, a diferencia de la difracción, no requiere de tener agentes dispersantes espacialmente ordenados para generar interferencia constructiva. Igualmente, es posible pensarla como una extensión de los fenómenos de difracción bajo la interpretación de la Ley de Bragg, pero para el cual la distancia interplanar se vuelve tan grande que pasa a encontrarse en una escala comparable a la de una partícula nanoscópica. Ya no se tienen átomos actuando como rendijas de redes de difracción equiespaciados a distancias interatómicas si no partículas nanoscópicas dispersando el haz de luz en todas direcciones.

El problema de querer estudiar la dispersión generada por iluminar partículas que presentan tamaños mucho mayores a los atómicos-moleculares es que se necesita incrementar la longitud de onda para hacerla coincidir con el tamaño que deseamos estudiar o estudiar valores de ángulo de dispersión muy cercanos al haz incidente (Ecuación 1).

Alterar la longitud de onda del haz incidente puede resultar costoso tecnológicamente y, además, inadecuado para un gran número de muestras con elementos que pueden presentar fenómenos de absorción a estas energías. Por el contrario, detectar ángulos cercanos al haz incidente puede realizarse con cierto grado de facilidad alterando la distancia que separa la muestra del detector en un experimento convencional de difracción de rayos X a ángulos mayores (WAXS) (Figura 2).

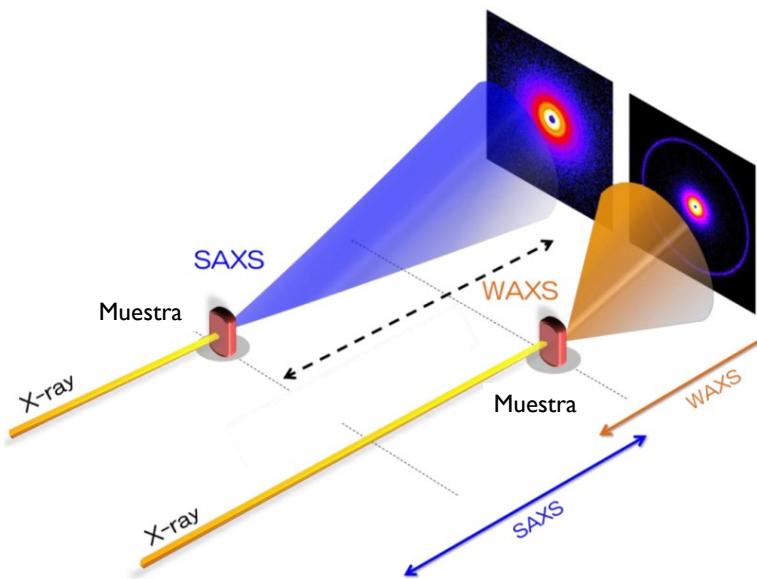


Figura 2. Diferencia entre los experimentos de dispersión (SAXS) y difracción (WAXS) de rayos X.

Los patrones de dispersión obtenidos de estos experimentos pueden dividirse en tres regiones, las cuales brindan información sobre la forma (Región de Guinier), el tamaño (Región de Debye/Fourier) y la textura (Región de Porod) del material estudiado (Figura 3).¹⁹ Al mismo tiempo, los resultados obtenidos pueden modelarse empleando softwares que calculan el patrón de dispersión teórico para ciertas figuras geométricas y luego alteran los valores característicos del modelo hasta obtener un patrón semejante al obtenido experimentalmente.

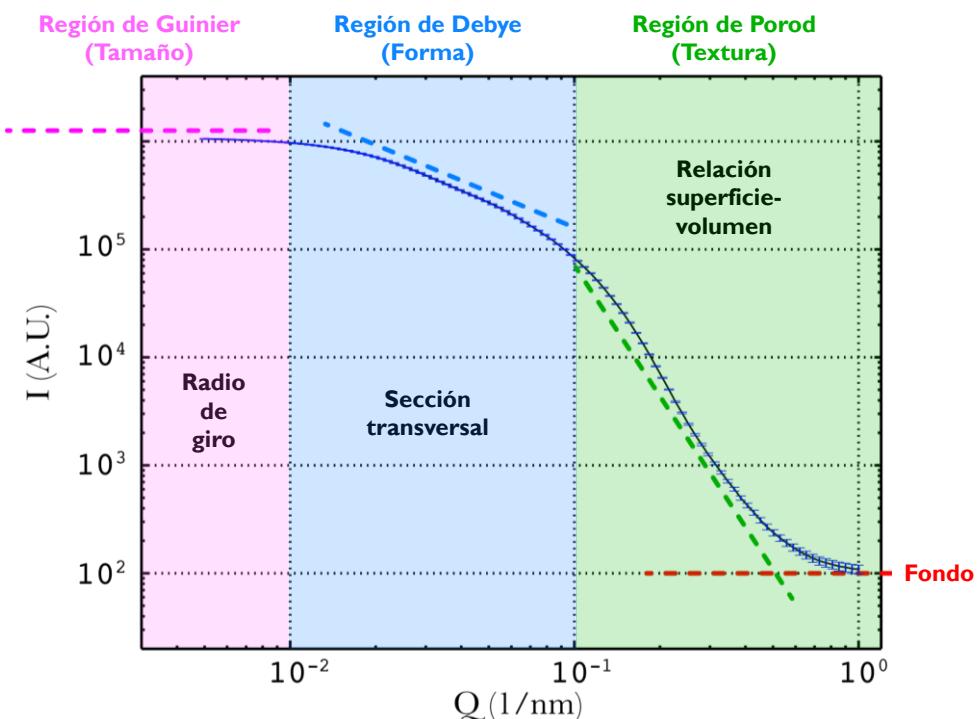


Figura 3. Esquema de un patrón de dispersión genérico con sus distintas regiones y dependencias.

Los experimentos de SAXS para este trabajo de Tesis Doctoral fueron realizados en dos líneas de luz sincrotrón distintas:

Por un lado, la línea DO2A-SAXS1 en del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil). La intensidad de la dispersión en función del vector de transferencia de momento dispersivo (q , con $q=4\pi/\lambda \sin(\theta)$) se midió desde 0.04 a 1.1 nm^{-1} , empleando una longitud de onda de $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$. Los patrones fueron adquiridos con un tiempo de exposición de 59 segundos empleando un tiempo muerto de 1 segundo entre patrones por un total de 1 hora. Se utilizó un detector Pilatus 300K con una distancia de 3m entre detector y muestra. La integración de los patrones obtenidos se realizó empleando el programa FIT-2D.²⁰ Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en una celda termostatizada para líquidos y las muestras fueron inyectadas en caliente luego de ser disueltas. Todas las muestras fueron tratadas de forma tal de que el gel se forme en el interior de la celda de líquidos. Los patrones de SAXS fueron modelados empleando un programa diseñado en el grupo empleando lenguaje Python 3.7, utilizando geometrías lamelares o esféricas según corresponda.

Por otro, la línea NCD-SWEET del Sincrotrón ALBA, en Barcelona, España, para los experimentos realizados sobre suspensiones y geles en dimetilsulfóxido (DMSO). Debido a la alta absorción de los átomos de azufre en este solvente, se empleó una energía incidente de 15keV (0,8 nm de longitud de onda aproximadamente) y una distancia de la muestra al detector de 6,6 metros. La adquisición de los datos fue mediante un detector Pilatus 1M (Dectris, Suiza). Gracias a que los experimentos de dispersión fueron isotrópicos, se pudo realizar una reducción de la dimensionalidad de los patrones a través de una integración en el ángulo azimutal empleando la librería pyFAI, la cual se encuentra disponible en python 3.²¹ Para cada muestra fueron colectadas 20 imágenes de 1 segundo de exposición cada una, con el fin de analizar un posible daño por radiación sufrido por la muestra.²²

Cristalización y crecimiento cristalino

El diseño racional de compuestos con una química supramolecular bien establecida requiere, indefectiblemente, de la capacidad de poder visualizar sus grupos funcionales “en acción”, para poder comprender cómo estos se comportan frente a solventes u otras moléculas de interés. Debido a este desafío, las técnicas de difracción de rayos son herramientas indispensables para estudiar el funcionamiento de los diversos grupos funcionales presentes en las estructuras y su rol en la interacción entre estas y su entorno. Una de las limitaciones que presenta esta técnica consiste en contar con materiales cuya cristalinidad sea suficiente como para ser considerados aptos para los experimentos de difracción. La obtención de este tipo de muestras llevó a que se tengan que desarrollar y poner a puntos experimentos específicos de cristalización para cada molécula sintetizada.

Para el diseño de los experimentos de cristalización fue necesario tener en cuenta las características estructurales de los sistemas estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral. La presencia de los grupos amino y ácido carboxílico en todos los compuestos sintetizados genera que los sistemas resultantes sean muy sensibles a las alteraciones de pH del entorno (Esquema 1). Esta dependencia fue utilizada como una herramienta a favor de la obtención de diversas fases sólidas explotando esta respuesta a estímulos externos

para tener un control preciso de la solubilidad frente a distintas condiciones experimentales. Por ejemplo, gracias a la capacidad que tienen todos estos compuestos de tener un estado catiónico y un estado aniónico accesible experimentalmente, se pudo explorar la obtención de diversas sales empleando contraiones especialmente diseñados para la obtención de material monocristalino.²³ Es interesante notar que estos contraiones no solamente brindan cristalinidad si no que pueden introducir propiedades potencialmente interesantes que pueden impactar directamente en las propiedades ópticas, mecánicas o termodinámicas del material resultante.^{24,25}

A su vez, el carácter anfótero de la estructura aminoacídica confiere la posibilidad de acceder a un estado switeriónico que se caracteriza por tener cargas netas opuestas que brindan a la estructura una carga global nula. En estas condiciones de electroneutralidad los compuestos presentan una marcada disminución de su solubilidad en solventes polares y muchas de sus propiedades se asemejan a las observadas para compuestos sin carga.²⁶ Es debido a la diversidad de estados cargados de cada compuesto que se han tenido que explorar múltiples metodologías de cristalización y poner a punto cada una de ellas de acuerdo con las diferentes solubilidades, polaridades y, en última instancia, propiedades de ensamblado de cada estructura.

Cristalización por evaporación del solvente

Esta metodología se fundamenta en la pérdida lenta del solvente gracias a la diferencia entre la presión de vapor de este y la presión atmosférica; o por difusión entre una superficie líquida y su entorno. Es una técnica recomendada para moléculas estables frente a las condiciones atmosféricas (presencia de oxígeno y agua y temperaturas moderadas) que sean solubles en solventes volátiles. Para tener un mayor control en la velocidad a la que se produce el secado y poder regular la velocidad con la que se satura la solución, se puede obturar la salida del recipiente que se haya empleado para realizar la cristalización y regular la superficie en contacto con el ambiente empleando septums o Parafilm con orificios. Para el caso de los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral esta técnica fue utilizada principalmente para la obtención de las sales provenientes de una solución acuosa.

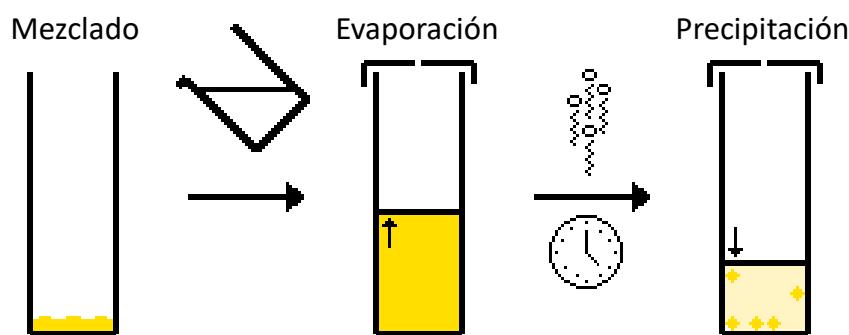


Figura 4. Esquema del proceso de cristalización por evaporación lenta del solvente. Adaptada de la referencia.²⁷

Cristalización por difusión de vapor de solvente

Esta metodología de cristalización se fundamenta en la diferencia de presiones parciales entre el solvente empleado para disolver el material que se pretende cristalizar y un cosolvente de mayor volatilidad. La esencia de esta metodología reside en que la molécula de interés sea soluble en un solvente de baja presión de vapor e insoluble en uno de alta presión de vapor y que, a su vez, estos solventes sean miscibles entre sí. Si se deja una solución del soluto de interés en el solvente menos volátil en un recipiente cerrado y saturado de vapor del solvente más volátil, este difundirá hacia la solución y, a medida que se mezcla con el solvente de esta, generará una disminución parcial de la solubilidad del soluto hasta iniciar su precipitación. Como este proceso está mediado tanto por la difusión del vapor como por la disolución de este en una solución que no está siendo agitada, da como resultado una extracción lenta y gradual del solvente, lo cual es óptimo para la obtención de material cristalino de calidad. A su vez, existe la posibilidad de aprovechar las propiedades ácido-base de las moléculas sintetizadas y realizar una difusión de vapores ácidos o básicos empleando ácido clorhídrico, ácido acético, amoníaco o aminas de bajo peso molecular sobre soluciones básicas o ácidas, con el fin de generar una neutralización suave hasta alcanzar el punto isoeléctrico.

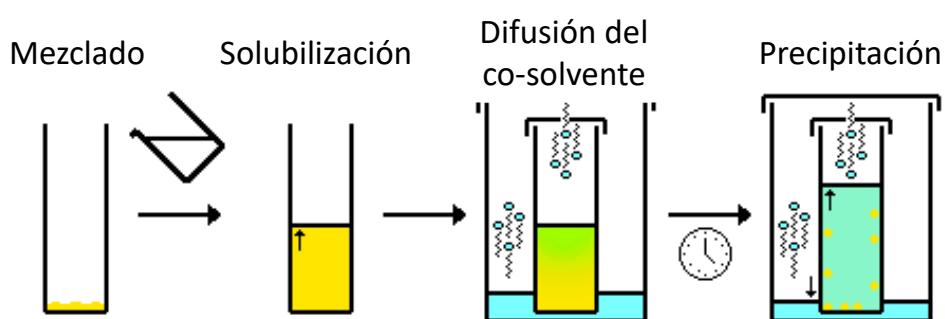


Figura 5. Esquema del proceso de cristalización por difusión lenta de un co-solvente. Figura adaptada de la referencia ²⁷.

Cristalización por enfriamiento de una solución saturada

Esta metodología de cristalización consiste en disminuir la temperatura de una solución con el fin de alcanzar el punto de saturación de su solubilidad sin remover solvente o agregar soluto. Es una técnica muy empleada para obtener material cristalino de sustancias que presenten grandes diferencias de solubilidad frente a los cambios de temperatura. Entre sus principales beneficios se encuentra el hecho de que existen múltiples metodologías para lograr un control preciso de la velocidad con que la temperatura se altera, permitiendo favorecer el crecimiento por sobre la nucleación o bien la obtención de una fase metaestable por enfriamiento brusco. Al mismo tiempo, debido a que no requiere de la utilización de cosolventes y no depende de la presión de vapor del solvente principal, es una técnica recomendada para sustancias con solubilidades limitadas a solventes de muy baja presión de vapor como dimetilsulfóxido (DMSO) o N,N-dimetilformamida (DMF).

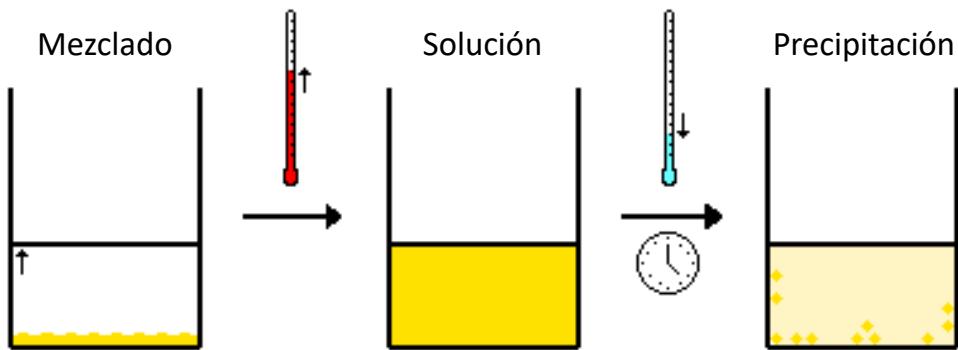


Figura 6. Esquema de cristalización por enfriamiento de una solución saturada. Figura adaptada de la referencia ²⁷.

Cristalización por alteración controlada del pH del medio

Esta metodología consiste en la utilización de sustancias que liberen protones o hidroxilos a la solución de manera controlada, con el fin de alcanzar el punto isoeléctrico de manera gradual y homogénea en todo el sistema. La sustancia a agregar debe presentar una elevada solubilidad en el solvente empleado y se debe conocer con rigurosidad el proceso a través del cual altera la acidez del medio para poder controlar la cantidad de iones liberados y no permitir que se alcancen valores de pH extremos. Para los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se empleó (D)-Glucono-1, 5-lactona como agente liberador de protones por hidrólisis.

Espectroscopías

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Así como un cristal se puede pensar como un material que se estabiliza a partir de maximizar el factor entálpico asociado a la formación de interacciones entre sus componentes a costa de reducir al mínimo la entropía del sistema, el comportamiento en solución está extremadamente asociado a efectos de mayor carácter entrópico, como el efecto hidrofóbico en solución acuosa o la capacidad de adaptarse a la distribución de tamaños en los huecos generados en los solventes.²⁸ En solución se da la posibilidad de acceder a múltiples estructuras conformacionales que no se encuentran presentes en la estructura cristalina del compuesto estudiado, y para las cuales no podemos extraer información directa del análisis del monocristal. Es por este motivo que las técnicas de caracterización en solución cumplen un rol esencial a la hora de estudiar las propiedades supramoleculares y de autoensamblado, al complementarse de excelente manera con las técnicas asociadas al estudio de materiales en estado sólido, como son la difracción y dispersión de rayos X.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una técnica muy versátil que permite detectar como decae la señal magnética emitida por un núcleo luego de ser sometido a un pulso electromagnético que altera el estado de polarización de los núcleos magnéticamente activos presentes en la estructura.²⁹ Debido a que el estado de

polarización magnética de un núcleo, así como su sensibilidad al pulso, están íntimamente ligados a los campos electromagnéticos que los rodean, esta técnica permite extraer información sobre las inmediaciones de cada núcleo magnéticamente activo en el sistema. Esto le brinda un nivel de resolución estructural en el orden atómico que comparable con el obtenido para la Difracción por rayos X. Esta excelente resolución, junto con la facilidad de estudiar muestras en solución y la capacidad de diseñar experimentos dinámicos (resueltos en el tiempo o a temperatura variable) la vuelven una técnica esencial para complementar la información obtenida por los experimentos de difracción.

Para el estudio del comportamiento en solución de los diferentes sistemas estudiados en esta tesis se llevaron a cabo experimentos monodimensionales de ^1H , ^{13}C y bidimensionales, tanto homo como heteronucleares, (COSY y NOESY) en diversos solventes. Para el estudio del mecanismo de ensamblado durante el proceso de gelificación se realizaron medidas resueltas en el tiempo cada 5 minutos y a temperatura variable, cada 5°C desde 25°C a 45°C. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AM-500 MHz, disponible en UMYMFOR, FCEN-UBA. Las muestras fueron estudiadas en dimetilsulfoxido-d6 (DMSO-d₆), oxido de deuterio-d₂ (D₂O) y deuteróxido-d₁ de sodio (NaOD). Los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) son reportados referidos a la señal del solvente empleado. Las constantes de acoplamiento (J) se presentan en Hz. La multiplicidad de las señales de ^1H RMN se indican mediante las abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; m, multiplete. La obtención de los espectros, su corrección y el tratamiento de los datos fue realizado con el software MNova 14.3.2 de MestreLab.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de los reactivos y productos sólidos se realizaron empleando un espectrofotómetro Nicolet Avatar 320 FTIR con porta celda Spectra Tech. Todas las muestras fueron preparadas en pastilla de bromuro de potasio (KBr) seco y el rango espectral de medida fue de 4000cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. El procesamiento de datos fue realizado con el software OMNIC versión 7.3 de Thermo Electron Corporation. Equipos disponibles en el Laboratorio de Servicios del INQUIMAE, FCEN-UBA.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas fueron medidos para determinar las fórmulas moleculares de los compuestos sintetizados. Todas las soluciones de las muestras provistas se prepararon utilizando insumos de calidad HPLC. Las muestras se analizaron por inyección directa en un espectrómetro de masas de alta resolución con fuente de ionización por electrospray y analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo modelo Xevo G2S Q-TOF (Waters Corp.). Se optimizaron los parámetros de la fuente de ionización, para maximizar la relación señal/ruido. La fuente fue operada en modo de electrospray positivo y negativo. El espectrómetro de masas fue calibrado en el intervalo de m/z 50–1200 utilizando una solución de formiato de sodio 0,5 mM preparada en 90:10 2-propanol:agua v/v. Los datos se corrigen durante la adquisición utilizando un compuesto de referencia (LockSpray). El procesamiento de datos se efectuó utilizando el software MassLynx v4.1 (Waters Corp.). La mayoría de las muestras se disolvieron y diluyeron en metanol. El equipo está disponible en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION), CONICET.

Espectroscopía por absorción Ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopía por absorción de luz en el espectro ultravioleta y visible es una técnica ampliamente utilizada actualmente para obtener información sobre transiciones electrónicas del tipo HOMO-LUMO en el rango de 3,54eV a 1,55eV. En muchos casos, considerando la longitud de onda asociada a la transición, se puede realizar una asignación potencial de los fragmentos estructurales implicados en la. Es así como se pueden discriminar, por ejemplo, las transiciones metal-ligando, ligando-metal o intraligando en varios compuestos de coordinación. Al conjunto de átomos en una molécula responsable de absorber luz en una región específica del espectro electromagnético se lo denomina grupo cromóforo.³⁰

Además de lo mencionado, existe mucha más información que puede extraerse de este tipo de experimentos si se realizan en condiciones dinámicas (a temperatura variable o resueltos en el tiempo). En muchos casos, a medida que un sistema se altera, pueden llegar a modificarse las propiedades que le permiten a este interaccionar con la luz. Esto se debe a que la interacción de la luz con los sistemas a través de un fenómeno de absorción depende de la sección transversal de absorción de sus cromóforos.³¹ Para que el evento de absorción de un fotón se produzca el haz incidente tiene que lograr irradiar los grupos cromóforos. Cualquier alteración en las inmediaciones de estos grupos que impida que la luz llegue a ellos impactará directamente en los espectros obtenidos y se verá reflejada como una disminución en la absorción a la longitud de onda característica de la transición asociada a ese grupo. Este fenómeno se lo conoce como hipocromicidad y se manifiesta como una disminución en la absorción de luz a una longitud de onda dada. Al contrario, si una molécula presenta inicialmente grupos cromóforos que no están totalmente expuestos al haz incidente y luego de una alteración conformacional estos pasan a ser irradiados, se verá un aumento en la cantidad de luz absorbida a la longitud de onda asociada a la transición característica de ese cromóforo. Este fenómeno se denomina hipercromicidad.³²

En muchos sistemas se puede encontrar una relación entre la capacidad de absorción de luz a una longitud de onda específica y un dado cambio conformacional. Esta propiedad se encuentra ampliamente estudiada para polímeros, tanto biológicos (ADN) como sintéticos, y es utilizada para obtener temperaturas de fusión de hebras de ADN.³³

El análisis de los eventos de hipo/hipercromicidad en la región del ultravioleta cercano es una herramienta fundamental para el estudio de los procesos de ensamblado mediados por interacciones de apilamiento aromático. Considerando que todos los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral presentan, al menos, dos anillos aromáticos capaces de producir interacciones intra e intermoleculares de apilamiento aromático, resulta extremadamente interesante poder contar con una herramienta que detecta en tiempo real y bajo condiciones dinámicas la formación de este tipo de interacciones. Este tipo de herramientas que permiten obtener información en tiempo real sobre las alteraciones conformacionales y las interacciones intermoleculares que intervienen en los fenómenos de ensamblado resultan esenciales para comprender los mecanismos implicados.

Los espectros UV-vis fueron medidos empleando un espectrómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W).

Espectroscopía de emisión molecular

En líneas generales, luego de que una sustancia haya sufrido un fenómeno de absorción de radiación electromagnética, se observa un proceso de decaimiento asociado a la re-obtención del estado energético fundamental.³⁴ Estos procesos suelen estar mediados por la interacción entre una molécula y su entorno debido a que es este el encargado de recibir y disipar, en forma de calor, este exceso de energía absorbido. Esta transformación de la energía electromagnética en calor está mediada principalmente por disipaciones de carácter mecánico. Entre las principales vías de este tipo de decaimientos se encuentran la adquisición de estados conformacionales de mayor energía a través de la activación de rotaciones parcialmente impedidas y el aumento en el número de colisiones con el entorno. También podemos encontrar otras vías de decaimiento asociadas a la transferencia de energía hacia otra fuente aceptora que se encuentra en las cercanías de la molécula irradiada y cuya orientación e interacción son las adecuadas para facilitar este fenómeno sin la mediación de un fotón. Estos fenómenos en los que no se re-emite una partícula de luz si no que la energía es entregada a las inmediaciones de la molécula a través de vías no luminosas se las como decaimientos no radiativos.

Por otro lado, si la molécula irradiada presenta un grado de rigidez que le impide acceder a estados conformacionales de mayor energía y no cuenta con moléculas alrededor que sean capaces de disipar energía eficazmente en forma de colisiones o a través de transferencias de energía, el sistema se verá en la obligación de re-emitar la energía absorbida inicialmente en forma de luz.^{35,36} En este caso la luz emitida será de una energía menor (una longitud de onda mayor) que la absorbida debido a las disipaciones vibracionales que se pudieran haber generado en el proceso. Este fenómeno se conoce como fotoluminiscencia.

Considerando el tiempo que demora el sistema en emitir un fotón luego de interrumpir la irradiación, podemos distinguir dos tipos de radiación distinta. Una que se produce rápidamente luego de haber absorbido el fotón, que se conoce como fluorescencia, y una que se produce con una diferencia temporal mayor, denominada fosforescencia. Aunque los fenómenos asociados al proceso de decaimiento son similares en ambos casos, los orbitales involucrados en cada transición y la probabilidad de transición entre ellos son los responsables de las diferencias observadas en las velocidades de decaimiento.

En el marco de la química supramolecular, contar con una herramienta sensible al entorno y, principalmente, a la polaridad del solvente y la rigidez estructural resulta una herramienta muy potente para inferir información sobre la química conformacional de una molécula en solución. Poder seguir en tiempo real como se altera el espectro de emisión y estudiar la eficiencia con que se produce el fenómeno de emisión nos brinda información sobre los cambios que sufre un sistema al alterar externamente condiciones como la temperatura o el tiempo.³⁷

Los experimentos de emisión de fluorescencia se realizaron empleando un lector placas ClarioSTAR con placas multiwells de 96 pocillos de fondo opaco irradiando por epi-iluminación sobre 500 μ L de solución. En todos los casos se empleó como blanco el solvente o la matriz empleada para la disolución. Los experimentos se realizaron con 20 flashes y una distancia focal fija de 8mm. La ganancia se optimizó para cada set de experimentos sobre el pocillo de mayor intensidad de emisión. La longitud de onda de excitación fue de 375nm y los espectros se colectaron de 403nm a 840nm.

Técnicas térmicas

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)

Las técnicas de caracterización de la respuesta térmica de un sistema son esenciales para estudiar tanto las distintas regiones de estabilidad como el contenido de distintos componentes volátiles en las muestras. En particular, considerando que los procesos de transición de fases están directamente relacionados con la formación o ruptura de interacciones intermoleculares, resultan especialmente interesantes para cuantificar el grado de interacción y, en última instancia, el rol de la química supramolecular de una especie en la estabilización de una fase dada.

Los estudios de calorimetría de barrido diferencial (DSC) fueron realizados en un Shimatzu DSC-50 con cápsulas de aluminio y bajo atmósfera de N₂. Los análisis termogravimétricos (TGA) se midieron en un equipo Shimatzu TGA-50 con cápsulas de aluminio. Equipo disponible en el Laboratorio de Servicios del INQUIMAE, FCEN-UBA

Microscopías

Microscopia electrónica de barrido en alto vacío y en condiciones ambientales (SEM)

La obtención de imágenes de alta resolución por dispersión de un haz de electrones se realizó utilizando un microscopio Carl Zeiss NTS – SUPRA 40 en alto vacío, disponible en el centro de Microscopía Avanzada, DF, FCEN – UBA. La obtención de imágenes de alta resolución en condiciones ambientales se realizó empleando un microscopio Quanta 250 *Field Emission Gun* operando a 15kV disponible en el Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, UnSam. Las muestras estudiadas a alto vacío fueron purificadas y secadas previamente y se las sembró sobre sobre cinta de carbón soportada en pines de aluminio aptos para SEM. Las muestras estudiadas en condiciones ambientales fueron sembradas sobre cintas de carbón sin acondicionamiento previo. Esta técnica fue utilizada principalmente para caracterizar la morfología y el aspecto geométrico de los materiales sólidos obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral. Se empleó, en particular, sobre aquellas muestras que presentaron tamaños de partículas menores a los 500 μ m, tanto sean cristalinas, amorfas o filamentos obtenidos a partir del secado de geles (xerogeles).

Microscopía óptica de luz polarizada (MOLP)

Con el fin de estudiar la naturaleza cristalina de las muestras sólidas obtenidas se ensayó su birrefringencia intrínseca empleando un microscopio estereoscópico triocular Nikon SMZ-745T con polarizadores cruzados. Este ensayo fue empleado para discriminar y seleccionar los cristales que luego fueron empleados para difracción de rayos X de monocrystal, así como para observar alteraciones en la cristalinidad durante los ensayos de estrés de algunos de los materiales obtenidos.

Para cristales de menor tamaño, la selección de cristales adecuados para los experimentos de difracción de rayos X de monocrystal se realizó empleando un microscopio Leica DM2500P con polarizadores cruzados y una lente de Bertrand. Ambos equipos están disponibles en el INQUIMAE, FCEN-UBA.

Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)

A diferencia de las microscopías confocales estándar que emplean la intensidad de fluorescencia para construir las imágenes de barrido, la microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia es una técnica que se basa en analizar, pixel a pixel, el tiempo de vida de la fluorescencia proveniente del volumen irradiado.³⁸ El hecho de poder discriminar entre regiones muestrales según su tiempo de decaimiento y no debido a su intensidad de fluorescencia favorece apreciablemente el contraste de las imágenes obtenidas e incrementa su selectividad respecto a un cromóforo específico. Esta metodología de reconstrucción de imágenes permite analizar la presencia de un cromóforo en cada región del espacio estudiado independientemente de su concentración.³⁹

Gracias a que cada píxel de la imagen contiene información sobre un tiempo de vida determinado, y considerando que estos tiempos de vida suelen ser característicos de una dada molécula en un entorno, se pueden construir imágenes empleando selectivamente tiempos de decaimiento asociados a sondas o cromóforos específicos. Por ejemplo, al estudiar una muestra biológica, pueden construirse imágenes empleando únicamente los tiempos de decaimiento característicos de ciertos aminoácidos presentes en las proteínas y descartar así cualquier luz espuria proveniente de la dispersión del propio tejido.⁴⁰ Así también, pueden emplearse sondas que alteren su tiempo de decaimiento de fluorescencia debido a alteraciones en el entorno (polaridad del medio, rigidez, presencia de iones específicos) para luego construir una imagen filtrando únicamente los tiempos de vida asociados a los estadios de interés. Esto permite, por ejemplo, indagar regiones de distinta polaridad en una muestra empleando sondas solvatocrómicas.⁴¹

Los experimentos de microscopía confocal de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia fueron realizados con un equipo Abberior Expert Line empleando un láser pulsado de excitación de 375 nm para las moléculas en solución o 485 nm para las moléculas en presencia de una sonda de quinolimida. Para la detección se emplearon fotomultiplicadores híbridos con filtros pasabajos de 405 nm o 530 nm. El tiempo de exposición por pixel fue seleccionado específicamente para cada muestra como una solución de compromiso entre tiempo de captura de imagen e intensidad de fluorescencia detectada. La electrónica empleada para la adquisición fue un módulo HydraHarp 400 de PicoQuant trabajando a una tasa de repetición de 20 MHz. Las imágenes de FLIM se

construyeron considerando tiempos de vida de fluorescencia 1.5ns a 3ns para los casos de moléculas sin sonda y 2ns a 6ns para aquellas obtenidas en presencia de AQui. El análisis de las imágenes de FLIM se realizó empleando el software SymphoTime 64 de PicoQuant y macros propias programadas en ImageJ. Los tiempos de vida de fluorescencia fueron modelados empleando un modelo mono exponencial

Metodología Computacional

Teoría del funcional de la densidad (DFT)

Si pudiéramos describir la localización y el estado de spin de cada uno de los electrones que componen la estructura electrónica de una molécula podríamos extraer una gran cantidad de información relacionada con parámetros relevantes para la química, como energías de enlace, tensiones estructurales, confórmeros de menor energía y otras propiedades dadas por la posición relativa de los núcleos respecto a los electrones.

Una de las mayores limitaciones que impiden realizar este tipo de abordajes cuantitativamente rigurosos es el costo de cálculo asociado a la descripción de todo el fenómeno de interacción entre múltiples cuerpos. Poder construir una función de onda capaz de describir cada electrón que compone un elemento, por más liviano que sea, se vuelve extremadamente complejo si queremos considerar las distintas correlaciones electrónicas omnipresentes entre los componentes del sistema. Y esto se dificulta aún más cuando estos átomos están enlazados covalentemente conformando una estructura molecular, debido a que se deben considerar también los efectos de interacción a través de los enlaces tanto con los electrones como con los núcleos de sus inmediaciones.⁴²

Por lo tanto, a la hora de estudiar sistemas de múltiples átomos interconectados que representen de manera fidedigna moléculas lo suficientemente grandes como para resultar de interés en distintas ramas de la ciencia se debe encontrar una manera de circunvalar estas restricciones computacionales. Sería ideal poder describir todos los electrones de un sistema de manera sencilla y matemáticamente bien comportada, pero sin perder rigurosidad ni caer en un reduccionismo que nos impida extraer información de interés. Esto implicaría construir una función de onda que describa el comportamiento individual de todos y cada uno de los componentes del sistema. El mayor problema proviene de que todas estas interacciones entre los componentes del sistema dan lugar a la aparición de parámetros de interacción cruzada en las ecuaciones que son difíciles de abordar y describir desde la matemática. En muchos casos estos parámetros son imposibles de desacoplar y el sistema se vuelve irresoluble debido a que dependen de múltiples variables independientes.

Existen metodologías que proponen obtener esta función de onda general del sistema considerando que la misma puede ser construida como una combinación de funciones de onda individuales para cada electrón del sistema. Estas funciones de onda individuales son utilizadas como bloques de construcción para obtener la función de onda general del sistema a través de un proceso combinatorio que considera tanto las correlaciones cuánticas entre electrones como las restricciones de simetría inherentes a

sus orbitales. Este proceso de basa en generar matrices de Slater que describan la totalidad del sistema para luego calcular su determinante y obtener así una función de onda antisimétrica que describe el estado colectivo de todos los electrones.⁴³

Cuando tenemos una molécula con todos sus electrones apareados la función de onda que se obtiene empleando esta metodología puede hacer uso de ciertas restricciones de simetría que garantizan que se cumpla el principio de exclusión de Pauli y que facilitan la realización de la computación numérica de propiedades electrónicas. Por el contrario, cuando estamos describiendo un sistema con electrones desapareados (por ejemplo, metales de transición con configuraciones electrónicas de alto o bajo spin) el cálculo no está sometido a estas mismas restricciones y, por lo tanto, el costo computacional asociado es mayor. El tener electrones desapareados hace que estén disponibles distintas configuraciones electrónicas equivalentes debido a que ahora los electrones con spines desiguales no están limitados a compartir el mismo orbital.

El problema de este tipo de metodologías reside en que, al considerar cada electrón como una partícula independiente con su propia función de onda, no logran incluir eficazmente la correlación electrónica proveniente de la interacción entre electrones.⁴⁴

Resulta interesante entonces buscar una solución de compromiso entre tener una descripción rigurosa de la estructura electrónica de un compuesto y construir una metodología accesible computacionalmente que permita obtener parámetros y extraer valores característicos de sistemas poliatómicos de interés. Por este motivo se desarrollaron metodologías que consideran todos los electrones de manera colectiva como un campo de fuerzas alrededor de una partícula cargada. A esta entidad homogénea se la denominó “densidad electrónica” y se puede pensar como una función dependiente únicamente de las coordenadas espaciales que representa la probabilidad de encontrar un electrón en una dada región del espacio (Figura 7).

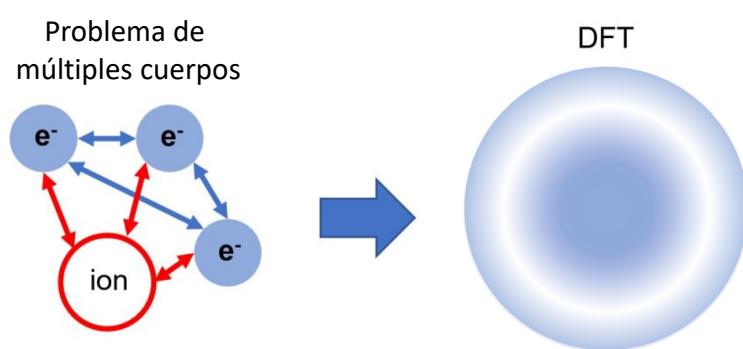


Figura 7. Esquema representativo de la aproximación por densidad electrónica al problema de múltiples cuerpos

Hohenberg y Kohn en 1964 mostraron que se puede usar la densidad electrónica, en lugar de la función de onda electrónica, para describir la relación entre la energía de un sistema y su potencial electroestático,⁴⁵ obteniendo grandes beneficios en la capacidad de cómputo sin pérdidas proporcionales en la información obtenida (Ecuación 2). Uno de los mayores beneficios de este abordaje es que la función de onda, al querer representar todos los electrones del sistema, depende de $3N$ variables (siendo N el número de electrones descriptos) mientras que la densidad electrónica solamente depende de 3 variables

espaciales. Por otro lado, la densidad electrónica puede describirse en términos de la suma de orbitales atómicos, lo cual facilita muchísimo su construcción.

Ecuación 2

$$E(\rho) = F(\rho) + \int \rho(r)v(r)dr$$

En la Ecuación 2, $F(\rho)$ refiere a un funcional que describe la interacción entre electrones y se compone de tres factores independientes (Ecuación 3): uno que describe la repulsión electroestática, y que se modela como un potencial de Coulomb ($J(\rho)$), otro que representa la energía producida por la correlación electrónica y el principio de repulsión de Pauli ($E_{xc}(\rho)$), y un último factor que agrega el componente cinético de la energía ($T(\rho)$). Es este funcional el que brinda el nombre a la Teoría del Funcional de la Densidad.

Ecuación 3

$$F(\rho) = T(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho)$$

Por otro lado, el término $v(r)$ en la ecuación 1 es también un potencial, pero que describe la interacción dada por el aporte electroestático entre los núcleos sobre los electrones. En este potencial reside toda la información geométrica de los sistemas analizados.

Hohenberg y Kohn no solamente demostraron la validez de la Ecuación 2 cuando se emplea la densidad electrónica del sistema como dominio de los parámetros si no que, además, existe un funcional que depende solamente de la densidad electrónica y que garantiza que la energía obtenida de esa ecuación será mínima si, y solo si, la densidad electrónica que se emplea para resolver esa ecuación es la que describe el estado electrónico fundamental del sistema. Esto demostró que la densidad electrónica es una herramienta muy potente y eficaz para describir correctamente sistemas poliatómicos lo suficientemente grandes como para describir moléculas de interés en varias ramas de la ciencia, pero permitiendo alcanzar la precisión requerida para comparar los resultados obtenidos de los cálculos con los ensayos fisicoquímicos y dar lugar a una predicción precisa de comportamientos y propiedades (Figura 8).⁴⁶ A este grado de precisión se lo conoce como precisión química y suele considerarse como un error entre los valores computados y los experimentales de 1 kJ/mol a 4 kJ/mol.

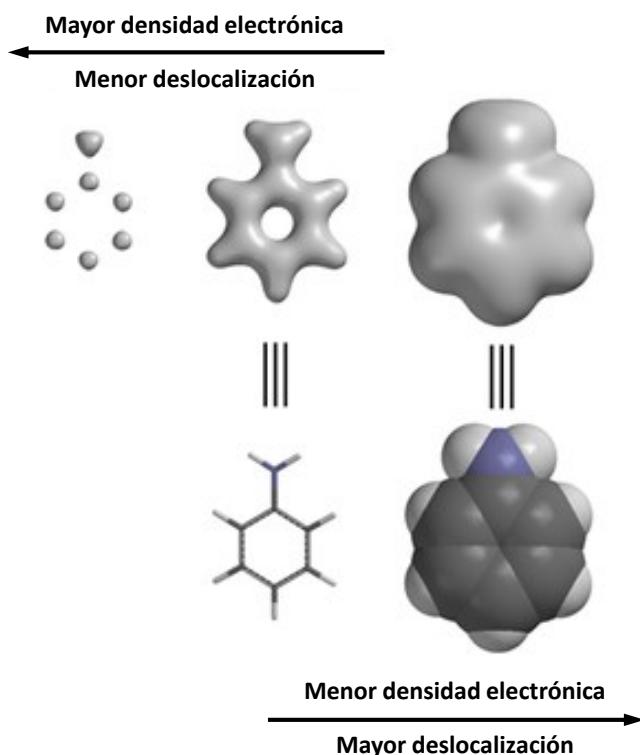


Figura 8. Esquema representativo de la versatilidad descriptiva de la densidad electrónica para una misma molécula.

Sobre la metodología de trabajo y la elección de bases y funcionales

Como se discutió anteriormente, la selección de un funcional que describa correctamente todas las interacciones presentes en el sistema es fundamental para garantizar que se esté modelando correctamente el sistema estudiado. Es por esto por lo que existe una amplia variedad de funcionales que buscan abarcar la multiplicidad de contextos en los que los cálculos de DFT pueden ser empleados (Figura 9). Existe una relación directa entre el nivel de precisión que se quiere obtener para un cálculo y el costo computacional que este implica. A medida que un funcional introduce nuevos parámetros que permiten considerar correcciones al modelo y aumentar su precisión se vuelve más costoso realizar su cálculo. Aun así, esta propuesta de categorización no es absoluta y siempre es recomendable realizar una comparación contra un estándar a la hora de elegir un funcional específico. Para los cálculos de estructura electrónica realizados durante este trabajo se emplearon funcionales por aproximación del gradiente generalizado (GGA) BP86 u híbridos-GGA B3LYP en complementariedad con una triple corrección por dispersión (D3) para considerar los efectos de correlación a largo alcance.

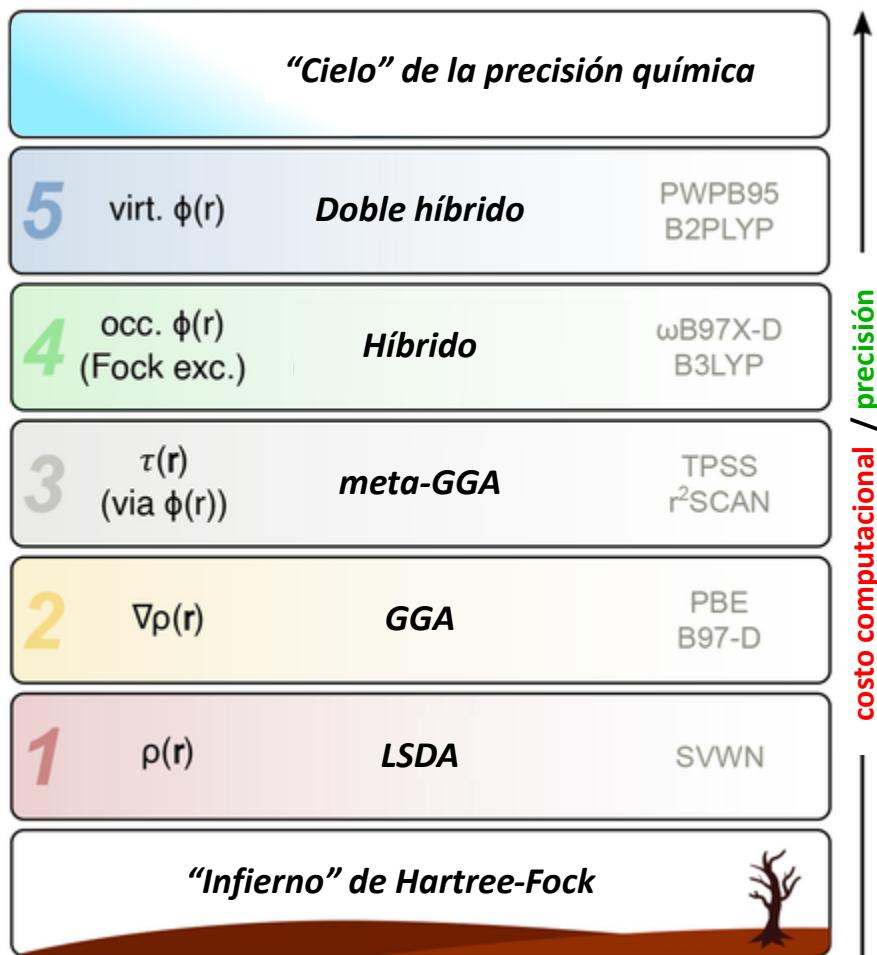


Figura 9 Distintos tipos de funcionales ordenados de mayor a menor grado de precisión/coste computacional. Adaptado de la referencia⁴⁷.

Por otro lado, las bases son las funciones que emplearemos para describir la densidad electrónica. En líneas generales se componen de combinaciones lineales de los orbitales atómicos extraídos del modelo hidrogenoide de Böhr en combinación con distintas funciones complementarias que buscan describir la polarizabilidad y “difusividad” de una nube electrónica. Una de las metodologías de obtención de estas bases es la construcción de orbitales del tipo Slater utilizando funciones gaussianas. Para poder optimizar la descripción de distintos tipos de átomos y alterar la rigurosidad con que se modela el sistema se suele alterar el número de funciones gaussiana que se emplea para su construcción. Adicionalmente, con el fin de describir con mayor precisión los efectos de polarizabilidad y difusión de la nube electrónica si agregan funciones específicas que contemplan estos comportamientos.

En líneas generales, para los cálculos de estructura electrónica desarrollados durante esta Tesis Doctoral se realizaron utilizando el programa de química computacional ORCA5.0⁴⁸, empleando bases del tipo def2-SVP con un set auxiliar def2/J para los casos en que se hizo uso de la aproximación por resolución de la identidad. Este set de bases, junto con el funcional BP86 y la triple corrección por dispersión D3, han demostrado ser una excelente solución de compromiso entre rapidez y precisión a la hora de estudiar la química conformacional y supramolecular de pequeñas moléculas.^{46,49,50}

Análisis de la estructura supramolecular

Superficies de Hirshfeld, Gráficos dactilográficos (2D-Fingerprint plot) y Estructura de Energías.

A la hora de analizar los resultados de una dilucidación estructural por difracción de rayos X contamos con múltiples herramientas que nos permiten visualizar el conjunto de interacciones intermoleculares en un material cristalino y la naturaleza de su empaquetamiento. Y, a pesar de que muchas de las interacciones intermoleculares que estructuran una arquitectura cristalina pueden resultar simples de identificar y caracterizar en términos de los átomos involucrados y sus relaciones geométricas (distancias, ángulos y orientaciones), muchas veces existen otras interacciones que nutren la química supramolecular y que pueden no resultar tan reconocibles a simple vista.⁵¹ Es por esto que existen herramientas especialmente diseñadas para estudiar cómo se distribuye la densidad electrónica asociada a una molécula en la celda unidad y poder comparar esta distribución con la de su entorno.

Un programa que se emplea comúnmente para investigar las propiedades estructurales es el Mercury.⁵² Este permite llevar a cabo un análisis estructural a través del estudio de las estructuras supramoleculares presentes en el sistema. Al mismo tiempo, facilita la visualización y el análisis de los patrones supramoleculares y de empaquetamiento, y permite estudiar la presencia de poros y simular la morfología del hábito cristalino, entre otras funcionalidades. Por otro lado, existen herramientas computacionales diseñadas específicamente para graficar superficies alrededor de moléculas, iones u otros fragmentos moleculares de interés. Se trata de estrategias que permiten la construcción de superficies de contorno, las cuales son esenciales para estudiar cómo está alojada una dada molécula o ion en la estructura y poder delimitar así regiones de interés, como pueden ser huecos estructurales, canales o regiones de alta densidad. Muchas de las superficies más comunes, como aquellas que se construyen empleando radios de Van der Waals, se obtienen considerando únicamente información sobre los átomos (por ejemplo, valores de radio atómico normalizado). Esta manera de abordar la construcción de una superficie molecular, que puede llegar a ser ventajosa en términos de cálculo computacional, recae en la generación de una superficie que es independiente del entorno molecular. Sin dudas, estas superficies son muy útiles para estudiar una molécula individual y aislada. Pero, a la hora de investigar una molécula o ion alojada en un entorno rigurosamente definido, como es el interior de una estructura cristalina, es mucho más enriquecedor contar con una superficie que sea construida considerando toda esta información complementaria. Es por este motivo que surgen las superficies de Hirshfeld (SH) como una herramienta única para comprender la naturaleza de la interacción entre una porción de una estructura y su entorno.

Los formalismos en los que se sostiene la confección de este tipo de superficies provienen de extrapolar la definición de átomos en moléculas que propuso F.L Hirshfeld en 1977.⁵³ En esta, Hirshfeld propone definir a un átomo en términos del aporte de su densidad electrónica a la totalidad de la densidad electrónica molecular a una distancia dada. Para ello define una función de peso que pondera el aporte a la densidad electrónica en un punto dado del espacio de un átomo respecto a la densidad electrónica calculada en el mismo punto del espacio para la totalidad de los átomos en la molécula (Ecuación 4).

Ecuación 4

$$w_a(r) = \frac{\rho_a^{at}(r)}{\sum_{i \in \text{molecula}} \rho_i^{at}(r)}$$

Mas allá de un análisis pormenorizado de esta definición y su potencial aplicación para el cálculo de propiedades atómicas en moléculas, podemos observar cómo esta definición entiende al átomo como una entidad embebida en un entorno y lo define en términos relativos a su aporte a una estructura global. No se piensa al átomo desde el concepto de esferas rígidas si no, más bien, se desdibuja esa frontera atómica para dar paso a una construcción molecular colectiva.

Es esta misma metodología de definición de un fragmento estructural en términos de su aporte a la totalidad del entorno que lo contiene la que se emplea para construir la superficie de Hirshfeld.⁵⁴ Ahora ya no son los átomos quienes son definidos en términos de su aporte a la densidad electrónica de una molécula si no estas las que son definidas en términos de su aporte a la densidad electrónica del cristal (o, en su defecto, de la celda unidad que la contiene.) Es fácil ver como esta definición ahora nos permite representar información tanto de la molécula como de su entorno, una de las características esenciales que buscábamos contemplar inicialmente.

Las superficies de Hirshfeld no solamente cuentan con muchas propiedades deseadas desde el estudio topológico (son densamente compactas respecto al volumen que las contiene, son continuas, suaves y derivables)⁵⁴ si no que, además, pueden ser coloreadas empleando como variables diferentes propiedades, lo que las vuelve aún más interesantes para extraer información estructural de forma gráfica y ágil.

Por ejemplo, se pueden utilizar como lienzo para graficar valores de distancia entre los átomos contenidos en el interior y aquellos que quedan fuera de la superficie, de forma tal de poder estudiar no solamente el volumen que contiene a una molécula si no también la distancia que separa a esta de su entorno en cada región del espacio. Esto da como resultado un análisis exhaustivo de distancias interatómicas que suele ser fundamental para una primera aproximación al estudio de la cantidad y calidad de las interacciones interestructurales (inter e intramoleculares) presentes en una estructura.

A su vez, se puede explorar también como es la relación de distancias entre átomos dentro y fuera de la superficie de Hirshfeld respecto a los radios de Van der Waals conocidos para cada elemento. Podemos preguntarnos, por ejemplo, si la suma de las distancias entre un punto de la superficie de Hirshfeld y un átomo dentro de ella (d_i) y otro fuera de ella (d_e) es mayor, menor o igual a la esperada para la suma de sus dos radios atómicos independientes (r^{vdW}) (Ecuación 5).

Ecuación 5. Cálculo de la distancia normalizada respecto a los valores del radio de Van der Waals de cada átomo en la estructura.

$$d_{norm} = \frac{d_i - r_i^{vdW}}{r_i^{vdW}} + \frac{d_e - r_e^{vdW}}{r_e^{vdW}}$$

Si esta distancia es menor quiere decir que los átomos se encuentran más juntos de lo que hubiera sido esperado para una circunstancia de átomos independientes y, por lo tanto, podemos asumir que ahí se está produciendo una interacción entre los átomos. Esos

átomos están más cerca de lo que hubiéramos esperado para una situación donde el contacto se produce únicamente por una interacción tangencial y, por lo tanto, debemos de sospechar que hay una fuerza de naturaleza atractiva que está actuando entre ellos. Si, además, pensamos esta relación de distancias entre átomos como un continuo que va desde átomos separados a una distancia mayor a la esperada hasta los átomos separados por una distancia menor a la suma directa de sus radios pasando por valores intermedios, y designamos una paleta cromática de tres colores para representar estas distancias, podemos analizar esta relación de distancias punto a punto y emplearla para colorear la superficie de Hirshfeld (Figura 10).

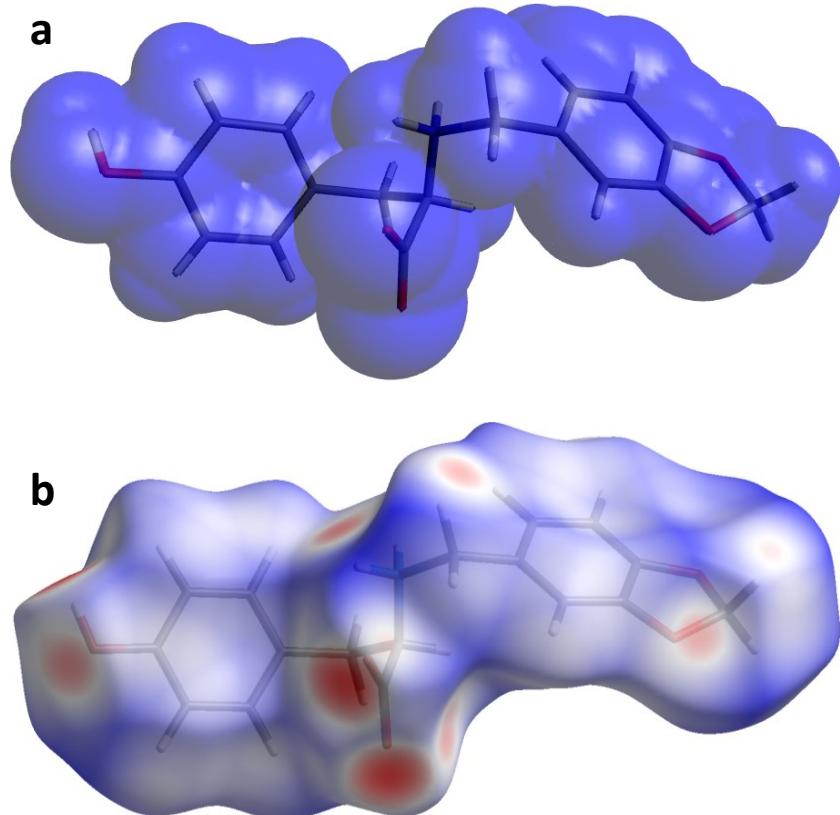


Figura 10. Comparación entre la superficie construida por esferas de Van der Waals (radios de 1,20, 1,70, 1,55, 1,50 y 1,75 Å para H, C, N y O) y la superficie de Hirshfeld construida a un isovalor de 0,5 para una molécula del compuesto **2.e**. La superficie de Hirshfeld está coloreada por la distancia normalizada empleando una paleta de colores rojos, blancos y azules para distancias menores, iguales o mayores a la suma normalizada de los radios de Van der Waals entre átomos dentro y fuera de la superficie.

Esta complementariedad entre una superficie definida de manera compacta alrededor de una molécula y una paleta de colores que nos permite detectar fácilmente proximidades interatómicas entre fragmentos estructurales da como resultado una herramienta excepcional para detectar fácilmente interacciones intermoleculares no tan simples de identificar.

A modo de ejemplo, podemos estudiar que sucede en el caso de estudiar la presencia de interacciones de apilamiento aromático o “ π -stacking”. Este tipo de interacciones se producen debido a la distribución heterogénea de densidad electrónica que se observa en las estructuras resonantes. Este tipo de compuestos presentan la

capacidad de alojar y distribuir una gran cantidad de densidad electrónica en regiones muy específicas de su estructura, en las que el efecto resonante estabiliza y favorece la distribución de cargas. Al mismo tiempo, debido a esta anisotropía en la distribución espacial de cargas, se producen regiones carentes de densidad electrónica que se vuelven relativamente más positivas que su entorno. Por otro lado, debido a los requerimientos estructurales que impone la naturaleza resonante de este tipo de compuestos, los fragmentos aromáticos suelen ser planos salvo casos excepcionales.⁵⁵ Por lo tanto, para detectar la presencia de interacciones de apilamiento aromáticos requerimos de una herramienta que no solamente estudie como es la distribución de densidad electrónica alrededor de una molécula si no, también, que nos brinde información sobre la topología de esta superficie con el fin de distinguir si está presente esta planaridad tan característica.⁵⁶ Este tipo de interacciones ponen de manifiesto el rol esencial que cumple el análisis por superficies de Hirshfeld de las estructuras cristalinas.

Además de este potente análisis visual que brindan las superficies de Hirshfeld y sus múltiples maneras de ser coloreadas, existe la posibilidad de estudiar en detenimiento como son las relaciones de distancia entre los átomos contenidos dentro y fuera de la superficie. Por ejemplo, puede resultar interesante estudiar a qué distancia se encuentran todos los átomos capaces de aceptar puentes de hidrógeno de una molécula respecto a su hidrógeno más cercano fuera de la superficie de Hirshfeld. De esta manera podríamos estudiar si todos los potenciales puntos de interacción por puente de hidrógeno se encuentran satisfechos o si quedan algunos vacantes. Nuevamente, si a esta información la complementamos con la capacidad de visualizar el entorno molecular en busca de espacios vacantes para alojar moléculas, tenemos una herramienta muy potente para el estudio de cavidades estructurales y su potencial afinidad.

Este análisis en término de distancias externas e internas se conoce como gráfica dactilográfica bidimensional o “*2D-fingerprint plot*” (Figura 11). Se considera dactilográfica en tanto es propia y característica de la distribución de distancias de cada estructura y no puede ser replicada, aún en los casos de compuestos isoestructurales.^{54,57} No obstante, es una herramienta interesante para estudiar la presencia de patrones de distribución característicos.

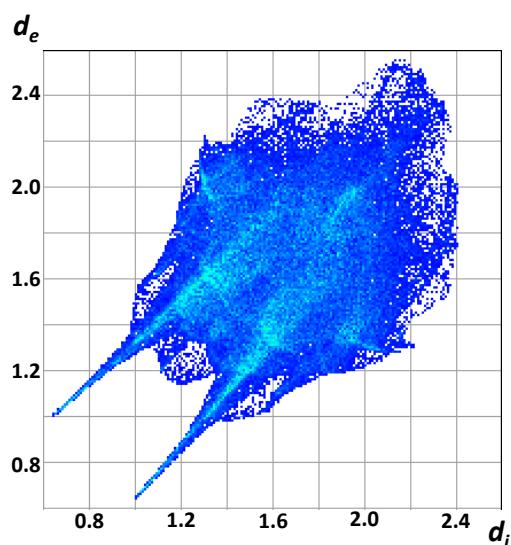


Figura 11. Gráfica dactilográfica bidimensional calculada para la estructura cristalina de 2.e

Por ejemplo, si consideramos que las distancias standard esperadas para un puente de hidrógeno van entre los 2,7 \AA a los 3,3 \AA , podemos esperar que una estructura cristalina que presente puentes de hidrógeno tendrá átomos donores y aceptores separados a esta distancia. Considerando esto, podemos estudiar en detalle la distribución de distancias observadas para un conjunto de átomos seleccionados (por ejemplo, los capaces de aceptar puente de hidrógeno) y distinguir así quienes son los responsables de ciertas interacciones. En particular, podemos estudiar la distribución de distancias asociadas a todos los nitrógenos e hidrógenos contenidos en una estructura, y compararla con la distribución observada para, por ejemplo, los oxígenos y los hidrógenos. De esta manera podemos no solamente discernir si hay o no presencia de puentes de hidrógeno si no, además, distinguir si todos los接受ores de puente de hidrógeno en la estructura están implicados o si solamente un grupo definido de ellos está formando este tipo de interacciones. Hasta existe la posibilidad de determinar qué cantidad de puntos en la superficie están relacionados con cierta distribución de pares de distancia para un par de átomos en específico, permitiendo así cuantificar el aporte porcentual de esta interacción a la totalidad de interacciones presentes en la estructura.⁵⁸

Adicionalmente, todas estas herramientas pueden complementarse con la realización de cálculos de estructura electrónica empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT). Esto nos permite, por ejemplo, calcular como es la energía de interacción asociada a distintos fragmentos estructurales. Es importante notar que este tipo de cálculos, si deseamos realizarlos con rigurosidad, pueden ser extremadamente difíciles de computar para sistemas extendidos debido a las restricciones que impone la periodicidad del sistema y lo complejo que puede llegar a ser aproximar un sistema infinito de manera analítica a la hora de realizar el cálculo. Pero es también esta periodicidad intrínseca de los materiales cristalinos lo que nos permite entenderlos en términos del aporte independiente de sus partes. Esto implica que podemos estudiar únicamente la unidad asimétrica de un cristal de manera independiente y luego extrapolar estos resultados haciendo uso de las operaciones de simetría y las traslaciones. A esta construcción de una nueva red pero en términos de energía se lo conoce como la topología tridimensional de las interacciones o la estructura de energías.⁵⁹ Aunque, nuevamente, esto no considera términos como la repulsión electroestática a largo alcance, es una manera accesible de estudiar de manera cuantitativa la energía de interacción entre fragmentos estructurales con el fin de realizar comparaciones cualitativas.

Este tipo de cálculos resultan muy interesantes a la hora de comparar como es la interacción entre dos fragmentos estructurales cuando la relación entre ellos es compleja o se encuentra poblada de múltiples interacciones difíciles de distinguir y cuantificar. Al mismo tiempo, gracias a su representación visual en “tubos” cuyo diámetro representa la intensidad de la interacción, se vuelven muy potentes a la hora de visualizar como es la distribución de energías de interacción en una red cristalina. Esto permite extraer algunas conclusiones, aunque aproximadas, sobre la presencia de ejes preferenciales de interacción, planos de interacción o hasta posibles regiones de clivaje.⁵⁹

Todo el análisis de Hirshfeld (cálculo de superficies, diagramas dactilográficos y redes de energía) desarrollado en este trabajo de Tesis Doctoral se realizó utilizando el software CrystalExplorer.⁶⁰

Determinación del factor de forma

El factor de forma (F_f) es un parámetro estructural que se empleará para cuantificar la anisotropía morfológica de una figura geométrica. Se define como el cociente entre la arista máxima y la arista mínima del paralelepípedo de menor volumen que circunscribe una molécula, que es construida empleando esferas atómicas cuyo radio es equivalente al radio de colisión atómico. Siendo las aristas del paralelepípedo a , b y c , podemos calcular el factor de forma como se indica en la Ecuación 6:

Ecuación 6. Cálculo del factor de forma.

$$F_f = \frac{\text{MAX}(a, b, c)}{\text{MIN}(a, b, c)}$$

Para realizar este cálculo se utilizó el programa Chemcraft,⁶¹ que aplica una metodología de construcción de volumen por adición de partes.⁶² Esta metodología toma como punto de partida las posiciones, identidades atómicas y conectividades de una estructura molecular y la construye localizando en la posición de cada átomo, una esfera de diámetro igual a su diámetro de colisión. Esto genera una estructura molecular de esferas densamente empaquetadas que es rodeada por un paralelepípedo de volumen mínimo. Sobre este paralelepípedo se extraen los parámetros estructurales que se utilizarán para caracterizar la morfología molecular (Figura 12)

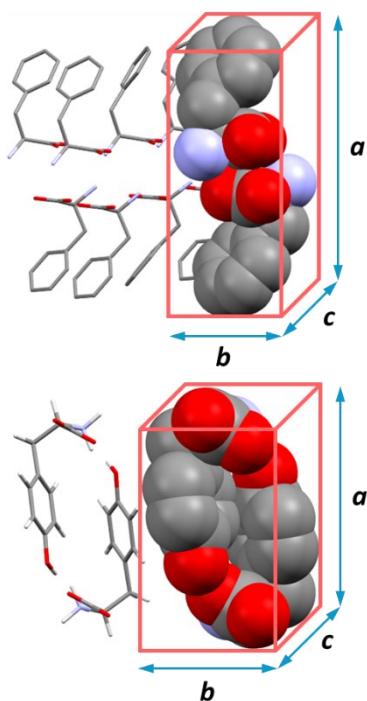


Figura 12. Metodología de construcción del paralelepípedo de menor volumen que circunscribe una estructura molecular construida por esferas cuyo diámetro es el diámetro de colisión atómico.

Cuanto mayor es el factor de forma, más anisotrópica es la morfología de una molécula. Por lo tanto, un sistema constituido por este tipo de partículas y cuya concentración le imponga la necesidad de estar densamente empaquetado minimizará la distancia entre partículas orientándolas de la manera más eficaz posible. Esto podría dar lugar a la generación espontánea de orientaciones preferenciales que impongan un orden supramolecular de corto alcance semejante al que se observa para las fases calamíticas, tanto nemática como esméctica de sistemas tipo cristal líquido.⁶³ Es fundamental entender que esta anisotropía morfológica impone una condición de cristalinidad sobre los agregados supramoleculares que quedan constituidos, independientemente de la identidad de las partículas que lo componen, o las interacciones que se desarrollen. Podemos pensar a la anisotropía morfológica como un parámetro que modula la actividad de un tipo de fuerza entrópica que actúa atractivamente y cuya naturaleza presenta un fuerte carácter orientador.^{64,65}

Determinación de la convergencia supramolecular

En el campo de la química de coordinación el concepto de bloque de construcción convergente (aquel capaz de dar lugar a la formación de compuestos mononucleares) o divergente (aquel capaz de dar lugar a la formación de redes extendidas) se encuentra ampliamente extendido a la hora de diseñar estructuras poliméricas de diversas topologías. Para el análisis que se desarrollará en este capítulo, se empleará una definición análoga para distinguir a los bloques de construcción que conforman un agregado supramolecular y la capacidad potencial de extender la red de enlaces no covalentes en más de una dimensión espacial.⁶⁶

Se considerará bloque de construcción convergente a toda aquella molécula que no presenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno, o ninguna otra interacción no covalente fuerte y direccionada, a través de sus residuos o grupos no aminoacídicos. Al contrario, se considerará bloque de construcción divergente a aquel capaz de desarrollar interacciones del tipo puente de hidrógeno, o cualquier otra interacción no covalente fuerte y direccionada, desde sus residuos hacia “el exterior” del agregado supramolecular.

El concepto de divergencia deviene de la capacidad de formar redes no covalentes extendidas tridimensionalmente de forma tal de hacer “divergir” la topología del ensamblaje. Es interesante notar que esta definición, aunque semejante, no es equivalente al concepto de *topicidad* establecido para cuantificar el número de sitios de unión de un ligando en una red organometálica.^{67,68} La divergencia supramolecular no solamente remite a la capacidad de formar interacciones no covalentes complementarias a las que se desarrollan a través de la cadena principal o empleando el grupo aminoacídico, si no también, considera la orientación de estas respecto a la estructura supramolecular confeccionada. Utilizar bloques de construcción divergentes favorece no solamente la formación de redes extendidas, sino que también propicia el incremento en la energía de estabilización asociada a un empaquetamiento denso y bien ordenado, en tanto aumenta el número de interacciones atractivas entre un bloque de construcción y su entorno supramolecular.

Esta dicotomía entre convergencia y divergencia supramolecular se puede ver ilustrada claramente en la relación estructural que se desarrolla entre L-Fenilalanina y L-Tirosina (Figura 13). La primera no presenta la capacidad de donar o aceptar puentes de

hidrógeno en ninguna de las posiciones de su residuo aminoacídico mientras que la segunda, gracias a la presencia de un grupo hidroxilo en la posición *para*, sí. En los casos en que haya más de un residuo y exista la posibilidad de formar puentes de hidrógeno en alguno de ellos y en otros no, el residuo será considerado mixto. En los casos en que el sistema esté compuesto únicamente de moléculas cuyo residuo es capaz de aceptar puente de hidrógeno, pero no de donar y no haya otros donores posibles, el bloque de construcción se comportará convergentemente y, por lo tanto, será considerado de esta manera.

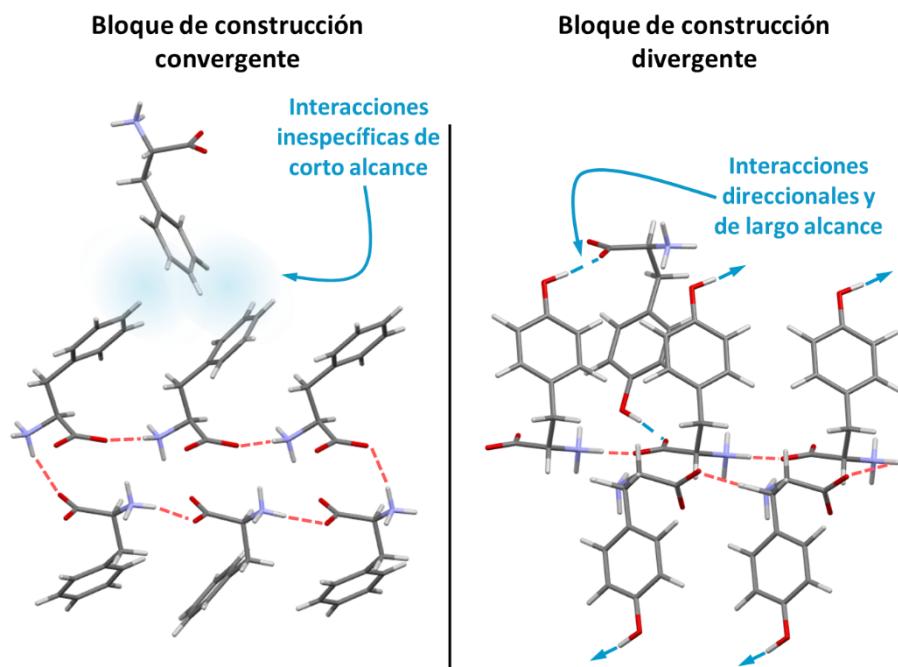


Figura 13. Comportamiento convergente y divergente representado para las estructuras de L-Fenilalanina (izquierda, CCDC: 985094) y L-Tirosina (derecha, CCDC: 1208550)

La propiedad de divergencia supramolecular es esencial para garantizar la formación de ensambles supramoleculares extendidos tridimensionalmente que sean capaces de desarrollar redes de energía de interacción atractivas e intensas.⁵⁹ Esto es esencial para diseñar racionalmente bloques de construcción para el desarrollo de nuevos materiales con una respuesta mecánica isotrópica y una baja flexibilidad.

Bibliografía

- (1) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504. <https://doi.org/10.1021/cr800323s>.
- (2) Layer, R. W. The Chemistry of Imines. *Chem. Rev.* **1963**, *63* (5), 489–510. <https://doi.org/10.1021/cr60225a003>.
- (3) Belowich, M. E.; Stoddart, J. F. Dynamic Imine Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (6), 2003–2024. <https://doi.org/10.1039/C2CS15305J>.
- (4) Lu, Y.; Bulka, B.; desJardins, M.; Freeland, S. J. Amino Acid Quantitative Structure Property Relationship Database: A Web-Based Platform for Quantitative Investigations of Amino Acids. *Protein Engineering, Design and Selection* **2007**, *20* (7), 347–351. <https://doi.org/10.1093/protein/gzm027>.
- (5) Bordallo, H. N.; Boldyreva, E. V.; Buchsteiner, A.; Koza, M. M.; Landsgesell, S. Structure–Property Relationships in the Crystals of the Smallest Amino Acid: An Incoherent Inelastic Neutron Scattering Study of the Glycine Polymorphs. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (29), 8748–8759. <https://doi.org/10.1021/jp8014723>.
- (6) Luisa Di Gioia, M.; Leggio, A.; Malagrinò, F.; Romio, E.; Siciliano, C.; Liguori, A. N-Methylated α -Amino Acids And Peptides: Synthesis And Biological Activity. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2016**, *16* (9), 683–690.
- (7) Glatter, O.; Kratky, O.; Kratky, H. C. *Small Angle X-Ray Scattering*; Academic press, 1982.
- (8) Bragg, W. L. The Structure of Some Crystals as Indicated by Their Diffraction of X-Rays. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing papers of a mathematical and physical character* **1913**, *89* (610), 248–277.
- (9) Friedrich, W.; KNIPPING, P. v. LAUE, M. von. Interferenz-Erscheinungen Bei Röntgenstrahlen. *Sitzungsberichte der Mathematisch-Physikalischen Classe der Königlich-Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München* **1912**, 303–322.
- (10) Blatov, V. A.; Shevchenko, A. P.; Proserpio, D. M. Applied Topological Analysis of Crystal Structures with the Program Package ToposPro. *Crystal Growth & Design* **2014**, *14* (7), 3576–3586. <https://doi.org/10.1021/cg500498k>.
- (11) Aroyo, M. I.; Kirov, A.; Capillas, C.; Perez-Mato, J. M.; Wondratschek, H. Bilbao Crystallographic Server. II. Representations of Crystallographic Point Groups and Space Groups. *Acta Cryst A* **2006**, *62* (2), 115–128. <https://doi.org/10.1107/S0108767305040286>.
- (12) Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Cryst B* **2016**, *72* (2), 171–179. <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>.
- (13) Brockhauser, S.; Ravelli, R. B. G.; McCarthy, A. A. The Use of a Mini- κ Goniometer Head in Macromolecular Crystallography Diffraction Experiments. *Acta Cryst D* **2013**, *69* (7), 1241–1251. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003880>.
- (14) Kabsch, W. XDS. *Acta Cryst D* **2010**, *66* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- (15) Nascimento, A.; Araujo, E.; Hagio, C.; Almeida, S.; Rodrigues, A. C.; Barreto Barbosa Trivella, D.; Bruder, M.; Rustiguel, J. K.; Dislich Ropke, C.; Ravanelli Pessa, L.; Azevedo, H.; Cardoso, M.; Zeri, A. C. Launch of the Manacá Beamline at Sirius: First Protein Crystallography Structures and New Opportunities for Pharmaceutical Development Using Synchrotrons. *Synchrotron Radiation News* **2021**, *34* (5), 3–10. <https://doi.org/10.1080/08940886.2021.1994310>.

- (16) Gabadinho, J.; Beteva, A.; Guijarro, M.; Rey-Bakaikoa, V.; Spruce, D.; Bowler, M. W.; Brockhauser, S.; Flot, D.; Gordon, E. J.; Hall, D. R.; Lavault, B.; McCarthy, A. A.; McCarthy, J.; Mitchell, E.; Monaco, S.; Mueller-Dieckmann, C.; Nurizzo, D.; Ravelli, R. B. G.; Thibault, X.; Walsh, M. A.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M. *MxCuBE*: A Synchrotron Beamline Control Environment Customized for Macromolecular Crystallography Experiments. *J Synchrotron Rad* **2010**, *17* (5), 700–707. <https://doi.org/10.1107/S0909049510020005>.
- (17) Agilent. CrysAlis PRO, 2014.
- (18) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *OLEX2*: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J Appl Crystallogr* **2009**, *42* (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (19) Boldon, L.; Laliberte, F.; Liu, L. Review of the Fundamental Theories behind Small Angle X-Ray Scattering, Molecular Dynamics Simulations, and Relevant Integrated Application. *Nano Reviews* **2015**, *6* (1), 25661. <https://doi.org/10.3402/nano.v6.25661>.
- (20) Hammersley, A. P. *FIT2D*: A Multi-Purpose Data Reduction, Analysis and Visualization Program. *J Appl Crystallogr* **2016**, *49* (2), 646–652. <https://doi.org/10.1107/S1600576716000455>.
- (21) Ashiotis, G.; Deschildre, A.; Nawaz, Z.; Wright, J. P.; Karkoulis, D.; Picca, F. E.; Kieffer, J. The Fast Azimuthal Integration Python Library: pyFAI. *J Appl Cryst* **2015**, *48* (2), 510–519. <https://doi.org/10.1107/S1600576715004306>.
- (22) Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. Scattering Functions of Semiflexible Polymers with and without Excluded Volume Effects. *Macromolecules* **1996**, *29* (23), 7602–7612. <https://doi.org/10.1021/ma9607630>.
- (23) Childs, S. L.; Stahly, G. P.; Park, A. The Salt–Cocrystal Continuum: The Influence of Crystal Structure on Ionization State. *Mol. Pharmaceutics* **2007**, *4* (3), 323–338. <https://doi.org/10.1021/mp0601345>.
- (24) David, S. E.; Timmins, P.; Conway, B. R. Impact of the Counterion on the Solubility and Physicochemical Properties of Salts of Carboxylic Acid Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2012**, *38* (1), 93–103. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.592530>.
- (25) Guerrieri, P.; Jarring, K.; Taylor, L. S. Impact of Counterion on the Chemical Stability of Crystalline Salts of Procaine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *99* (9), 3719–3730. <https://doi.org/10.1002/jps.22009>.
- (26) Mazzenga, G. C.; Berner, B. The Transdermal Delivery of Zwitterionic Drugs I: The Solubility of Zwitterion Salts. *Journal of Controlled Release* **1991**, *16* (1), 77–88. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90032-9).
- (27) Recrystallization (Chemistry). *Wikipedia*; 2022.
- (28) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. A View of the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (10), 2812–2812. <https://doi.org/10.1021/jp020104r>.
- (29) Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance: With Examples from Solid State Physics*; Harper's physics series; Harper & Row: New York, 1963.
- (30) Chemistry (IUPAC), T. I. U. of P. and A. *IUPAC - chromophore (C01076)*. <https://doi.org/10.1351/goldbook.C01076>.
- (31) Striebel, M.; Wrachtrup, J.; Gerhardt, I. Absorption and Extinction Cross Sections and Photon Streamlines in the Optical Near-Field. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 15420. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15528-w>.
- (32) Freifelder, D.; Davison, P. F. Hyperchromicity and Strand Separation in Bacterial DNA. *Biophysical Journal* **1962**, *2* (3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(62\)86853-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(62)86853-2).

- (33) Ackerman, M. M.; Ricciardi, C.; Weiss, D.; Chant, A.; Kraemer-Chant, C. M. Analyzing Exonuclease-Induced Hyperchromicity by UV Spectroscopy: An Undergraduate Biochemistry Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* **2016**, 93 (12), 2089–2095. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00095>.
- (34) Schulman, S. G. *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice*; Elsevier, 2017.
- (35) He, Z.; Ke, C.; Tang, B. Z. Journey of Aggregation-Induced Emission Research. *ACS Omega* **2018**, 3 (3), 3267–3277. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00062>.
- (36) Baroncini, M.; Bergamini, G.; Ceroni, P. Rigidification or Interaction-Induced Phosphorescence of Organic Molecules. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (13), 2081–2093. <https://doi.org/10.1039/C6CC09288H>.
- (37) Czarnik, A. W. Supramolecular Chemistry, Fluorescence, and Sensing. In *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 1993; Vol. 538, pp 1–9. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0538.ch001>.
- (38) Lakowicz, J. R.; Szmacinski, H.; Nowaczyk, K.; Berndt, K. W.; Johnson, M. Fluorescence Lifetime Imaging. *Anal Biochem* **1992**, 202 (2), 316–330. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90112-k](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90112-k).
- (39) Oida, T.; Sako, Y.; Kusumi, A. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Flimscopy). Methodology Development and Application to Studies of Endosome Fusion in Single Cells. *Biophys J* **1993**, 64 (3), 676–685.
- (40) Yasuda, R. Imaging Spatiotemporal Dynamics of Neuronal Signaling Using Fluorescence Resonance Energy Transfer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Current Opinion in Neurobiology* **2006**, 16 (5), 551–561. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.08.012>.
- (41) Fueyo-González, F.; González-Vera, J. A.; Alkorta, I.; Infantes, L.; Jimeno, M. L.; Aranda, P.; Acuña-Castroviejo, D.; Ruiz-Arias, A.; Orte, A.; Herranz, R. Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish. *ACS Sens.* **2020**, 5 (9), 2792–2799. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00587>.
- (42) Burke, K.; Wagner, L. O. DFT in a Nutshell. *International Journal of Quantum Chemistry* **2013**, 113 (2), 96–101. <https://doi.org/10.1002/qua.24259>.
- (43) Slater, J. C. Note on Hartree's Method. *Phys. Rev.* **1930**, 35 (2), 210–211. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.35.210.2>.
- (44) Slater, J. C. The Self Consistent Field and the Structure of Atoms. *Phys. Rev.* **1928**, 32 (3), 339–348. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.32.339>.
- (45) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, 136 (3B), B864–B871. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>.
- (46) Antony, J.; Grimme, S. Density Functional Theory Including Dispersion Corrections for Intermolecular Interactions in a Large Benchmark Set of Biologically Relevant Molecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8 (45), 5287–5293. <https://doi.org/10.1039/B612585A>.
- (47) Bursch, M.; Mewes, J.-M.; Hansen, A.; Grimme, S. Best-Practice DFT Protocols for Basic Molecular Computational Chemistry**. *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, 61 (42), e202205735. <https://doi.org/10.1002/anie.202205735>.
- (48) Neese, F.; Wennmohs, F.; Becker, U.; Ripplinger, C. The ORCA Quantum Chemistry Program Package. *J. Chem. Phys.* **2020**, 152 (22), 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
- (49) Braunschweig, H.; Fernández, I.; Frenking, G.; Kupfer, T. Structural Evidence for Antiaromaticity in Free Boroles. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (10), 1951–1954. <https://doi.org/10.1002/anie.200704771>.

- (50) Alshammari, N.; Platts, J. A. Can Ionic Effects Induce α -Sheet Conformation of Peptides? *Chemical Physics Letters* **2021**, *784*, 139095. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.139095>.
- (51) Ramanathan, K.; Shanthi, V.; Sethumadhavan, R. A Compact Review on the Comparison of Conventional and Non-Conventional Interactions on the Structural Stability of Therapeutic Proteins. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* **2011**, *3* (2), 144–160. <https://doi.org/10.1007/s12539-011-0082-9>.
- (52) Macrae, C. F.; Sovago, I.; Cottrell, S. J.; Galek, P. T. A.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G. P.; Stevens, J. S.; Towler, M.; Wood, P. A. Mercury 4.0: From Visualization to Analysis, Design and Prediction. **2020**, *10*.
- (53) Hirshfeld, F. L. Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge Densities. *Theoret. Chim. Acta* **1977**, *44* (2), 129–138. <https://doi.org/10.1007/BF00549096>.
- (54) Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld Surface Analysis. *CrystEngComm* **2009**, *11* (1), 19–32. <https://doi.org/10.1039/B818330A>.
- (55) Ferguson, G.; Robertson, J. M. Planar and Non-Planar Aromatic Systems. In *Advances in Physical Organic Chemistry*; Gold, V., Ed.; Academic Press, 1963; Vol. 1, pp 203–281. [https://doi.org/10.1016/S0065-3160\(08\)60279-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3160(08)60279-8).
- (56) Martinez, C. R.; Iverson, B. L. Rethinking the Term “Pi-Stacking.” *Chem. Sci.* **2012**, *3* (7), 2191–2201. <https://doi.org/10.1039/C2SC20045G>.
- (57) Rey, J. M.; Movilla, F.; Suárez, S. A.; Di Salvo, F. Synthesis, Structural and Electrochemical Properties of a New Family of Amino-Acid-Based Coordination Complexes. *Acta Cryst B* **2022**, *78* (3), 520–536. <https://doi.org/10.1107/S2052520622003912>.
- (58) Sanchez Montilva, O. C.; Movilla, F.; Rodriguez, M. G.; Di Salvo, F. Synthesis, Crystal Structure and Study of the Crystal Packing in the Complex Bis(4-Aminopyridine- κ N^1)Dichloridocobalt(II). *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2017**, *73* (5), 399–406. <https://doi.org/10.1107/S2053229617004880>.
- (59) Turner, M. J.; Thomas, S. P.; Shi, M. W.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. Energy Frameworks: Insights into Interaction Anisotropy and the Mechanical Properties of Molecular Crystals. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3735–3738. <https://doi.org/10.1039/C4CC09074H>.
- (60) Spackman, P. R.; Turner, M. J.; McKinnon, J. J.; Wolff, S. K.; Grimwood, D. J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. CrystalExplorer: A Program for Hirshfeld Surface Analysis, Visualization and Quantitative Analysis of Molecular Crystals. *J Appl Cryst* **2021**, *54* (3), 1006–1011. <https://doi.org/10.1107/S1600576721002910>.
- (61) *Chemcraft - graphical software for visualization of quantum chemistry computations*. <https://www.chemcraftprog.com> (accessed 2021-04-21).
- (62) Sharipov, A. S.; Loukhovitski, B. I.; Tsai, C.-J.; Starik, A. M. Theoretical Evaluation of Diffusion Coefficients of (Al₂O₃)_n Clusters in Different Bath Gases. *Eur. Phys. J. D* **2014**, *68* (4), 99. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2014-40831-2>.
- (63) Damasceno, P. F.; Engel, M.; Glotzer, S. C. Predictive Self-Assembly of Polyhedra into Complex Structures. *Science* **2012**, *337* (6093), 453–457. <https://doi.org/10.1126/science.1220869>.
- (64) Shew, C.-Y.; Yoshikawa, K. Crowding Effect on the Alignment of Rod Molecules Confined in a Spherical Cavity. *Chemical Physics Letters* **2023**, *819*, 140437. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2023.140437>.
- (65) Cheng, Z.; Chaikin, P. M.; Russel, W. B.; Meyer, W. V.; Zhu, J.; Rogers, R. B.; Ottewill, R. H. Phase Diagram of Hard Spheres. *Materials & Design* **2001**, *22* (7), 529–534. [https://doi.org/10.1016/S0261-3069\(01\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0261-3069(01)00015-2).

- (66) Holliday, B. J.; Mirkin, C. A. Strategies for the Construction of Supramolecular Compounds through Coordination Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2022–2043. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2022::AID-ANIE2022>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2022::AID-ANIE2022>3.0.CO;2-D).
- (67) Zhao, D.; Timmons, D. J.; Yuan, D.; Zhou, H.-C. Tuning the Topology and Functionality of Metal–Organic Frameworks by Ligand Design. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (2), 123–133. <https://doi.org/10.1021/ar100112y>.
- (68) Ghasempour, H.; Wang, K.-Y.; Powell, J. A.; ZareKarizi, F.; Lv, X.-L.; Morsali, A.; Zhou, H.-C. Metal–Organic Frameworks Based on Multicarboxylate Linkers. *Coordination Chemistry Reviews* **2021**, *426*, 213542. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213542>.

"Mas toda roca, planta, o creatura, viva está; tiene alma, es un Ser"

F.

Capítulo III

Química configuracional y supramolecular y fenómenos de autoensamblado de pequeñas moléculas derivadas de aminoácidos

ÍNDICE DEL CAPÍTULO III

Introducción	97
Resultados y discusiones.....	102
Derivados de aminoácidos como estrategia de modulación de las propiedades moleculares y de autoensamblado	102
Caracterización estructural en estado sólido	104
Estructuras resueltas a partir de experimentos de Difracción de Rayos X (DRX)	104
La inversión de quiralidad en aminoácidos y sus derivados .	117
Conformaciones y factor de forma.....	120
Generalidades	120
Determinación del factor de forma de los derivados de aminoácido en distintas estructuras cristalinas.....	121
Mecanismos de precipitación y su relación con las propiedades del material obtenido	125
Mecanismos de descomposición de sistemas homogéneos.	125
Caracterización del mecanismo de ensamblado y precipitación	127
Química en solución	132
Dímeros, confórmeros y agregados.....	132
Estudios mediante espectroscopía electrónica.....	138
Estudios mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear	144
Simulación computacional para el estudio conformacional en solución	149
Materiales autoensamblados: Mesocristales y organogeles.....	160
Materiales cristalinos	160
Organogeles supramoleculares	165
Conclusiones y Perspectivas	178
Experimental.....	182
Instrumentación	182
Síntesis de los compuestos	184
Caracterización	185
Síntesis de los materiales mesoestructurados	193

Información Suplementaria del Capítulo III.....	194
Apéndice	210
Publicaciones y presentaciones en eventos científicos de los resultados de este capítulo	219
Bibliografía.....	221

Introducción

El autoensamblado molecular es el proceso a través del cual un grupo de estructuras precursoras se ordena espontáneamente para conformar arquitecturas supramoleculares bien definidas. En la gran mayoría de los casos estas estructuras se desarrollan a través de la formación de enlaces no-covalentes.¹ Para poder tener un control estricto de la arquitectura generada a través de este proceso y, por lo tanto, de las propiedades del sistema resultante, es necesario realizar un diseño racional de sus bloques de construcción. Esto garantizará la presencia de grupos funcionales específicos que permitan formar enlaces no covalentes con la intensidad y geometría deseada.

El proceso de autoensamblado molecular es ampliamente utilizado por la naturaleza para crear estructuras funcionales complejas a partir de bloques de construcción simples como aminoácidos, péptidos pequeños, ácidos nucleicos y fosfolípidos.^{2,3} En los últimos años, la química supramolecular y los procesos de autoensamblado de ciertas proteínas y péptidos han cobrado gran relevancia debido a las investigaciones que estudian su vínculo con la formación de fibras amiloides. Se ha demostrado que estas entidades supramoleculares están directamente relacionadas con varias patologías degenerativas entre las que se incluyen la enfermedad la Alzheimer, el mal de Parkinson y la diabetes tipo II.⁴⁻⁶ Por otro lado, recientemente se ha podido observar que especies químicas tan pequeñas como algunos metabolitos y aminoácidos aislados, como la L-Fenilalanina, la L-Tirosina o el Aspartamo, son capaces de formar agregados de aspecto filamentoso con una citotoxicidad y propiedades físicas y químicas muy similares a las usualmente asignadas para las estructuras amiloides.⁷⁻⁹

Por otro lado, gracias a su capacidad para autoensamblarse bajo ciertas condiciones, los aminoácidos han sido ampliamente investigados como potenciales candidatos para el desarrollo de nuevos materiales biológicos o bioinspirados.¹⁰ Debido a que existen varias rutas sintéticas relativamente sencillas y no tan costosas para derivatizar un aminoácido con el fin de incorporar diversos arreglos estructurales a su esqueleto, los derivados de estas moléculas también se proponen como una alternativa interesante a la hora de diseñar nuevos bloques de construcción para el desarrollo de sistemas con propiedades específicas. Los derivados de aminoácido ofrecen una oportunidad única de estudiar el impacto que produce alterar de manera controlada ciertas características específicas mientras que otras se mantienen conservadas, gracias a la gran diversidad que existe actualmente de aminoácidos, agentes de derivatización y posibles reacciones.¹¹⁻¹⁴

Desde el punto de vista estructural, la L-Fenilalanina y la L-Tirosina se encuentran íntimamente emparentadas, debido a que se diferencian únicamente en la presencia de un grupo —OH en la posición *para* del anillo aromático. No obstante, las propiedades supramoleculares exhibidas por ambas moléculas son sorprendentemente diferentes. A modo de ejemplo, se ha observado que el mecanismo de formación de estructuras del tipo filamentosas para ambas moléculas es distinto. Esto es debido a que el desarrollo de las interacciones intermoleculares principales a través a los grupos —NH₃⁺ y —COO⁻ están fuertemente influenciadas por la presencia del grupo fenol.¹⁵ Otra de las principales diferencias experimentales observadas para ambas moléculas es la abrupta y “anti-intuitiva” diferencia de solubilidad. Aunque la L-Tirosina es más polar y cuenta con un grupo donor y acceptor de puentes de hidrógeno que debería favorecer su disolución en agua, es casi sesenta y cinco veces menos soluble que la L-Fenilalanina.¹⁶ Una discusión en detalle de los orígenes de esta diferencia y cómo se puede entender en términos de la

química supramolecular y conformacional de estas sustancias será dado a lo largo de este capítulo y en el Capítulo V.

En los aminoácidos y sus derivados, la presencia del grupo amino/amonio y el grupo carboxílico resulta fundamental para la química supramolecular debido a que estos grupos confieren la capacidad de formar interacciones electroestáticas fuertes y de largo alcance entre los bloques de construcción de un sistema.¹⁷⁻¹⁹ Adicionalmente a la presencia de estas interacciones electroestáticas, se suman las interacciones no covalentes que pueden desarrollarse gracias a los residuos específicos presentes en cada aminoácido, junto con las que puedan ser introducidas a través de la derivatización. El resultado final es un conjunto amplio y variado de regiones de interacción supramolecular que le confiere a la molécula una excelente capacidad de interactuar con su entorno. Gracias a esta particular diversidad estructural, estos compuestos han demostrado una gran capacidad de formar distintos tipos de estructuras ordenadas de diversas jerarquías, yendo desde los monocrstales a los mesocristales, a través del control riguroso de las condiciones de cristalización.^{20,21} Los mesocristales son estructuras macroscópicas ordenadas constituidas por pequeños cristales de tamaño nanoscópico (Figura 1). Este tipo de materiales sólidos se generan a partir de nanopartículas que, en analogía a lo que sucede para átomos, iones o moléculas en las vías clásicas de cristalización, se auto ensamblan y ordenan para dar como resultado agregados cristalinos de diversa morfología y dimensionalidad.²² La cristalinidad intrínseca a los bloques de construcción de estos materiales, junto con su naturaleza porosa, los vuelve particularmente atractivos para su uso en diversas aplicaciones tecnológicas como la fotocatálisis, el almacenamiento de energías, el censado de gases y la entrega controlada de ingredientes farmacológicos activos.^{23,24}

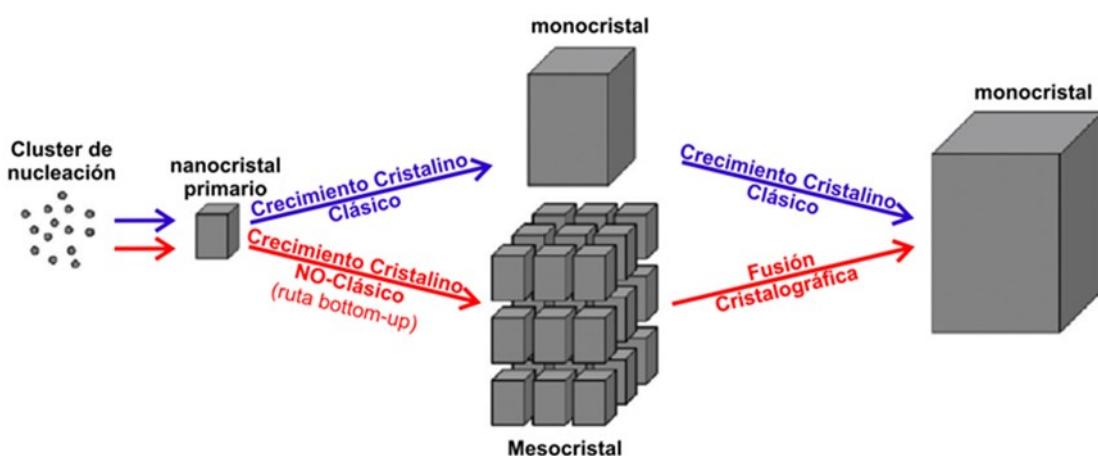


Figura 1. (A) Diagrama ilustrativo de la ruta de cristalización clásica (ruta azul) vía adición de bloques de construcción atómico-moleculares *versus* la formación de un monocrystal a través de un mesocrystal compuesto por nanopartículas como intermediario (ruta roja). Imagen adaptada del trabajo de Zhou y O'Brien.²⁵

Otros materiales cuya formación depende de los fenómenos de autoensamblado son los geles supramoleculares, también conocidos como geles físicos.²⁶ Estos están formados estrictamente por interacciones no-covalentes que se desarrollan tanto entre las moléculas gelantes como entre estas y la fase fluida que las contiene (Figura 2). La formación de este tipo de materiales se basa en la inmovilización de una fase líquida en una red supramolecular generada por las moléculas del gelante. Dependiendo de la identidad del solvente inmovilizado, los geles supramoleculares pueden categorizarse

como hidrogeles u organogeles. Gracias a su reversibilidad intrínseca y su naturaleza responsiva, este tipo de materiales blandos han mostrado diversas aplicaciones en varios campos de la ciencia como son las ciencias de la salud,²⁷⁻²⁹ los estudios medioambientales,³⁰ y la ciencia de los materiales.³¹⁻³³

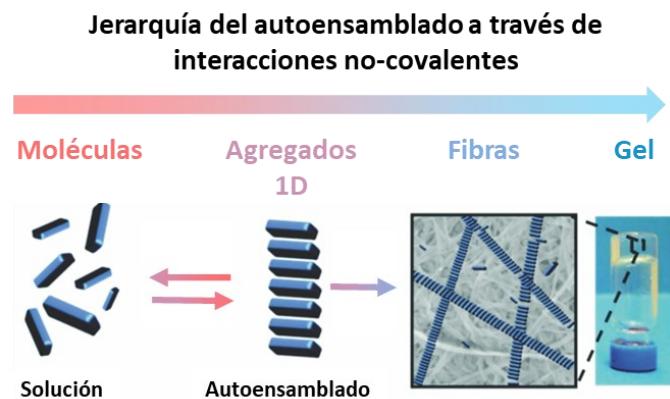


Figura 2. Esquema general del autoensamblaje de bloques de construcción de bajo peso molecular para dar lugar a un gel supramolecular

Es importante notar que tanto el desarrollo de una red tridimensional de interacciones no covalentes que sea capaz de inmovilizar un solvente, como el autoensamblado de bloques de construcción para dar lugar a la formación de material cristalino, son procesos gobernados principalmente por la química supramolecular de las moléculas involucradas. Por lo tanto, existe un balance muy delicado entre la estructura molecular y las condiciones experimentales que incita a una sustancia a comportarse como gelante o como bloque de construcción para dar lugar a la formación de una superestructura supramolecular ordenada.

La L-Fenilalanina y sus derivados están entre los sistemas más prometedores cuando se trata de diseñar nanomateriales autoensamblados innovadores.³⁴ Las potenciales modificaciones que pueden realizarse tanto sobre el grupo carboxilato como sobre el grupo amina permitieron desarrollar un vasto número de sustancias gelantes de bajo peso molecular que han sido utilizadas para diversas aplicaciones.³⁵ Sorprendentemente, aunque en la bibliografía actual se encuentran reportados un gran número de derivados de L-Fenilalanina empleando una reacción de formación de amidas sobre el grupo amino, son extremadamente escasos los derivados sintetizados a partir de la formación del grupo amina secundaria. En un claro contraste, al estudiar qué sucede para la L-Tirosina y sus derivados, encontramos que se han reportado muy pocos casos de sistemas supramoleculares construidos a partir de estos y ninguno de ellos se corresponde con un hidrogel.³⁶

Inspirados en las capacidades de autoensamblado tan particulares de estos aminoácidos, y considerando que estas pueden ser alteradas de manera controlada a través de derivatizaciones que modifiquen y expandan su química supramolecular, uno de los objetivos de este trabajo de tesis es la síntesis de nuevas moléculas quirales partiendo de L-Fenilalanina y L-Tirosina empleando aldehídos aromáticos de relevancia biológica como el benzaldehído, el piperonal, el 2-naftaldehído y la vainillina mediante la derivatización del grupo amino (Figura 8 y Figura 9 del Capítulo I). Durante este capítulo se desarrollará la

caracterización de los procesos de autoensamblado de esta familia de compuestos en diferentes solventes y bajo distintas condiciones experimentales, los cuales dieron lugar a la obtención de materiales tan diversos como monocrstales, mesocristales y geles. Cada uno de estos materiales fue estudiado de forma exhaustiva con el fin de comprender el rol de la química supramolecular y los distintos grupos funcionales en su obtención. Basados en estos resultados se propuso un modelo que describe la arquitectura de los agregados que actúan como bloque de construcción de estos materiales. Este modelo se construyó considerando los datos estructurales extraídos de los experimentos de difracción de rayos X, cálculos de optimización geométrica por DFT, los resultados de las espectroscopías realizadas a tiempo resuelto y temperatura variable, y una extrapolación de los resultados reportados en bibliografía para los aminoácidos independientes. Finalmente, y a modo de prueba de concepto, para aquellos sistemas que se observó una respuesta satisfactoria frente a la gelificación se verificó la capacidad de gelificar muestras complejas en vistas a potenciales aplicaciones, como crudo de petróleo. Estos materiales presentaron una excelente estabilidad y reversibilidad térmica, y permitieron mostrar el potencial que tienen estas pequeñas moléculas para desarrollar materiales supramoleculares con un claro interés tecnológico.

Resultados y discusiones

Derivados de aminoácidos como estrategia de modulación de las propiedades moleculares y de autoensamblado

Como se presentó en la introducción, teniendo en cuenta el papel protagónico que tienen los residuos aminoacídicos en la construcción de las arquitecturas supramoleculares que se observan en algunos materiales autoensamblados, se decidió sintetizar dos nuevas familias de derivados de la L-Fenilalanina (**1**) y la L-Tirosina (**2**). Para esto se empleó una reacción de formación de base de Schiff con una posterior reducción selectiva para generar aminoácidos derivatizados con aldehídos de relevancia biológica, que conservaran tanto su quiralidad como su grupo funcional amino. Una de las principales motivaciones para emplear esta ruta de síntesis fue conservar intactos los grupos amino y ácido carboxílico, debido a que estos no solamente confieren la capacidad de establecer interacciones electroestáticas de largo alcance esenciales para motorizar el autoensamblado si no que, además, brindan la capacidad de responder a los cambios de acidez del entorno.

Respecto a los aldehídos, se eligieron moléculas aromáticas y, entre la amplia variedad que existe, se puso el foco en seleccionar aquellos que sean comúnmente utilizados como agentes saborizantes, o tengan un rol industrial significativo, y sean accesibles comercialmente. En el Capítulo V se discutirá un aspecto relevante en relación con el aspecto alimenticio de los derivados de estas sustancias. En total se emplearon los siguientes 4 aldehídos: Benzaldehído (**a**), 2-Naftaldehído (**d**), Piperonal (**e**), y Vainillina (**f**), los cuales dieron lugar a los correspondientes derivados de L-Fenilalanina **1.a**, **1.d-1.f** y de la L-Tirosina **2.a**, **2.d-2.f** (Figura 1). Los derivados **1.b**, **1.c**, **2.b** y **2.c** son estudiados en detalle en el Capítulo IV. El 2-Naftaldehido fue seleccionado para evaluar el impacto que tiene en las propiedades supramoleculares y conformacionales al aumentar el volumen y la extensión del bloque aromático. Los detalles de las síntesis y la caracterización espectroscópica completa de todos los compuestos se encuentran descrita en la sección experimental y la información suplementaria de este capítulo.

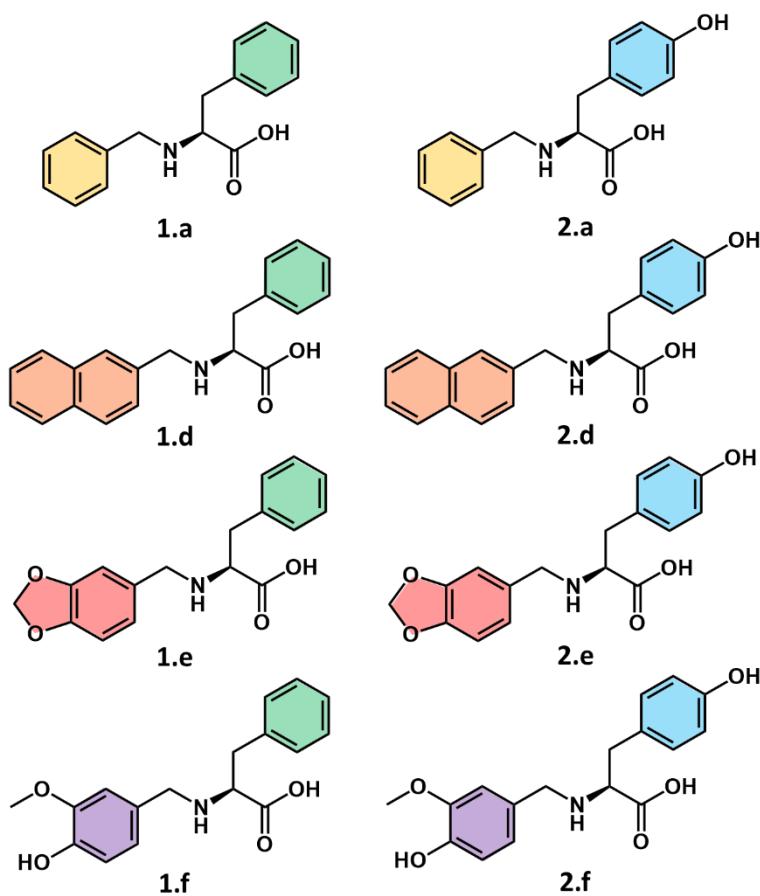


Figura 1. Estructuras moleculares de las sustancias sintetizadas durante este capítulo

Se estima que todos estos compuestos presentan un comportamiento ácido–base anfótero, con un punto isoeléctrico muy cercano al de su correspondiente aminoácido precursor. Debido a la baja solubilidad en agua cerca de las regiones de estabilidad del estado switeriónico, el punto isoeléctrico no es simple de identificar. Sin embargo, se ha hecho uso de esta región de estabilidad del switerión y su baja solubilidad para aislar y purificar estos compuestos. Debido a que el último paso de la síntesis empleada para la obtención de estos compuestos es la precipitación en un medio moderadamente ácido ($\text{pH} \approx 4-5$), el estado de carga con el que son aislados de las aguas madres corresponde al estado switeriónico. Asimismo, durante la purificación de los compuestos se emplearon solventes de distinta polaridad, pero con un carácter ácido-base casi nulo. Por este motivo los compuestos precipitan como switeriones y no como sales. Sin embargo, por una cuestión de comodidad, el estado de carga explícito (switeriónico o aniónico) será representado en las imágenes únicamente en los casos en que este sea esencial para la discusión de los resultados. En el resto de los casos, cuando la estructura molecular sea presentada únicamente a modo ilustrativo en una figura, esta se mostrará sin carga para facilitar la lectura.

Caracterización estructural en estado sólido

Estructuras resueltas a partir de experimentos de Difracción de Rayos X (DRX)

Con el fin de acceder a información sobre la química supramolecular de los compuestos sintetizados, al menos en estado sólido cristalino, se llevaron a cabo diferentes estrategias de cristalización (Capítulo II). Como resultado se obtuvieron monocrstales aptos para llevar a cabo experimentos de DRX, los cuales permitieron determinar las estructuras cristalinas de varios de los compuestos sintetizados. En el caso de **1.d, 1.f, 2.a, 2.e y 2.f** las estructuras se encuentran con estado de carga dipolar o switeriónico. Mientras que, para **1.a y 1.e**, se obtuvieron las sales de cloruro de las especies protonadas sobre el grupo amino, conservando el grupo ácido. Para **1.d, y 2.a**, además del switerión, también pudieron obtenerse las sales de cloruro, y en el caso puntual de **1.d**, también la sal de sodio correspondiente al estado aniónico del derivado. Una particularidad para destacar es que la sal de cloruro de **1.d** co-cristaliza con una molécula de ácido acético. En el capítulo V se discutirá un aspecto importante de este resultado. Gracias a esto se pudo realizar una comparación parcial del rol que cumple el estado de carga y el contraión en la química supramolecular de estos compuestos (Figura 2-Figura 11).

Un análisis global de las 10 estructuras cristalinas permite observar que todas ellas, sin importar si se desarrollan a través del ensamble de especies switeriónicas o de cationes y aniones, están estabilizadas principalmente a través de interacciones electroestáticas del tipo $-NH_2^+ \cdots Cl^-$ o $-NH_2^+ \cdots ^-OOC$. Estas interacciones, al ser isotrópicas y de muy largo alcance, son las responsables de la fuerte atracción establecida entre los bloques de construcción, pero no alcanzan para describir el detalle la orientación ni el sentido de las distintas especies en cada empaquetamiento.

Si estudiamos en detenimientos las estructuras desarrolladas por los derivados de la L-Fenilalanina, (Figura 2 a Figura 7) podemos observar que en casi todas ellas, a excepción de la sal de sodio del compuesto **1.d** (Figura 5), la estructura molecular del derivado se encuentra parcial o totalmente desplegada, maximizando el factor de forma y favoreciendo un empaquetamiento denso que minimiza la distancia entre los grupos cargados (ver próximo apartado). No obstante, para el caso de la sal de sodio del compuesto **1.d**, la estructura molecular adquiere una conformación plegada sobre si misma que permite exponer de manera eficaz el centro aminoacídico, disminuyendo la congestión estérica alrededor de este y maximizando la cantidad de interacciones puente de hidrógeno que pueden desarrollarse con las aguas de coordinación del catión metálico.

Si extendemos el análisis de las estructuras en el espacio, podemos notar cómo se desarrolla una red de interacciones electroestáticas, asistidas por interacciones puente de hidrógeno entre los hidrógenos del grupo amino y los aniones. Como resultado se obtiene la formación de una estructura bidimensional extendida en forma de plano, el cual denominaremos “plano electroestático”. Este arreglo se detalla a través de las interacciones de color rosa en las estructuras extendidas mostradas en cada figura.

La presencia de estas regiones de interacción intensa queda claramente reflejada al estudiar la superficie de Hirshfeld coloreada empleando la distancia normalizada de

todas estas estructuras. En estas se observa la formación de “lunares rojizos” que indican la presencia de interacciones fuertes. El hecho de que estas interacciones se observen casi exclusivamente en la región media de la molécula y no en sus extremos es un indicio claro de la anisotropía de interacción de esta familia de moléculas.

La adquisición de una conformación desplegada por parte de la molécula no solamente favorece el desarrollo de un plano electroestático extendido, sino que también, propicia la interacción entre los residuos laterales que quedan alojados por encima y por debajo del plano. Esta interacción no es únicamente entre las moléculas que conforman el propio plano, ya que también se observa una interacción dispersiva o dipolar con los residuos laterales de moléculas en planos por encima o por debajo. Estas regiones se resaltan en celeste en las figuras y serán discutidas en profundidad en el capítulo V, en términos de su parentesco estructural con el empaquetamiento observado para distintas estructuras amilogénicas.

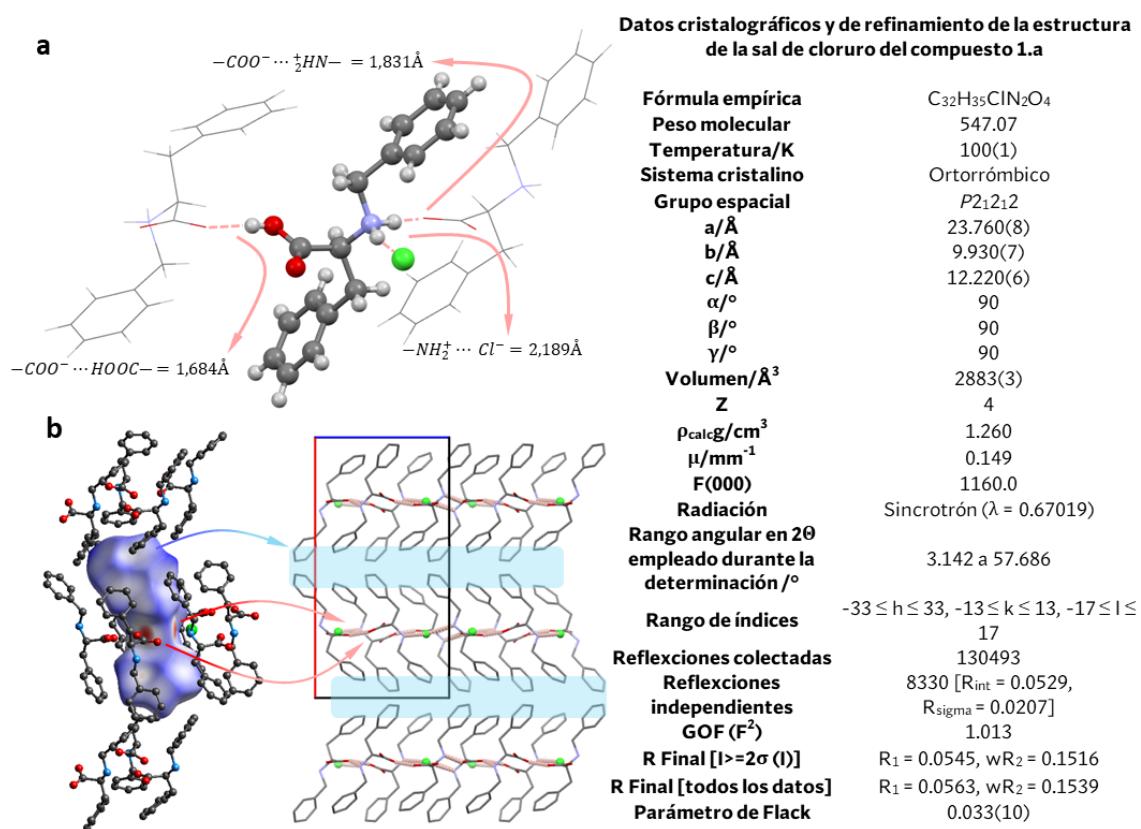


Figura 2. Estructura cristalina de la sal de cloruro del compuesto 1.a. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de la sal de cloruro de 1.a. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

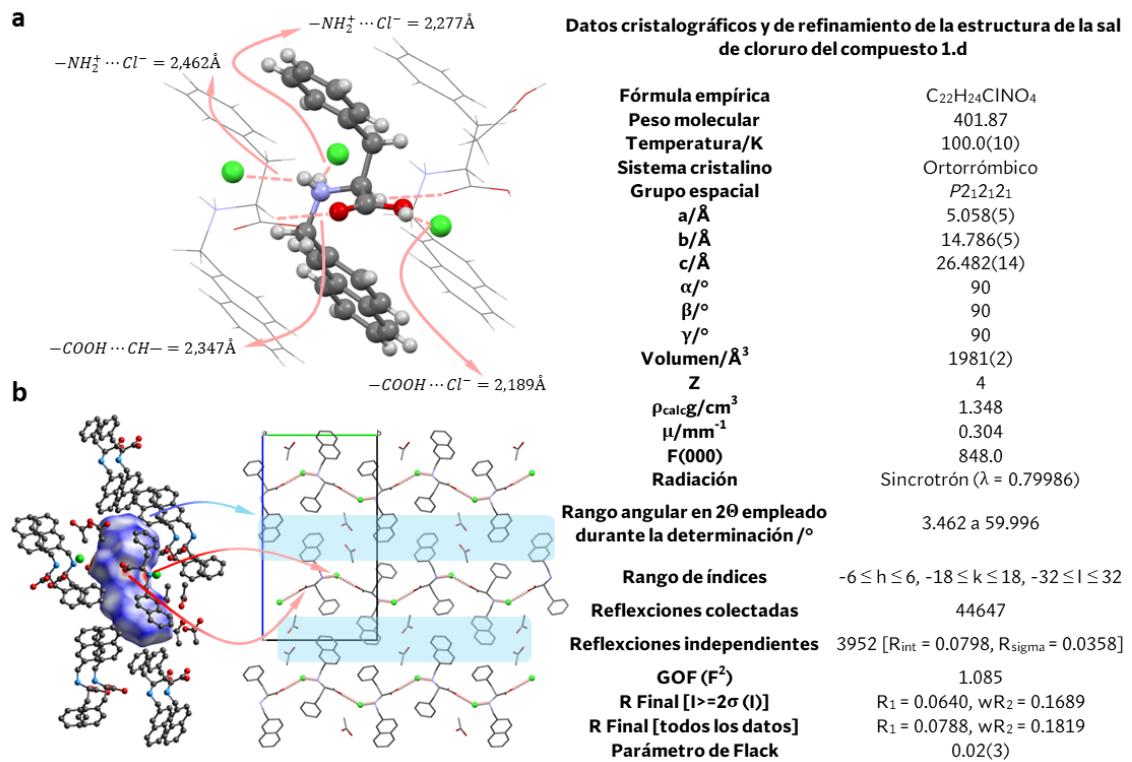


Figura 3. Estructura cristalina de la sal de cloruro del compuesto **1.d** co-cristalizada con una molécula de ácido acético. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de la sal de cloruro de **1.d**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

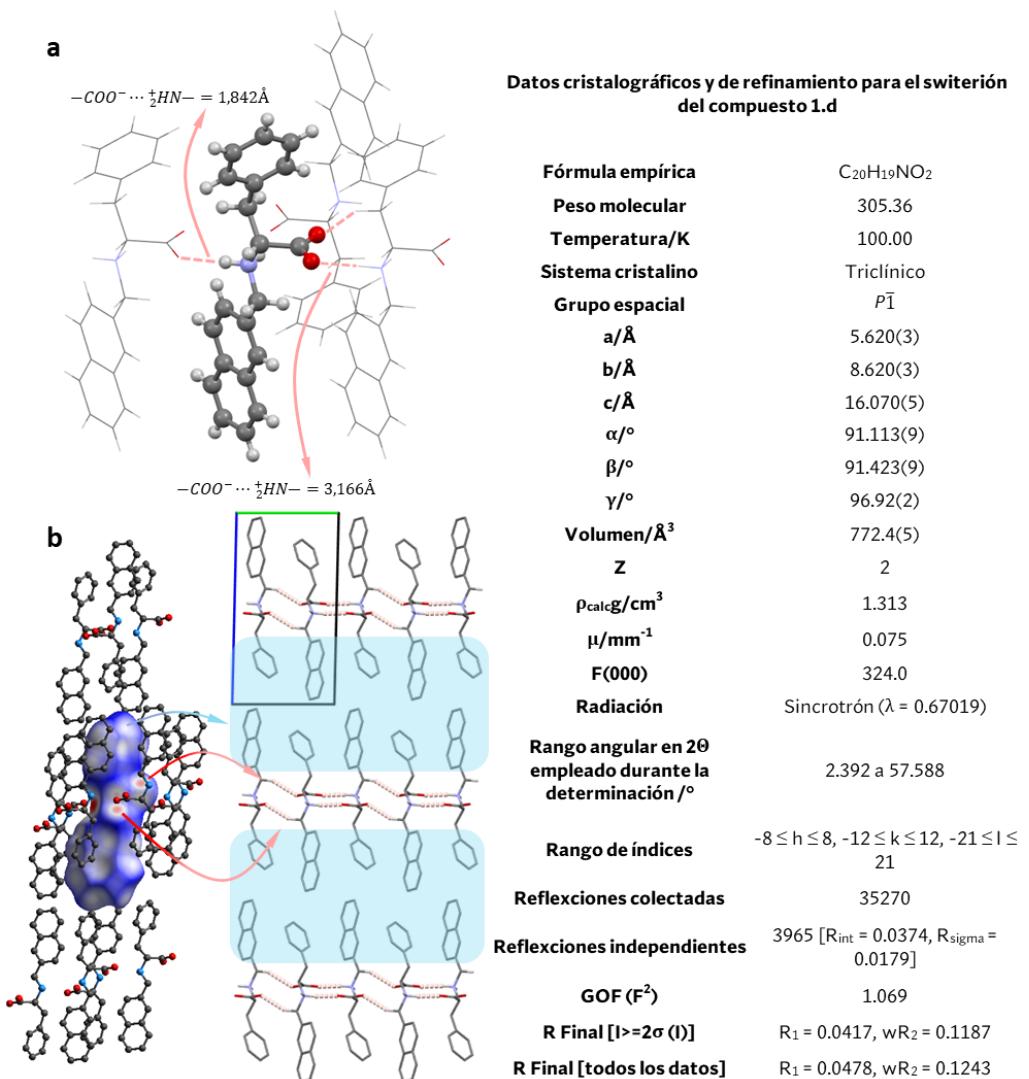


Figura 4. Estructura cristalina del switerión del compuesto **1.d**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de **1.d**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

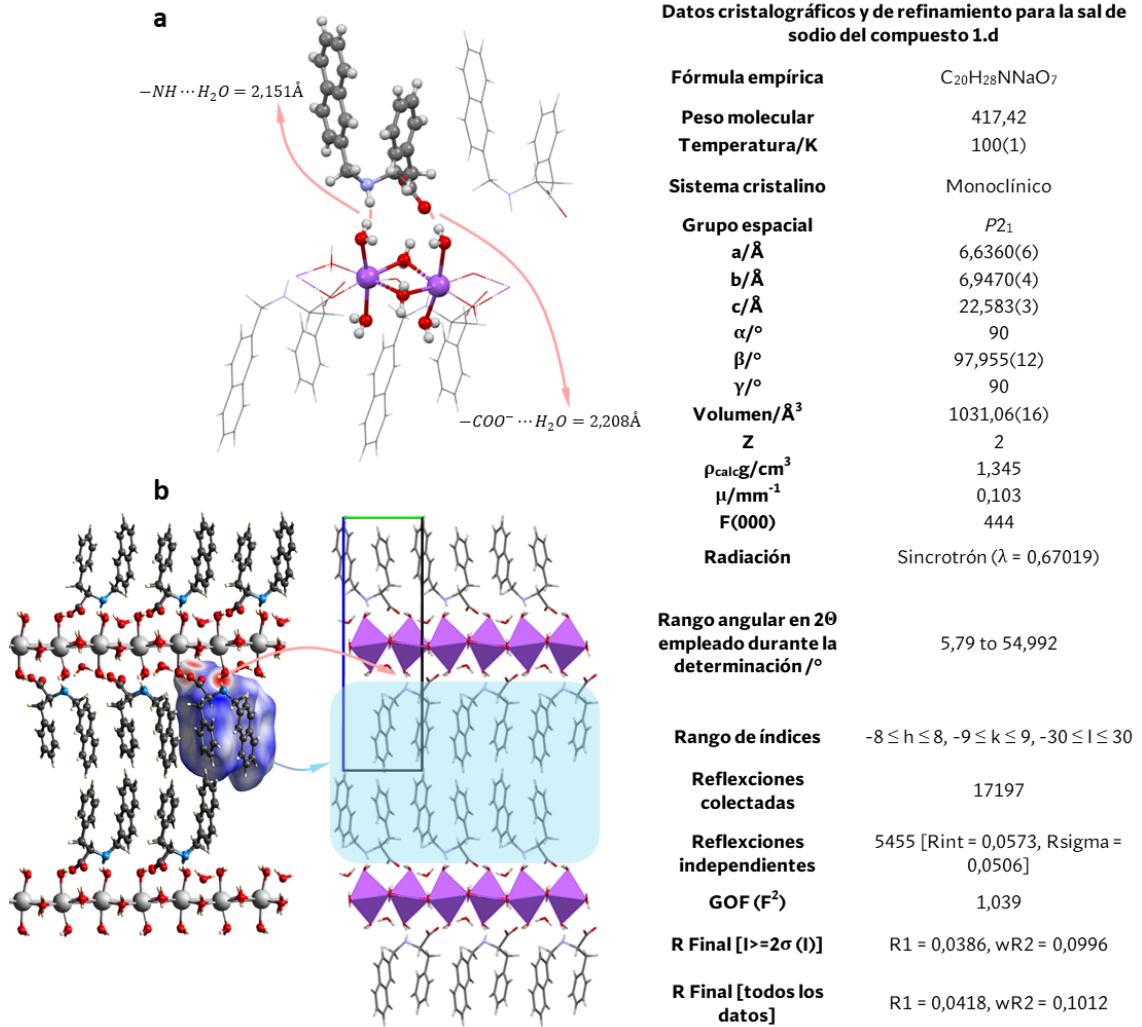


Figura 5. Estructura cristalina de la sal de sodio del compuesto **1.d**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de la sal de cloruro de **1.d**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

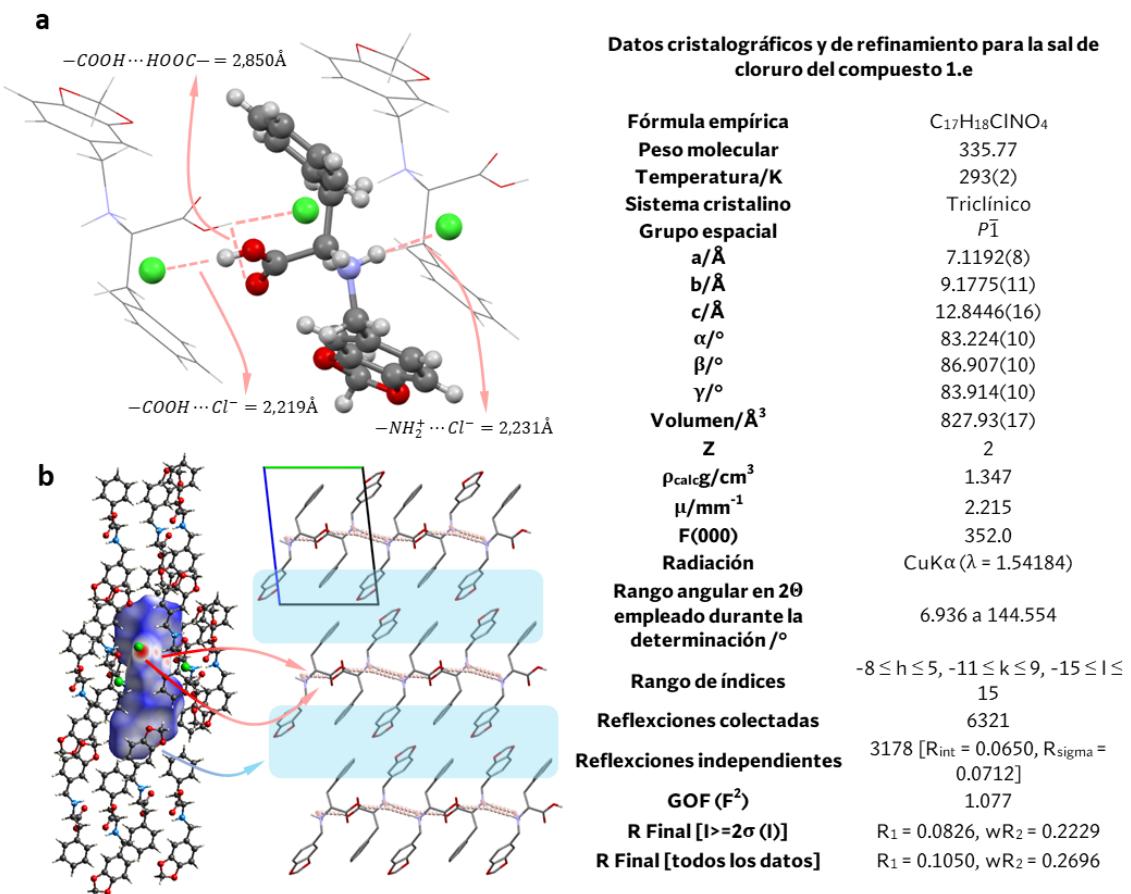


Figura 6. Estructura cristalina de la sal de cloruro del compuesto 1.e. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de la sal de cloruro de 1.e. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

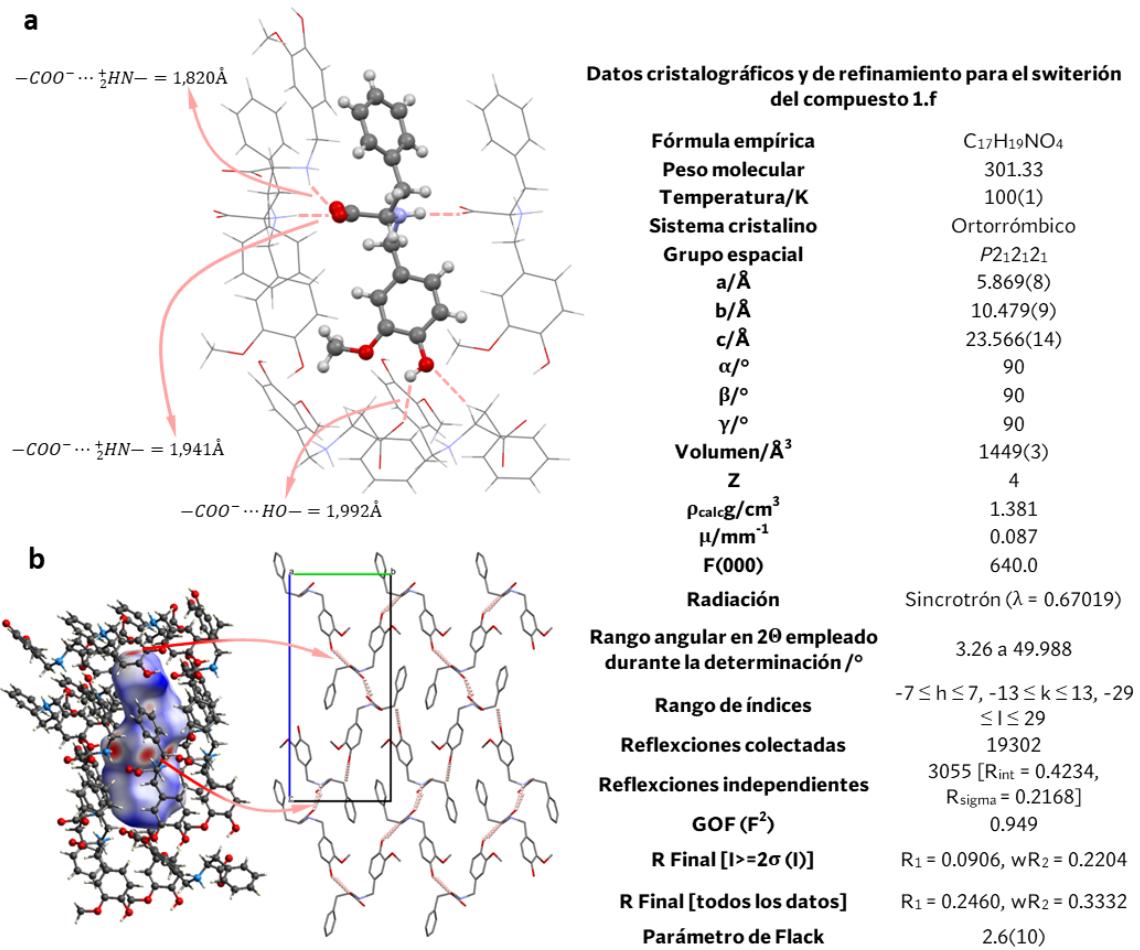


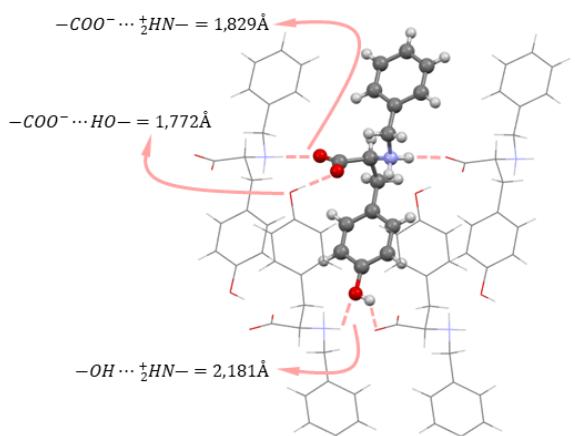
Figura 7. Estructura cristalina del switerión del compuesto **1.f**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de **1.f**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

Como se esperaba, de todas las estructuras obtenidas para los derivados de la L-Fenilalanina, el único compuesto que no dio lugar a la formación de estas regiones de interacción dispersiva o dipolar fue aquel proveniente de la derivatización con vainillina **1.f** (Figura 7). La estructura cristalina obtenida para esta sustancia dio lugar a la formación de una red extendida tridimensionalmente de interacciones de puente de hidrógeno y electroestáticas, gracias a la presencia del hidroxilo en la posición *p*- del grupo que permite extender la conectividad supramolecular y explorar una dimensionalidad perpendicular al plano electroestático (detalle en las tablas informadas en el Tabla S6). Esta distribución de interacciones se vuelve mucho más isotrópica en comparación con la de las otras sustancias de la misma familia y no permite distinguir la formación de ninguna región de interacción dispersiva en la que no esté presente una unión no-covalente mucho más intensa y direccional. La capacidad de interactuar no covalentemente a través de un hidroxilo en la posición *p*- de uno de sus residuos laterales hace que la química supramolecular de este derivado de L-Fenilalanina guarde cierta similitud con lo que se observa para los derivados de L-Tirosina. Esto implica la carencia del característico

apilamiento en planos electroestáticos y el desarrollo de una red más isotrópica de interacciones fuertes. La presencia de esta red isotrópica de interacciones fuertes tendrá consecuencias apreciables tanto en su química en solución como en las propiedades materiales de los sólidos que se generen a partir de esta especie. Ambas características se discutirán más adelante en el correspondiente apartado.

Por otro lado, al estudiar las estructuras cristalinas desarrolladas por los derivados de la L-Tirosina podemos observar que, en casi todos los casos, se generan redes tridimensionales de interacciones fuertes, tanto electroestáticas como de puentes de hidrógeno, cuya distribución es mayoritariamente isotrópica. A simple vista no se distinguen regiones de menor interacción o zonas donde prevalezcan las interacciones dispersivas o dipolares. Esta distribución isotrópica de interacciones se genera gracias a la naturaleza divergente de estos bloques de construcción. En casi todas estas redes se puede distinguir de forma clara la presencia de un bloque de construcción de carácter dimérico, constituido a través de la interacción que se desarrolla entre el carboxilato o el grupo amonio de una molécula y el hidroxilo en posición *p*- de la molécula aledaña. Este bloque de construcción es análogo al reportado para la estructura de la L-Tirosina¹⁶ y parece ser una característica típica de este tipo los derivados de esta sustancia. Más adelante se discutirá en detalle cómo la presencia o ausencia de este arreglo estructural en fase sólida podría tener un impacto directo en la química en solución y, en última instancia, en las propiedades biológicas de todas estas sustancias.

No obstante, existe un caso en particular para el cual no se observó el desarrollo de esta topología extendida de interacciones. En el caso de la estructura generada a partir del switerón de **2.a**, se observa cómo las interacciones intermoleculares están localizadas casi exclusivamente en la formación de un dímero supramolecular muy similar al que se desarrolla para la estructura de la L-Tirosina (Figura 8 y tablas informadas en el Tabla S7).¹⁶ La conformación adquirida por el switerón en esta molécula favorece la interacción entre el centro aminoacídico y el hidroxilo terminal de dos moléculas aledañas e inhibe el desarrollo de redes extendidas al poner en juego ambas interacciones en la formación de una entidad supramolecularmente convergente. A su vez, se expone su residuo lateral aromático de un modo muy similar al observado para los derivados de L-Fenilalanina. Al comparar la estructura de esta misma sustancia, pero como sal de cloruro podemos ver que la aparición de un anión agrega una nueva dimensión de interacciones al desarrollarse contactos tanto electroestáticos, con el grupo amino protonado, como anión-dipolo, con el hidroxilo terminal (Figura 9 y tablas informadas en el Tabla S8).

a
Datos cristalográficos y de refinamiento para el switerón del compuesto 2.a

Fórmula empírica	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃
Peso molecular	271.30
Temperatura/K	100(1)
Sistema cristalino	Ortorrombico
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	5.922(2)
b/Å	7.768(3)
c/Å	28.889(10)
α/°	90
β/°	90
γ/°	90
Volumen/Å³	1329.0(8)
Z	4
ρ_{calcg/cm³}	1.356
μ/mm⁻¹	0.083
F(000)	576.0
Radiación	Sincrotrón ($\lambda = 0.67019$)
Rango angular en 2θ empleado durante la determinación /°	2.658 a 49.982
Rango de índices	-7 ≤ h ≤ 7, -9 ≤ k ≤ 9, -36 ≤ l ≤ 36
Reflexiones colectadas	36171
Reflexiones independientes	2789 [$R_{int} = 0.1565$, $R_{sigma} = 0.0511$]
GOF (F^2)	1.034
R Final [$I >= 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0509$, $wR_2 = 0.1218$
R Final [todos los datos]	$R_1 = 0.0739$, $wR_2 = 0.1384$
Parámetro de Flack	0.0(10)

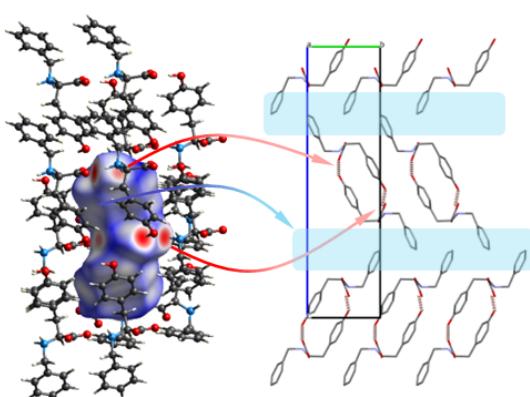
b

Figura 8. Estructura cristalina del switerón del compuesto **2.a**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de **2.a**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

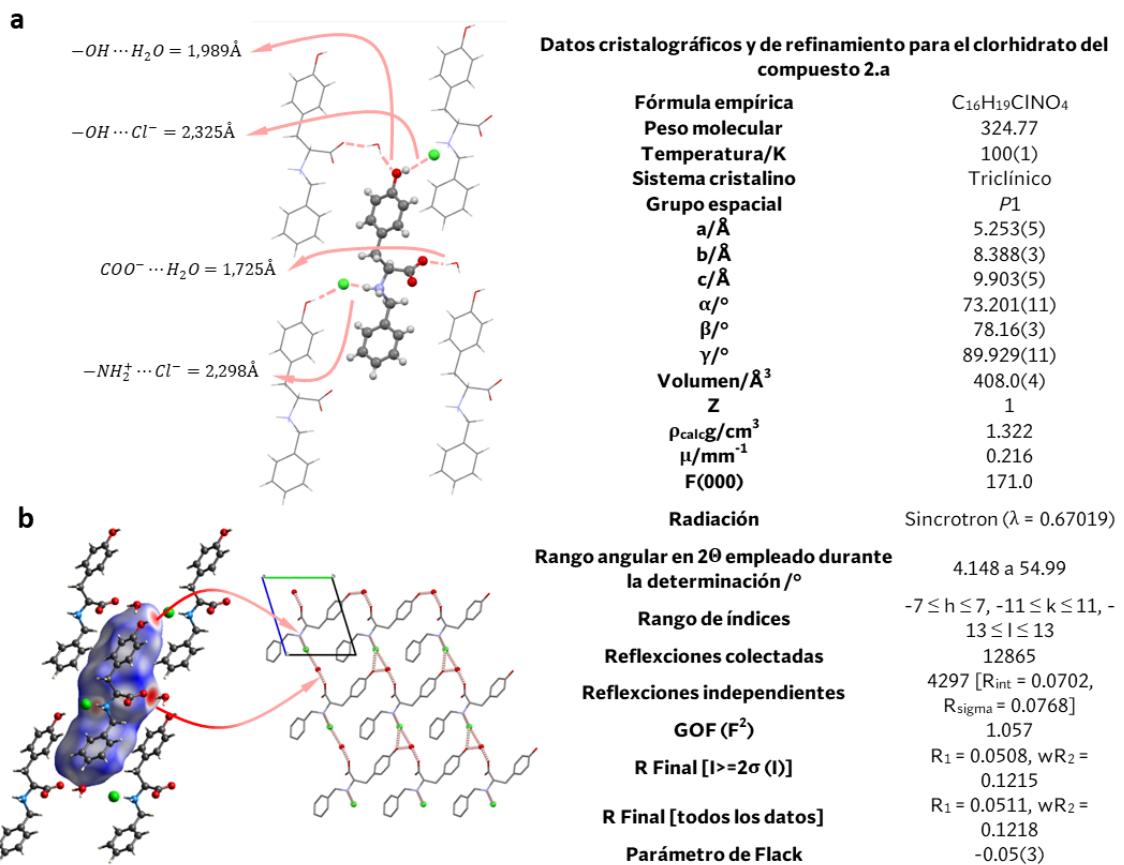


Figura 9. Estructura cristalina de la sal de cloruro del compuesto **2.a**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de la sal de cloruro de **2.a**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

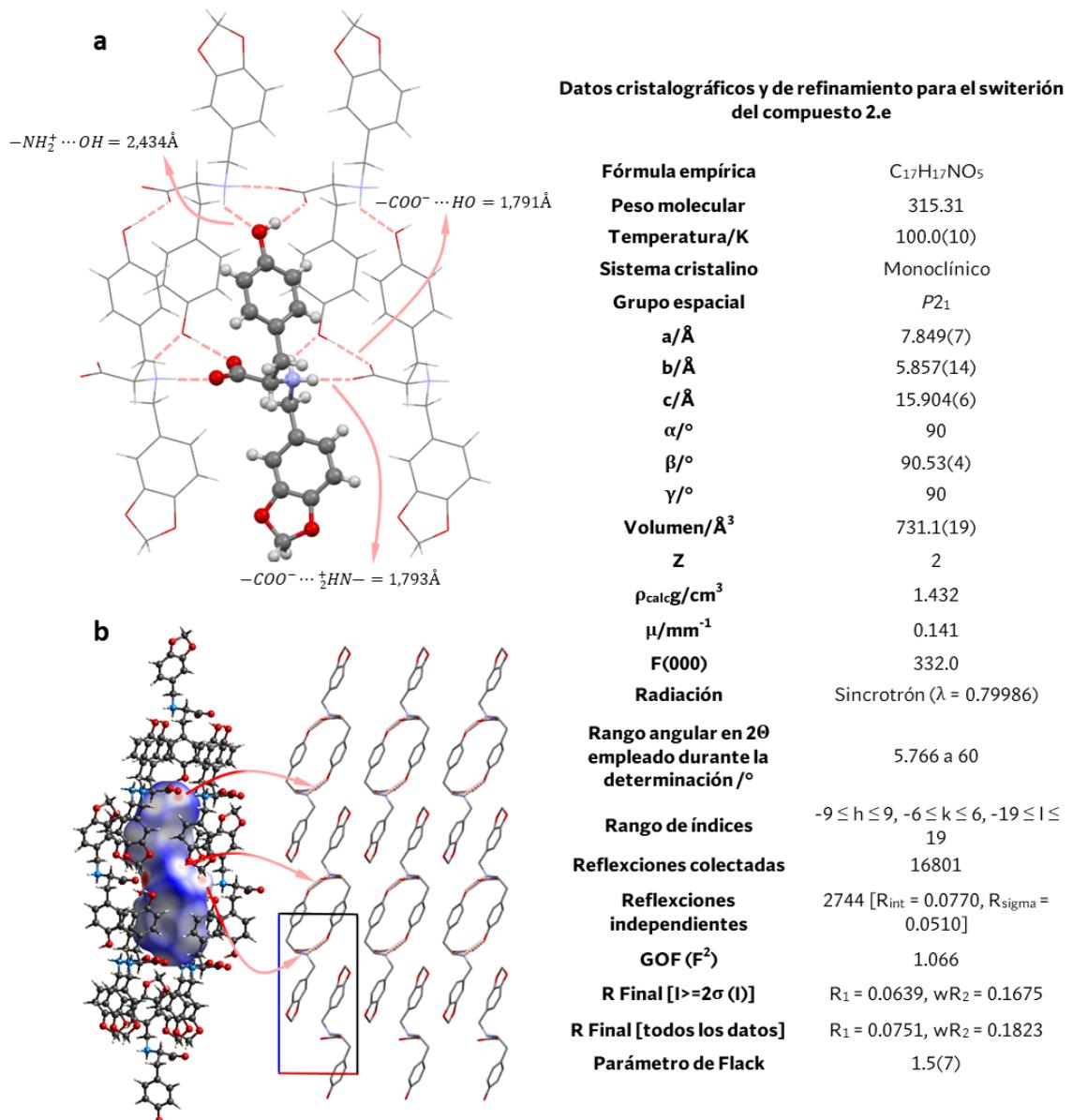


Figura 10. Estructura cristalina del switerón del compuesto 2.e. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de 2.e. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

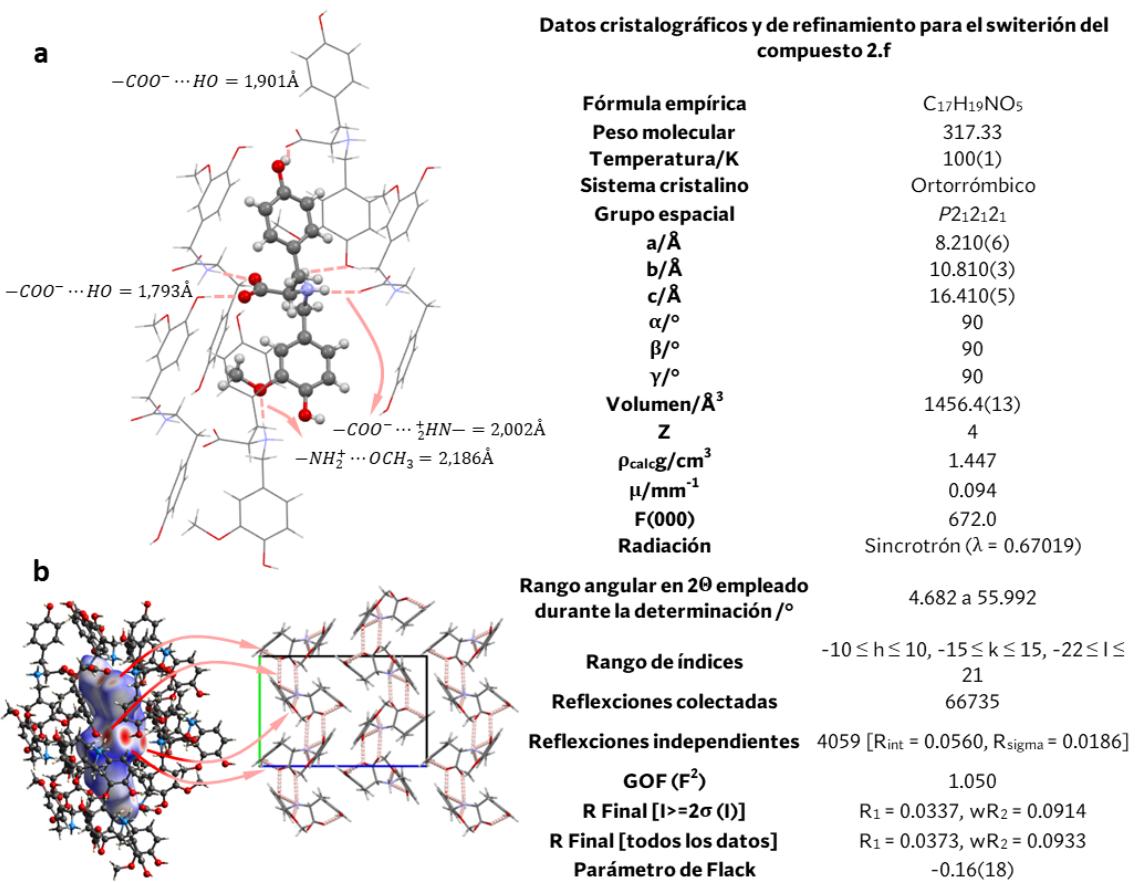


Figura 11. Estructura cristalina del switerón del compuesto **2.f**. (a) Detalle de las interacciones intermoleculares principales en la estructura. (b) Superficie de Hirshfeld coloreada en términos de d_{norm} de la estructura cristalina de **2.f**. La coloración de la superficie representa si la distancia entre átomos dentro y fuera de la superficie es mayor (azul), igual (blanco) o menor (rojo) a la distancia de contacto de Van der Waals. Con flechas coloreadas se detalla el rol de cada interacción en el empaquetamiento cristalino. A la derecha se informa la tabla de datos experimentales y de refinamiento de la estructura cristalina.

Si analizamos en detalle los grupos espaciales en los que cristaliza cada estructura podemos notar una simetría anómala para el switerón del compuesto **1.d** y la sal de cloruro del compuesto **1.e**, teniendo en cuenta que se trata de especies quirales (Figura 6 y Figura 7). Ambos sólidos cristalizan en el grupo espacial *P*1̄, el cual es aquiral. Mientras que las moléculas no quirales pueden cristalizar tanto en sólidos con grupos espaciales quirales como aquirales, una sustancia enantioméricamente pura sólo puede dar lugar a estructuras cristalinas con grupos espaciales quirales. Lo que se observa para las dos estructuras mencionadas es la existencia de dos iones distintos en la unidad asimétrica, que presentan diferente configuración absoluta. Se trata del correspondiente par enantiomérico. Considerando que la reacción empleada para la obtención de estos compuestos no altera la quiralidad, ni introduce cambios en la conectividad del carbono quiral, se espera que los productos de síntesis sean enantioméricamente puros. Los resultados obtenidos para estas estructuras cristalinas nos conducen a pensar que se produjo una inversión parcial de la quiralidad durante el proceso de cristalización. Aunque los detalles de los posibles mecanismos involucrados que podrían explicar estas inversiones de configuración se discutirán en detalle más adelante, es importante notar que ambas sustancias fueron cristalizadas en medio básico y en presencia de iones

metálicos, factores que pueden intervenir de manera catalítica. A la fecha, no se ha observado este comportamiento para los derivados de L-Tirosina siendo únicamente registrado para algunos miembros de la familia de L-Fenilalanina.

Todos los ejemplos presentados en este capítulo sirven para ilustrar que la relación entre la estructura molecular y las propiedades supramoleculares es compleja, y no puede ser pensada sólo en términos generales. Aunque es posible establecer ciertas tendencias que engloben de manera conjunta alguna propiedad en específico de las familias de derivados, considerar a estos únicamente en términos de sus precursores moleculares puede dar lugar a predicciones incorrectas. Para entender en detalle y poder predecir la química supramolecular de estos compuestos, es necesario contar con herramientas que describan tanto la libertad conformacional como la naturaleza convergente y divergente de los mismos. Los cambios introducidos a través de las derivatizaciones tienen la capacidad de alterar drásticamente la química supramolecular y dar lugar a comportamientos que van en contra, a veces, de las tendencias esperadas.

No obstante, estas modificaciones tienen un fuerte impacto en relación al desarrollo de ciertos comportamientos específicos. Un ejemplo claro se presenta en la estructura de **1.f**, donde se observó cómo introducir un fragmento molecular estructuralmente emparentado con la L-Tirosina dio lugar a un comportamiento supramolecular similar al observado para sus derivados. Esto abre la puerta a la posibilidad de pensar en el diseño racional de nuevas moléculas que puedan “imitar” ciertos mecanismos de interacción con el entorno a través de una química supramolecular bioinspirada en moléculas con una acción conocida previamente.

A modo de resumen, en la Figura 12 se presenta un esquema detallado de todos los residuos, tanto aminoacídicos como aldehídicos, presentes en estas estructuras y su rol en el desarrollo de redes extendidas. Poder discriminar los distintos fragmentos que se encuentran en una estructura molecular en base a su carácter divergente (promotor del desarrollo de redes extendidas) o convergente (inhibidor del desarrollo de redes extendidas) resultará ser una herramienta fundamental para entender los distintos resultados que se presentarán a lo largo de este capítulo de tesis. Adicionalmente, poder entender el rol que cumple cada fragmento estructural en la química supramolecular de una sustancia es uno de los pilares del diseño racional de nuevas moléculas para aplicaciones específicas.

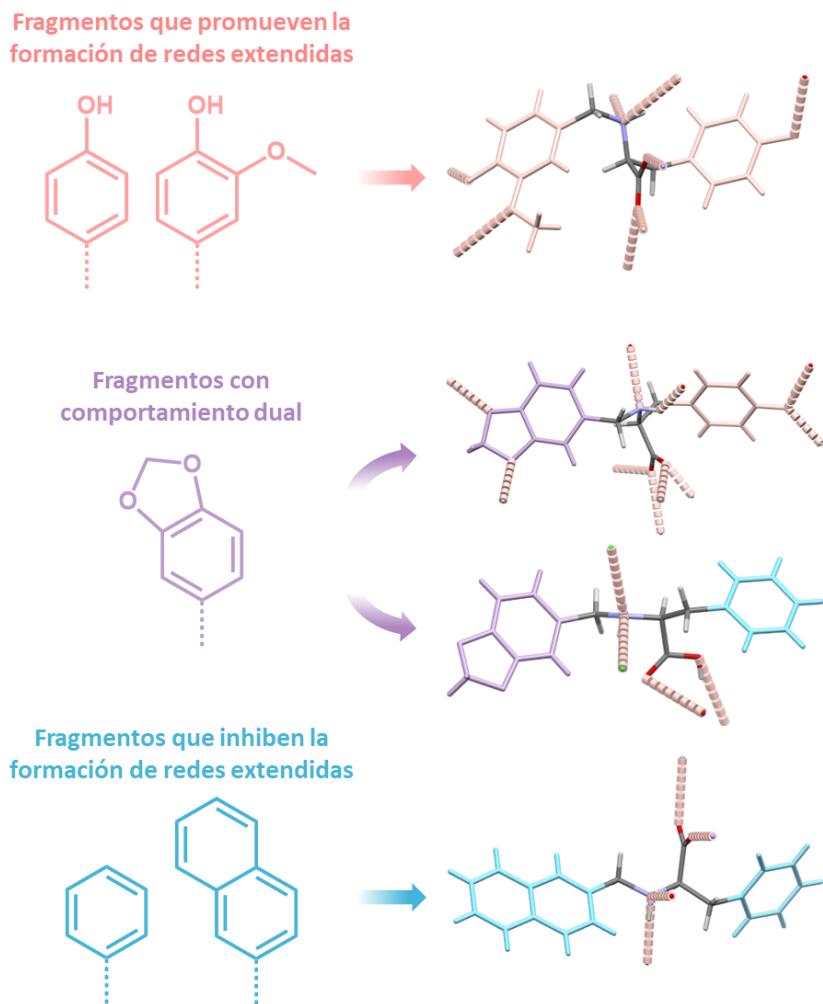


Figura 12. Esquema sintético de los distintos residuos presentes en los compuestos y su rol en el desarrollo de redes extendidas.

La inversión de quiralidad en aminoácidos y sus derivados

La quiralidad es una de las principales características de los aminoácidos naturales y ha demostrado tener un rol fundamental en las propiedades biológicas, farmacológicas y metabólicas de estos. Muchas de las propiedades terapéuticas de los derivados de aminoácido están íntimamente ligadas a la quiralidad desarrollada por estos y se ha demostrado en varias oportunidades que sutiles alteraciones pueden traer como resultado enormes e impredecibles cambios en las propiedades finales. Es por esto por lo que resulta esencial contar con un control riguroso de la quiralidad de un compuesto durante todo el proceso implicado en su desarrollo, aislamiento, purificación, caracterización y posterior almacenamiento.

Aunque la ruta sintética empleada para la obtención de compuestos derivados de aminoácido conserva la quiralidad del precursor, dado que no implica de forma directa al carbono quiral o su entorno inmediato, esta puede verse alterada *a posteriori* por reacciones que puedan desarrollarse durante la purificación o el almacenamiento. La ausencia de alteraciones estructurales luego del aislamiento y la purificación fue verificada

en todos los casos de manera sistemática empleando técnicas espectroscópicas; en particular RMN ^1H y ^{13}C . No se aplicó ninguna técnica específica para verificar la configuración de los productos resultantes.

Como se presentó anteriormente, es imposible construir una estructura cristalina quirala utilizando únicamente moléculas quirales enantioméricamente idénticas.³⁷ Esto es debido a que la quiralidad es una propiedad que no puede compensarse salvo por la formación de racematos, que son mezclas equimolares de compuestos enantioméricos. En consecuencia, la quiralidad deviene en una propiedad que se hereda desde los bloques de construcción hacia las arquitecturas de mayor jerarquía. Esto se evidencia en que solamente existen 65 grupos espaciales quirales de un total de 230 posibles grupos espaciales cristalográficos. A este subgrupo se lo conoce como los grupos de Sohncke.³⁸ Al contrario, sí es posible obtener estructuras cristalinas quirales partiendo de moléculas que carecen de asimetrías a través de la formación de agregados asimétricos.³⁹ Esta relación tan estrecha y unilateral entre la quiralidad de los bloques de construcción y la quiralidad resultante del ensamblaje supramolecular generado, es fundamental a la hora de pensar propiedades determinadas colectivamente y para las cuales la quiralidad cobra un papel determinante, como son la actividad catalítica, la citotoxicidad y hasta la biodisponibilidad.

Al analizar los grupos espaciales obtenidos para las estructuras cristalinas determinadas durante este trabajo de tesis podemos notar que, al contrario de lo esperado para cristales ensamblados a partir de precursores enantioméricamente puros, en dos casos particulares se pudo observar que estos grupos espaciales corresponden a grupos quirales. Los compuestos **1.d** y **1.e** presentaron estructuras cristalinas con el grupo espacial $P\bar{1}$, cristalizando como “racematos 50:50”. Este grupo espacial tiene como única operación puntual de simetría un centro de inversión. Esto implica que en la celda unidad coexisten los dos enantiómeros. Por lo tanto, en alguna instancia comprendida desde la síntesis hasta la formación del cristal estudiado, se habría desarrollado una inversión en la configuración estereoquímica.

Esta inversión, denominada *transenantiomerización oscilatoria*, se ha reportado en bibliografía para L-Fenilalanina y L-Tirosina, así como para otros principios activos de interés, al ser almacenados en solventes de bajo peso molecular durante largos períodos de tiempo.⁴⁰⁻⁴² En todos los casos se ha propuesto que el mecanismo implicado en la inversión de la quiralidad está mediado por la formación de un intermediario ceto-enol que se generaría como producto de la pérdida del hidrógeno asociado al carbono quiral gracias a su carácter ácido (Figura 13).

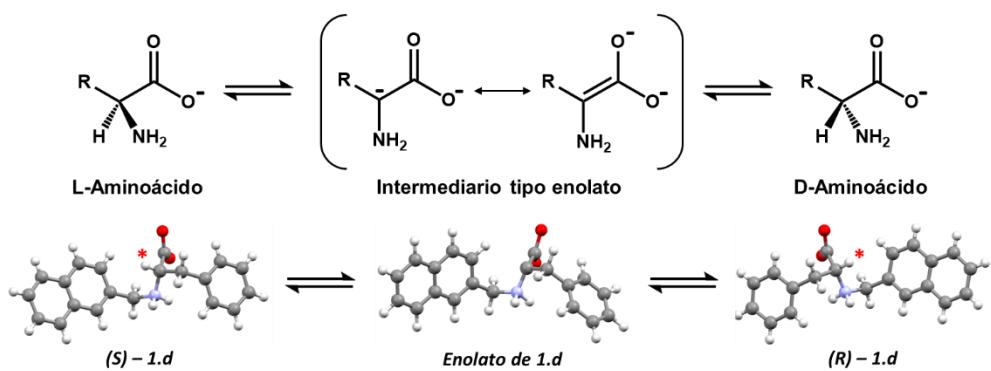


Figura 13. Mecanismo propuesto para la transenantiomerización osculatoria en aminoácidos.

Considerando que el intermediario ceto-enólico propuesto se puede generar a través de la remoción del hidrógeno quiral, de manera semejante a la actividad ácido-base, se ha propuesto que cualquier factor que altere directamente la acidez del carbono quiral, como puede ser la presencia de metales, bases fuertes o hasta la formación de agregados supramoleculares que sustraigan densidad electrónica de los alrededores de este carbono y vuelvan más lábil el enlace C-H, podrían llegar a favorecer la frecuencia de estas oscilaciones (Figura 14).^{40,41,43}

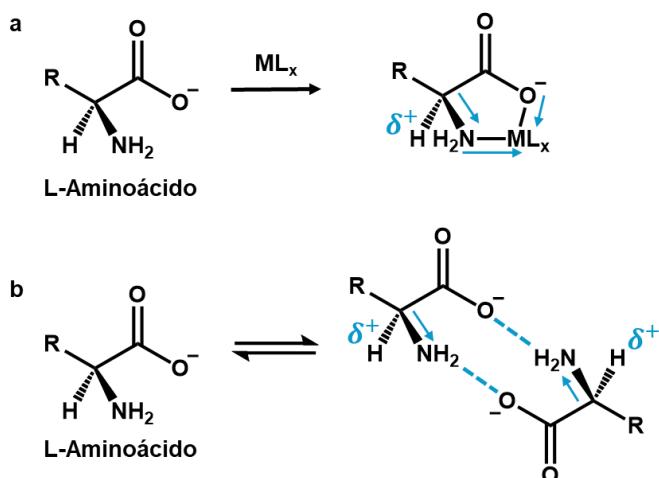


Figura 14. Posibles vías de alteración de la acidez del hidrógeno quiral. (a) Coordinación a un centro metálico. (b) Formación de una estructura supramolecular.

De todas las estructuras cristalinas obtenidas, solo dos de ellas presentaron una inversión parcial de la quiralidad que dio como resultado la obtención de la sal racémica. Para el caso de **1.e** esta se obtuvo como producto de la difusión lenta de vapores de ácido clorhídrico sobre una solución básica del compuesto, dando como resultado el clorhidrato. Para el caso de **1.d**, esta se obtuvo por precipitación lenta del compuesto desde una solución que había sido empleada para sintetizar un compuesto de coordinación de Cd(II), por ello la cristalización se llevó a cabo en presencia de iones metálicos.

El material cristalino empleado para la determinación estructural de ambos compuestos fue obtenido a partir de experimentos de cristalización que presentan alguna de las condiciones discutidas anteriormente que podrían favorecer la *transenantiomerización osculatoria*: permanencia por largos períodos de tiempo en una

solución básica que pudiera sustraer el hidrógeno quiral, y/o presencia de metales de transición, como el cadmio. Es relevante mencionar que para el derivado obtenido a partir de la L-Alanina con piperonal, compuesto no discutido en esta tesis, también se observó inversión de configuración impulsada por condiciones de almacenamiento similares (resultados publicados por nuestro grupo).⁴³

Conformaciones y factor de forma

Generalidades

El hecho de que el grupo imina sea reducido al final de la ruta sintética no solamente garantiza la reobtención de un grupo amina como se encuentra presente en el aminoácido precursor, sino que, además, confiere una libertad rotacional mucho mayor a la que podría haberse generado para el doble enlace N=C. Esto trae aparejado que las moléculas resultantes puedan adquirir una gran cantidad de configuraciones conformacionales posibles. Puntualmente, nos detendremos en dos de estos confórmeros que utilizaremos a lo largo de la tesis tanto a la hora de describir los materiales sólidos, como cuando propongamos los arreglos de los posibles ensambles en solución. Estos dos fueron elegidos debido a que se caracterizan por ser el estado de menor y mayor factor de forma. El primero, que denominaremos como “estado plegado” o “configuración plegada”, presenta al menos una interacción de apilamiento aromático intramolecular, la cual fuerza a la molécula a adquirir una configuración empaquetada sobre sí misma. El segundo, que por contraposición no presenta la interacción intramolecular y se encuentra en una configuración que maximiza la separación entre sus dos fragmentos moleculares, se denomina “estado desplegado” o “configuración desplegada” (Figura 15).

Esta definición en términos de interacciones intramoleculares de apilamiento aromático no tiene sentido para el caso de los aminoácidos de partida L-Fenilalanina y L-Tirosina, debido a que ambos carecen de más de un residuo aromático en su estructura. Sin embargo, más adelante en este mismo capítulo serán presentadas estructuras supramoleculares diméricas para sendos compuestos, las cuales presentan comportamientos semejantes a los observados para algunos estados conformacionales accesibles por los derivados.

La definición y estudio del estado conformacional en términos del factor de forma facilita la descripción del grado de plegamiento utilizando un parámetro cuantitativo, a través de un único valor numérico, adimensional y que está definido positivamente. En comparación con las metodologías que lo hacen en términos de los ángulos diedros de la molécula, como sucede en los diagramas de Ramachandran⁴⁴ o las metodologías modernas de determinación configuracional de péptidos,⁴⁵ al utilizar el factor de forma no solamente asignamos un único valor a cada estado conformacional si no que, también, podemos describir que “tan isotrópica” es la morfología adoptada. Este dato no se puede extraer de manera directa de la determinación de los ángulos diedros.

A modo de ejemplo, si quisieramos definir dos ángulos diedros consecutivos cuyos valores pudieran representar todas las conformaciones posibles para los compuestos

sintetizados en esta tesis, deberíamos estudiar aquel que involucra al nitrógeno y ambos metilenos (Ψ) y aquel que involucra al carbono quiral, el nitrógeno y el carbono *ipso* del anillo aromático proveniente del aldehído (Φ) (Figura 15). De esta manera tendríamos una serie de valores análogos a los que se utilizan para construir los diagramas de Ramachandran. Más allá de que los ángulos así definidos difieren de los estudiados en los péptidos, los valores de ángulo diedro determinados para nuestros compuestos en la conformación desplegada se encontrarían comprendidos en la misma región asignada para las láminas beta de las proteínas.⁴⁴

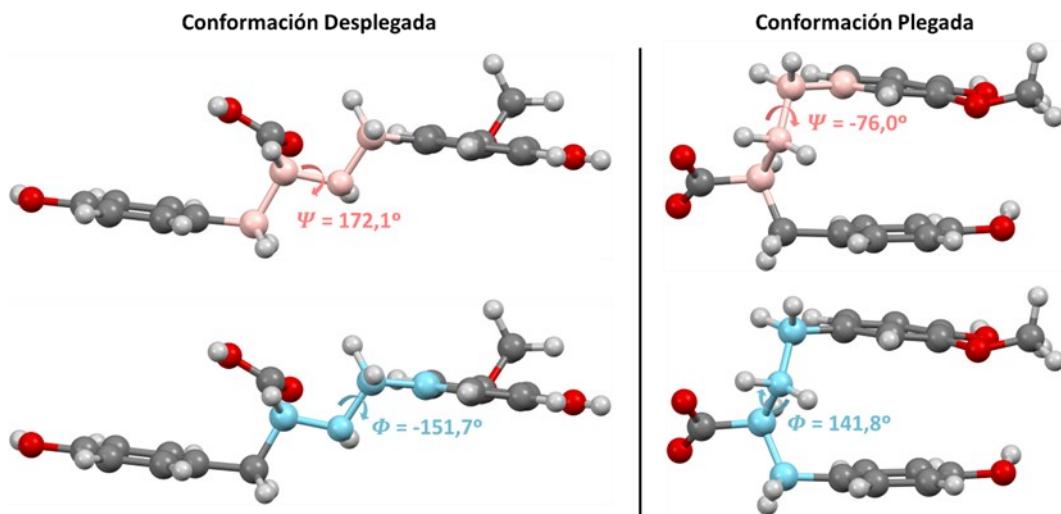


Figura 15. Ángulos diedros seleccionados para describir el estado conformacional desplegado y plegado en las moléculas sintetizadas para este trabajo de tesis.

Por otro lado, la definición del estado de plegamiento en términos de los ángulos diedros se vuelve particularmente difícil de definir con rigurosidad para el caso de un ensamble supramolecular debido a que estos no están conectados covalentemente. Esto restringe en gran medida la facilidad con que se pueden definir los ángulos diedros de interés. El factor de forma, por el contrario, se puede definir rigurosamente y de manera universal para toda aquella estructura para la cual su volumen pueda ser aproximado por un paralelepípedo.

Estas dos ventajas vuelven al factor de forma un aliado fundamental a la hora de caracterizar la morfología estructural y es por esto por lo que será utilizado para discutir el desarrollo de ciertas propiedades tanto en este, como en el próximo capítulo. Finalmente, a lo largo de todo este trabajo de tesis se expondrán varios ejemplos de nuevos materiales en los que será la conformación adoptada por el compuesto lo que determine, en mayor o menor medida, las propiedades finales. Por lo tanto, contar con un parámetro que sea fácil de calcular y para el cual se pueda extraer información estructural de manera directa resulta esencial.

Determinación del factor de forma de los derivados de aminoácido en distintas estructuras cristalinas

Empleando los programas de análisis cristalográfico es posible estudiar de manera independiente un conjunto de átomos embebidos en una estructura. Esto nos permite aislar los fragmentos estructurales correspondientes a las moléculas de los derivados de

aminoácido presentes en distintas estructuras para poder calcular su factor de forma. En los diferentes capítulos de la tesis se emplean los factores de forma para acompañar las discusiones, lo cual permite utilizar parámetros cuantitativos además de las descripciones cualitativas. A continuación, se presentarán algunos ejemplos representativos vinculados a los compuestos de este capítulo

Como se presentó previamente para el caso del compuesto **1.d**, la libertad conformacional confiere la cualidad de poder adaptarse para optimizar el uso de los recursos estructurales de cada compuesto con el fin de maximizar tanto el empaquetamiento como el desarrollo de interacciones intermoleculares. Esta diversidad configuracional se ve reflejada de forma directa en los factores de forma calculados para esta sustancia en las distintas estructuras cristalinas resueltas en las que se puede apreciar valores que van desde 1,56 para la sal de sodio (panel **1.d(Na)** en la Figura 16) hasta 2,36 para la sal de cloruro y 3,23 para el switerión (paneles **1.d(HCl)** y **1.d(swit)** de la Figura 17). El valor elevado de este último factor de forma refleja el denso empaquetamiento observado en la estructura cristalina del switerión y pone de manifiesto la acción conjunta tanto de la fuerza electroestática como de las diversas fuerzas entrópicas que actúan de manera atractiva sobre esta especie, propiciando el ensamblado.

El análisis de este compuesto permite ilustrar también el beneficio que implica contar con un parámetro cuantitativo a la hora de estudiar los estados conformacionales de una dada especie. Por ejemplo, si para el análisis del empaquetamiento cristalino se emplea como recurso únicamente la descripción cualitativa de los distintos confórmeros, es muy tentador describir al observado en la sal de cloruro y en el switerón como “equivalentes”, dado que ambos carecen de un potencial apilamiento aromático intramolecular (plegamiento sobre sí mismos) y ninguno de ellos exponen su “dentadura” aminoacídica. Sin embargo, gracias a que es posible calcular el factor de forma de ambas especies podemos observar que hay una diferencia apreciable en el estado de plegamiento. Considerando el rol fundamental que tiene el estado de plegamiento en la capacidad difusiva de una sustancia y, en última instancia, el impacto que tiene esto en el mecanismo de descomposición y las propiedades finales del material generado, contar con un parámetro cuantitativo para describir y discriminar estos distintos estados conformacionales resulta en un aporte sustancial al diseño racional de estructuras moleculares.

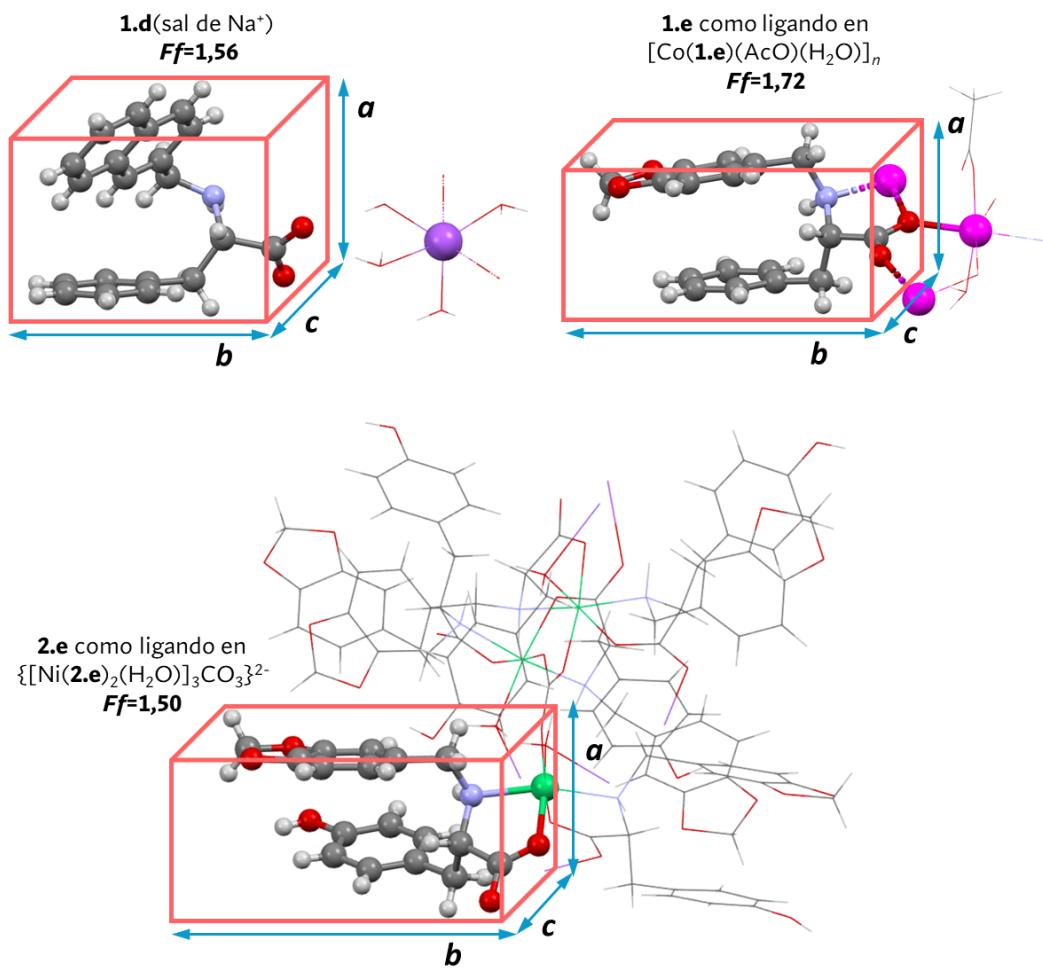


Figura 16. Estados conformacionales plegados observados en diversas estructuras cristalinas para especies de los compuestos **1.d**, **1.e** y **2.e** y los factores de forma calculados. Los datos de las estructuras de los compuestos de coordinación de **1.e**,⁴⁶ $[\text{Co}(1.\text{e})(\text{AcO})(\text{H}_2\text{O})]_n$, y **2.e**,⁴⁷ $\{[\text{Ni}(2.\text{e})_2(\text{H}_2\text{O})_3\text{CO}_3\}^{2-}$, fueron tomados de trabajos previos del grupo.

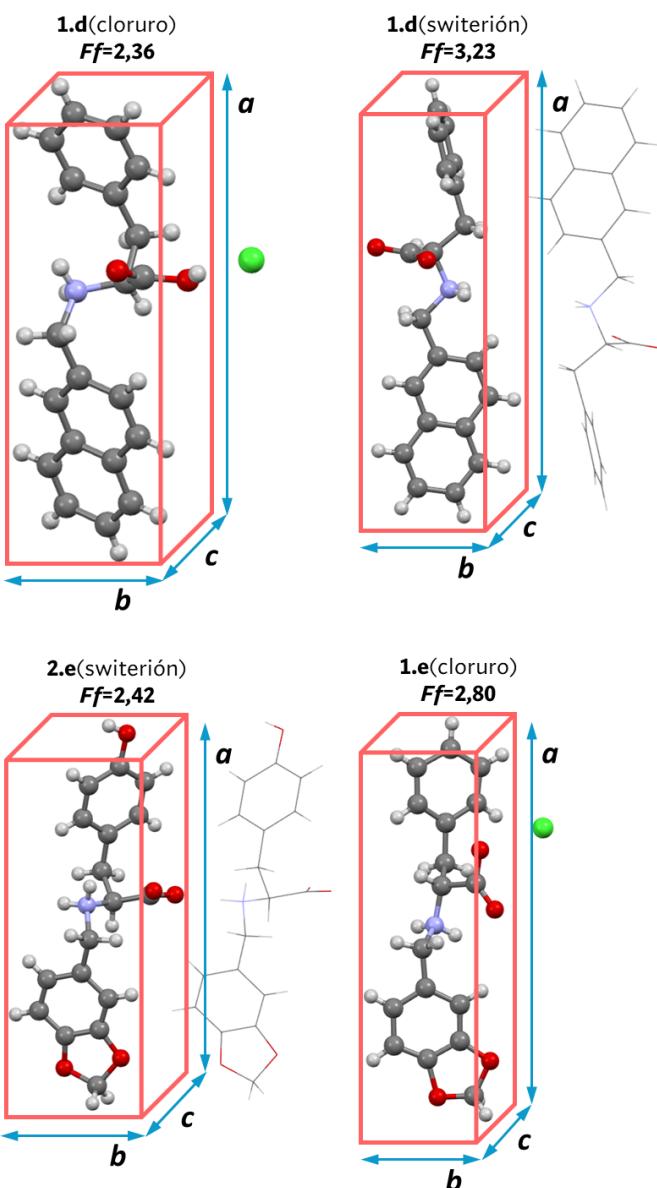


Figura 17. Estados conformacionales desplegados observados en diversas estructuras cristalinas para especies de los compuestos **1.d**, **1.e** y **2.e** y los factores de forma calculados.

Esta diversidad de conformaciones no es exclusiva del compuesto **1.d**, en tanto que se han observado estados conformacionales plegados también para otros miembros de la familia de derivados. Por ejemplo, para los compuestos **1.e** y **2.e** cuando actúan como ligandos en los compuestos de coordinación reportados previamente en el grupo, también se observa este tipo de conformación (Figura 18).^{43,46,47} En todos estos casos la diversidad (y flexibilidad) configuracional adquiere un rol esencial en el correcto desarrollo de los compuestos obtenidos dado que de ella depende que se establezca de forma eficiente la unión de coordinación entre el centro metálico y los grupos carboxilato y amino de los derivados de aminoácidos. Si estos no estuvieran expuestos, o la congestión estérica a su alrededor fuera demasiado grande, la estabilidad de la interacción metal-ligando sería apreciablemente menor y podría no llevarse a cabo la formación del complejo.

Aunque analizar en detalle tanto la química supramolecular como conformacional de estos compuestos de coordinación excede el foco de este trabajo de tesis, sí es meritorio mencionar que la diversidad de arquitecturas de coordinación obtenidas al emplear estos compuestos como ligandos (monómeros, trímeros y polímeros de coordinación) deviene del rol de ambas y pone de manifiesto el fino equilibrio que coexiste siempre en estos compuestos entre favorecer la interacción electroestática/coordinativa, propiciar un apilamiento eficaz o desarrollar redes extendidas de interacciones no covalentes.

Mecanismos de precipitación y su relación con las propiedades del material obtenido

Mecanismos de descomposición de sistemas homogéneos

Existen actualmente dos procesos aceptados para describir la formación de fases sólidas a partir de una solución homogénea. Uno de ellos es el “Mecanismo de Nucleación y Crecimiento” que se basa en la formación, espontánea o estimulada, de discontinuidades puntuales en la energía libre del sistema, que se manifiestan como centros de nucleación.⁴⁸ Estos centros luego sufren un proceso de crecimiento asociado a la acumulación de materia para dar lugar al desarrollo de nuevas partículas. Por último, este material puede continuar creciendo a costa de la migración de moléculas desde la solución a la fase sólida o, en su defecto, el sistema en su totalidad sufre un fenómeno de “envejecimiento”, el cual consiste en la redisolución de las partículas más pequeñas para favorecer la migración de masa hacia las de mayor tamaño. Este proceso de homogenización en la distribución de tamaños se denomina maduración de Ostwald.^{49,50}

Este mecanismo de formación de fases sólidas por formación de núcleos se caracteriza por tener una barrera de activación característicamente alta, producto de la dificultad que implica la formación de una superficie embebida en la matriz del solvente. En muchos casos esta dificultad puede inhibir por completo la formación de nuevas fases o retardar mucho su desarrollo, dando lugar a un desfasaje entre la estabilidad termodinámica y la propia manifestación del fenómeno.

Para los sistemas que se descomponen a través de esta vía, las fases sólidas generadas sólo se ven estabilizadas cuando el número de partículas acumuladas es suficiente como para desarrollar una entalpía de unión colectiva que sobrepase la energía requerida para el desarrollo de la superficie. Cuanto más eficaz es el empaquetamiento del sólido y más intensas sean las interacciones que se desarrollan dentro de este, más favorable será la formación de un sólido con un menor número de partículas. Esta tensión constante entre la energía reticular y el exceso superficial permite entender por qué esta vía suele ser la predilecta para la obtención de sólidos cristalinos. Estos suelen encontrarse densamente empaquetados y, en la gran mayoría de los casos, este empaquetamiento está mediado por interacciones atractivas entre sus bloques de construcción que aumentan considerablemente la energía reticular.⁵¹

Por otro lado, existe una vía de formación de fases sólidas alternativa que se desarrolla como consecuencia de una inestabilidad tan exacerbada en el sistema, que

provoca que este ya no puede tolerar si quiera las fluctuaciones más pequeñas en su composición. Este mecanismo es conocido como “Descomposición Espinodal” y se caracteriza por carecer de una barrera de activación, lo que da lugar a la formación de múltiples regiones de inestabilidad homogéneamente distribuidas en todo el sistema.⁴⁸ En contraposición a los centros de nucleación, puntuales y bien definidos, presentes en el mecanismo de nucleación y crecimiento, la descomposición espinodal da lugar a un entramado de regiones de distinta composición donde se pueden observar fracciones con mayor o menor cantidad de soluto o de solvente. Al descomponerse, este entramado genera redes sólidas interconectadas y extendidas en todas las dimensiones (Figura 18).

Esta vía de formación de fases sólidas, al carecer de barrera de activación, no presenta ningún tipo de impedimento cinético. Es importante notar que el desarrollo de redes tridimensionales a través de un entramado de nodos sólidos que recluyen una fase líquida en los intersticios se asemeja mucho al aspecto estereotípico de un gel. Los materiales que desarrollan arquitecturas espinodales suelen presentar propiedades muy interesantes gracias a su capacidad de alojar especies exógenas cuando el solvente es retirado, o de alterar su configuración a través de tratamientos post sintéticos.⁵²⁻⁵⁴

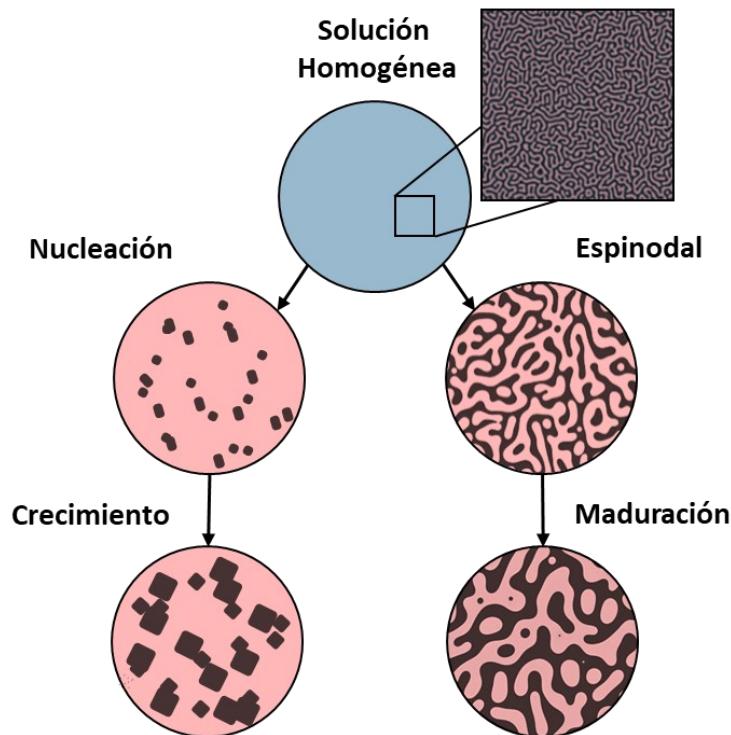


Figura 18. Esquema representativo de la separación en fases de una solución homogénea a través de distintas vías: “Mecanismo de Nucleación y Crecimiento” (izquierda) y “Descomposición Espinodal” (derecha).

En el marco de este modelo, las vías de nucleación y crecimiento y de descomposición espinodal, no están explícitamente segregadas ni se comportan como antagonistas entre sí. Al contrario, se propone la existencia de un continuo de combinaciones de periodicidad espacial y cantidad de moléculas interactuando que dan lugar a diversas opciones de amplitud, las cuales se encuentran moduladas por la difusión de materia. La descomposición espinodal o la formación de núcleos son solamente dos casos extremos de esta combinación de parámetros. Además, aquellos parámetros que

alteren de forma directa o indirecta la difusión molecular son, en última instancia, los estímulos experimentales que se deben controlar durante el experimento, para poder seleccionar el carácter preponderante de la vía de descomposición que se desea desarrollar. En estos términos pasa a tener sentido hablar de vías con carácter “más o menos” espinodales o cristalinas de separación de fases.

Caracterización del mecanismo de ensamblado y precipitación

Teniendo en cuenta lo discutido anteriormente en relación con los mecanismos propuestos para estudiar la separación de fases, la diversidad conformacional y del estado de carga de las moléculas sintetizadas, se investigó el proceso de precipitación desarrollado por variación controlada del pH. Para ello se emplearon soluciones 50 mM de cada uno de los compuestos en NaOH 0,1M y se utilizó (D)-Glucono-1,5-lactona como inductora de la precipitación. Empleando técnicas de microscopía confocal de tiempo de decaimiento de fluorescencia se monitoreó el proceso de precipitación aprovechando la auto fluorescencia intrínseca de estos compuestos. Durante el proceso de precipitación se registró el detalle de las morfologías de los sólidos desarrollados y, además, la variación en el tiempo de fluorescencia. Las características morfológicas de los sólidos generados fueron utilizadas para establecer de forma preliminar la vía a través de la cual cada molécula llevaba a cabo la descomposición del sistema, (“Mecanismo de Nucleación y Crecimiento” o “Descomposición Espinodal”), mientras que los cambios en los tiempos de decaimiento de la auto fluorescencia se emplearon como indicadores directos del grado de cambio del entorno molecular.

En los materiales cristalinos, la imposición de una periodicidad espacial genera que el entorno molecular promedio esté conservado para todos sus constituyentes. Esto implica que el tiempo de vida medio observado será similar a medida que el cristal crece, ya que el entorno molecular de cada bloque de construcción del material no cambia, solo varía el número de bloques de construcción ensamblados. Por otro lado, si el proceso se da a través de un mecanismo de mayor carácter espinodal, esperamos observar cambios en la auto fluorescencia a medida que se desarrolla la nueva fase. Esto se debe a que cuando suceden fenómenos por esta vía, el ambiente que rodea los bloques de construcción es extremadamente dinámico y cambia a media que la fase se desarrolla y se separa.

Considerando lo discutido anteriormente, es importante notar que no todas las precipitaciones deben darse por una u otra vía exclusivamente. Debido a que el tamaño final del nodo durante el fenómeno de génesis de una nueva fase depende de un equilibrio complejo y delicado entre las condiciones experimentales y las características moleculares de cada especie, es posible que se observe una gama de resultados que van desde materiales extremadamente cristalinos (sólidos con formas regulares bien definidas y cuyo tiempo de decaimiento de auto fluorescencia fluctúa leve o nulamente durante la precipitación), hasta aquellos más espinodales (sólidos amorfos, con un grado de entrecruzamiento elevado con el solvente, y cuyo tiempo de decaimiento de auto fluorescencia se altera apreciablemente durante la precipitación). Ya no estamos parados en el binarismo de dos vías antagónicas, complementarias, y mutuamente excluyentes en las que puede suceder un fenómeno, si no en un gradiente de posibilidades que pueden (y deben) ser controladas experimentalmente para desarrollar sólidos con las características deseadas.

En la Figura 19 y la Figura 20 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de tiempo de decaimiento tomadas durante los procesos de precipitación de algunos de estos compuestos, y los gráficos de tiempo de decaimiento en función del tiempo. En todos los casos se indica la escala de color empleada para representar los tiempos de decaimiento de cada pixel a la izquierda de la figura. Debido a que la metodología empleada para disparar la precipitación es el salto controlado de acidez, se espera que el estado de carga de la especie en el sólido generado corresponda al ion dipolar o switerión. Los compuestos **2.a** y **2.d** no fueron estudiados empleando esta metodología debido a que no pudieron ser sintetizados antes de la estancia doctoral realizada en el grupo del Dr. Angel Orte, donde se realizaron estos experimentos. Por otro lado, los compuestos **1.f** y **2.f** presentaron intensidades de emisión bajas y no pudieron ser correctamente caracterizados. A continuación, se discuten los resultados organizados según el tipo de material obtenido.

Materiales cristalinos

Para la L-Tirosina (**2**) y para el compuesto **2.e** se observó el desarrollo de morfologías acordes a lo esperado para sólidos cristalinos, con formas geométricas bien definidas constituidas por líneas mayoritariamente rectas y contornos nítidos (Figura 19). Es fácil reconocer en las imágenes regiones con formaciones discretas de material individual o localmente agregado. Al mismo tiempo, todos estos sistemas mostraron un tiempo de vida de fluorescencia corto (menor a los 2ns) y con muy poca variabilidad durante toda la precipitación. En todos los casos, las precipitaciones se generaron desde una serie de focos puntuales que luego fueron desarrollándose y expandiéndose, de manera análoga a lo esperado para una descomposición en fases mediada por un mecanismo mayoritariamente cristalino.

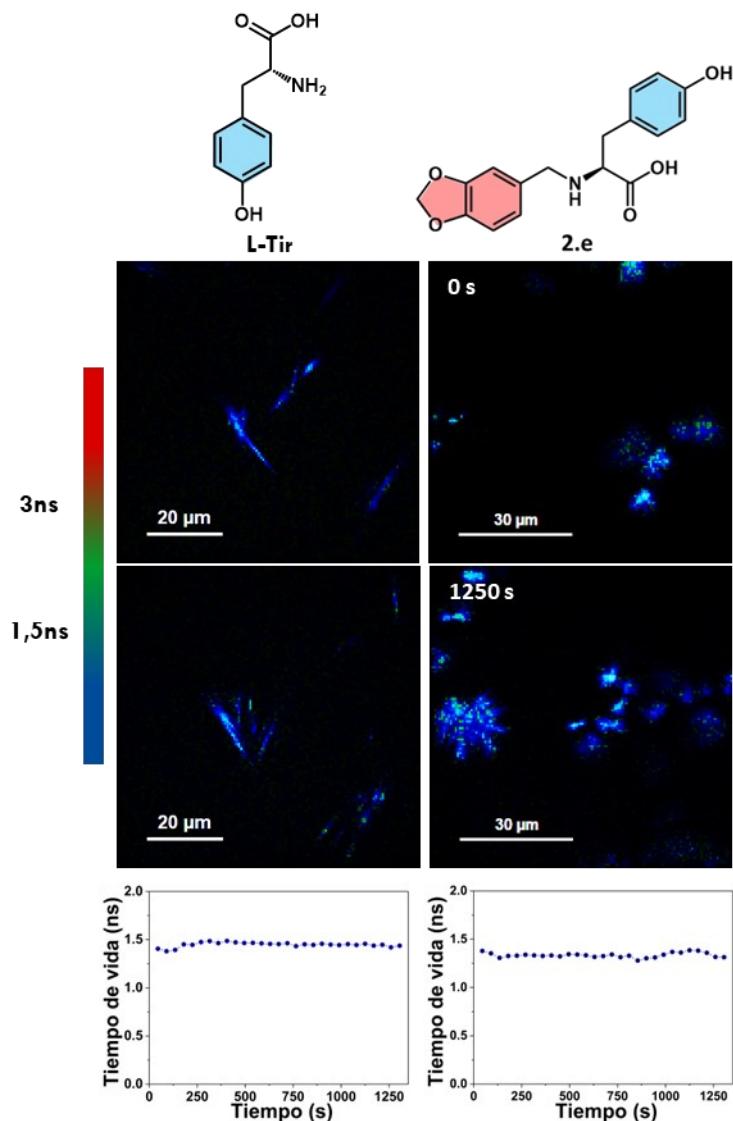


Figura 19. Materiales sólidos obtenidos durante la precipitación por cambio de pH de soluciones básicas L-Tirosina y el compuesto **2.e**. Fila superior: Microscopía realizada en el instante inicial de la precipitación. Fila intermedia: Microscopía realizada sobre el material sólido obtenido al finalizar la precipitación. Fila inferior: Tiempos de vida de fluorescencia determinados para todo el material generado en el campo de observación durante la precipitación.

Materiales Espinodales

Los derivados más pesados de la L-Fenilalanina (**1**) (compuestos **1.d** y **1.e**) establecieron sólidos de aspecto esferiforme que se presentaron distribuidos a lo largo de todo el campo de observación. El crecimiento se desarrolló de forma isotrópica en todas las direcciones y dio lugar a un aumento apreciable en los tiempos de decaimiento de fluorescencia registrados durante el proceso (Figura 20). La formación de una gran cantidad de nodos de precipitación de pequeño tamaño y homogéneamente distribuidos a lo largo de toda la muestra observada, puede asociarse en gran medida a lo discutido previamente para una descomposición en fases de carácter mayoritariamente espinodal.

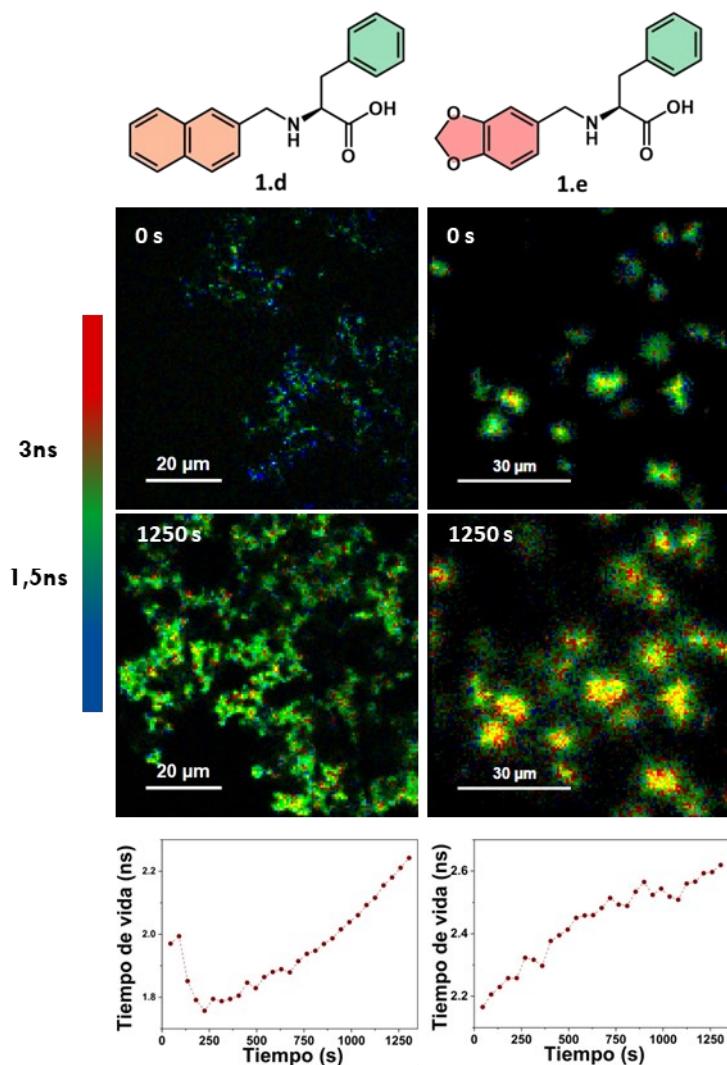


Figura 20. Materiales sólidos obtenidos durante la precipitación por cambio de pH de soluciones básicas de los compuestos **1.e** y **1.d**. Fila superior: Microscopía realizada en el instante inicial de la precipitación. Fila intermedia: Microscopía realizada sobre el material sólido obtenido al finalizar la precipitación. Fila inferior: Tiempos de vida de fluorescencia determinados para todo el material generado en el campo de observación durante la precipitación.

Materiales duales

Al estudiar qué sucede con los casos de la L-Fenilalanina y el compuesto **1.a** (derivado de L-Fenilalanina con el benzaldehído) podemos observar que ambas sustancias muestran un tiempo de vida de fluorescencia que se mantiene casi inalterado durante toda la precipitación, parámetro típicamente asociado al carácter cristalino del sólido que se está generando. Pero la morfología observada para ambos no resulta tan compatible con lo esperado para un sólido rígido y de caras planas. Por un lado, **1.a** se desarrolla en un crecimiento longitudinal que conforma filamentos elongados y, a simple vista, flexibles. Por otro lado, la L-Fenilalanina genera muy poco material sólido, el cual se organiza de forma concéntrica dando lugar a un arreglo que puede asociarse a las disclinaciones en forma de “cruz de Malta”⁵⁵.

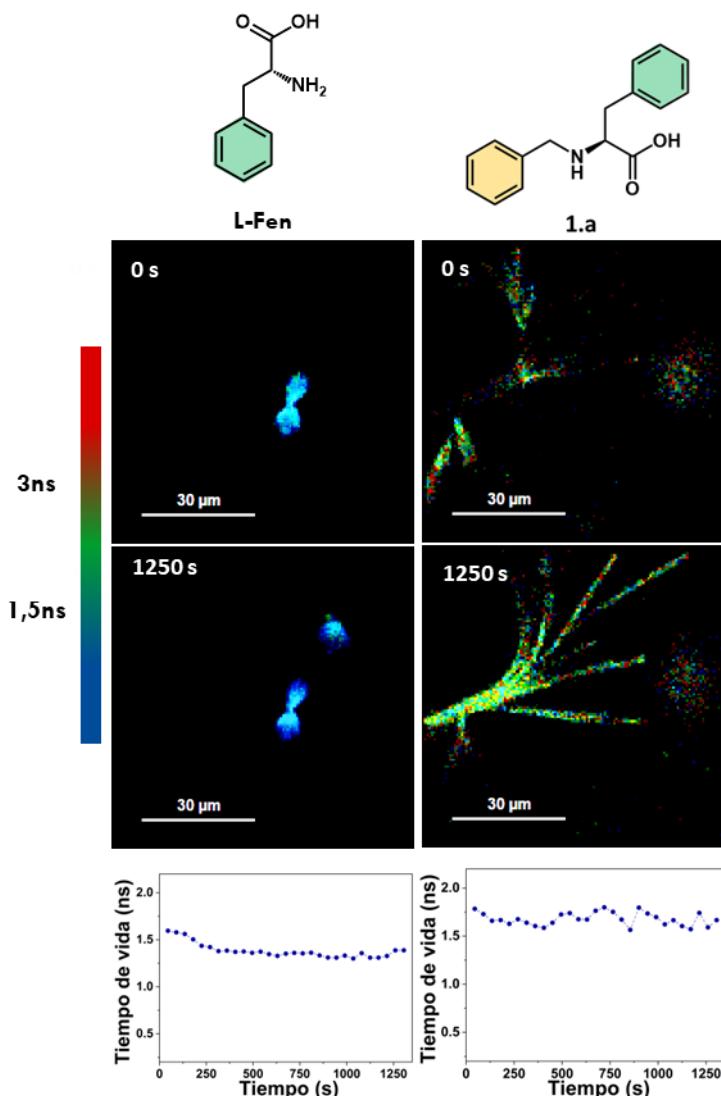


Figura 21. Materiales sólidos obtenidos durante la precipitación por cambio de pH de soluciones básicas de L-Fenilalanina y el compuesto **1.a**. Fila superior: Microscopía realizada en el instante inicial de la precipitación. Fila intermedia: Microscopía realizada sobre el material sólido obtenido al finalizar la precipitación. Fila inferior: Tiempos de vida de fluorescencia determinados para todo el material generado en el campo de observación durante la precipitación.

Este comportamiento dual, que presenta una baja variabilidad en el tiempo de decaimiento acompañado de una morfología irregular o amorfa, podría estar indicando el desarrollo de un material que está constituido por dominios cristalinos, pero tan pequeños que son capaces de generar figuras irregulares al agregarse. Esta descripción es consistente con la presencia de materiales mesocristalinos o cristales líquidos. En el Capítulo V se discutirá en detalle la naturaleza del carácter mesogénico de estos materiales, y su correlación con la solubilidad, la capacidad de difundir y los parámetros supramoleculares de cada sustancia.

El hecho de que tanto la L-Tirosina como sus derivados den lugar a sólidos cristalinos, y que los derivados de L-Fenilalanina conformen estructuras con un carácter más filamentoso y elástico, puede entenderse en base a los mismos criterios estructurales expuestos en los apartados anteriores. Si pensamos las propiedades del material obtenido

en términos del proceso de descomposición a través del cual fue conformado podemos distinguir los tres grandes grupos ya descritos.

La L-Tirosina y el compuesto **2.e**, que dieron lugar a la obtención de sólidos cristalinos, son todas moléculas divergentes y con mayor polaridad gracias a la presencia del grupo fenol. Este carácter divergente les confiere la capacidad de desarrollar redes cristalinas expandidas tridimensionalmente. Adicionalmente, la capacidad de conformar dímeros estables en solución (ver apartado de Simulación Computacional más adelante) implica que el factor de forma de los bloques de construcción de estos materiales cristalinos se mantendrá casi constante, y pequeño, a lo largo de todo el fenómeno de descomposición. Esto no solamente evita que haya cambios abruptos en la capacidad de difundir durante todo el proceso de descomposición de fases, sino que propicia una difusividad eficaz, lo cual podría explicar la tendencia a la descomposición vía el mecanismo de Nucleación y Crecimiento.

Por el contrario, los derivados más pesados de la L-Fenilalanina son todas moléculas del tipo convergente y con una capacidad para difundir no tan eficaz debido a que, al no conformar dímeros, podrían adquirir una conformación con un factor de forma mayor. Esto es consistente con la formación de una gran cantidad de nodos de concentración estáticos y de menor tamaño, lo que conllevaría a la generación de materiales dispersos e interconectados. Por este motivo es de esperar que el carácter espinodal se manifieste más en estos sistemas.

En una región intermedia entre ambos grupos se encuentran la L-Fenilalanina y el compuesto **1.a**. Ambos son lo suficientemente pequeños como para poder difundir con mayor facilidad, pero su carácter convergente no les permite desarrollar redes supramoleculares extendidas tridimensionalmente que aumenten el carácter cristalino.

Estos resultados no solamente permiten entender las variables que dominan el mecanismo de descomposición de un sistema y con ello, poder tener un control rigurosos de las propiedades finales a través del diseño racional molecular, sino que también ilustran la eficacia de la microscopía FLIM resuelta en el tiempo para estudiar los fenómenos de descomposición de sistemas homogéneos.

Química en solución

Dímeros, confórmeros y agregados

Las características estructurales del residuo aminoacídico son parámetros determinantes a la hora de comprender el rol que cumple un dado aminoácido en la estructura de una proteína. Por este motivo es común encontrar en bibliografía múltiples maneras de separar y clasificar a los aminoácidos según qué fenómeno se esté estudiando. Una clasificación que puede resultar de utilidad para el análisis que se llevará a cabo a continuación es la que organiza a los aminoácidos en ácidos, neutros o básicos. Por otro lado, podemos distinguir entre aquellos con residuos polares o apolares, u aromáticos y alifáticos.⁵⁶ Toda esta diversidad de maneras de pensar a los aminoácidos muestra no solamente su impresionante versatilidad sino, también, lo desafiante que

puede ser encontrar un único conjunto de parámetros estructurales que permita describir de manera precisa y rigurosa a cada uno de ellos, de forma tal de poder predecir su comportamiento en los numerosos entornos supramoleculares que están presentes en los sistemas vivos.

Una de las propiedades que puede resultar de gran utilidad poder predecir para cualquier molécula nueva, es su solubilidad en diversos solventes. En el caso puntual de los aminoácidos esto no solamente impacta en el diseño de nuevos materiales o en las diversas y novedosas aplicaciones en las que están siendo utilizados actualmente, si no que repercute directamente en su biodisponibilidad y acumulación en distintos tejidos. En última instancia, la solubilidad en agua será el parámetro que determine tanto la facilidad con que el aminoácido puede ser transportado a través de la sangre, como su capacidad de precipitar y acumularse en forma de agregados que tengan el potencial de interrumpir el correcto funcionamiento de una ruta metabólica.

Como primera aproximación, podemos pensar que la solubilidad de un aminoácido estará directamente relacionada con la polaridad de su residuo. A medida que un residuo es más polar y/o adquiere la capacidad de aceptar o donar puentes de hidrógeno, este será más afín al agua y aumentará su solubilidad. Sorprendentemente, esto no sucede así cuando estudiamos la relación de solubilidades entre L-Fenilalanina y L-Tirosina. En bibliografía se reporta que la solubilidad en agua de la primera es casi 66 veces mayor a la de la segunda. Este fenómeno es adjudicado al hecho de que la L-Tirosina puede formar dímeros muy estables en agua, análogos a los observados en su estructura cristalina. Esto contribuye a disminuir la cantidad de grupos aceptores y donores puentes de hidrógeno que pueden interactuar con el agua y, además, constituye un dímero supramolecular que, a fines prácticos, se comporta como un “compuesto” de mayor volumen y el doble de masa, lo que dificulta aún más su solubilidad.¹⁶

La existencia ya comprobada del dímero de L-Tirosina en solución, el hecho de que en las estructuras cristalinas de los derivados **2.a** y **2.e** se hayan podido observar la formación de dímeros supramoleculares, y que en los compuesto **1.f** y **2.f** también haya sido posible identificar estructuras multiméricas extendidas a través de la formación de puentes de hidrógeno, es motivo suficiente para sospechar que podría haber una tendencia hacia la formación de este tipo de arreglos estables en solución para estos compuestos. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con la L-Tirosina, la vasta libertad conformacional hace que no sea simple definir el estado configuracional adquirido por estos compuestos al conformar la estructura supramolecular resultante. Mientras que el núcleo no-covalente generado a partir de las interacciones puente de hidrógeno entre el grupo amonio, el carboxilato y el hidroxilo se conserve en algunos casos, el residuo restante puede orientarse en distintas direcciones. Por simplicidad, consideramos en primera instancia el caso de la formación de dímeros supramoleculares en solución como modelo de análisis. Adicionalmente, en base a lo discutido se sugiere la existencia de, al menos, dos tipos de entidades diméricas distintas. Aquella que se confecciona a partir de especies plegadas, en la que se ve conservado el núcleo dimérico característico de la L-Tirosina, y la que se obtiene por apilamiento directo de moléculas desplegadas. En esta última el núcleo dimérico no se desarrolla debido a que el hidroxilo no se encuentra próximo a los grupos amonio o carboxilato. Aunque esta última estructura podría parecer desfavorecida

respecto a la constituida a partir de especies plegadas debido a que carece de los dos puentes de hidrógeno que involucran al grupo hidroxilo, recordemos que en solución se podrán establecer puentes de hidrógeno con moléculas de solvente, compensando la alteración entálpica.

Es posible extrapolar esta misma manera de pensar las entidades presentes en solución, también para la L-Fenilalanina y sus derivados, considerando la existencia de monómeros y dímeros. En este caso, sin embargo, no serán dímeros confeccionados con el mismo arreglo del núcleo dimérico de la L-Tirosina, ya que no está presente ahora el grupo hidroxilo en la posición *p*-. Los dímeros constituidos por la L-Fenilalanina serán meramente electroestáticos, de forma similar a los que constituyen el plano electroestático en su estructura cristalina.

De esta manera, los derivados de L-Fenilalanina podrían dar lugar a dímeros donde se establece únicamente la interacción electroestática asistida por el puente de hidrógeno entre los grupos amonio y carboxilato, y para los cuales también se pueden sugerir al menos dos estados conformacionales posibles para las estructuras que los constituyen.

Por un lado, se encuentran los generados a partir de especies plegadas sobre sí mismas, las cuales exponen de manera eficaz sus centros aminoacídicos. Por otro lado, tendríamos aquellos construidos a partir de estructuras desplegadas, que favorecen el apilamiento y la construcción de planos electroestáticos.

Un conjunto de posibles dímeros constituidos a partir de estructuras plegadas y desplegadas para estos derivados se detallan en la Figura 22 y la Figura 23. Todos los dímeros son nombrados en base al rótulo que identifica el compuesto. Se emplea un subíndice “*s*” para indicar que son entidades supramoleculares, o el subíndice “*m*” para los correspondientes monómeros, cuando corresponda. Al mismo tiempo, se emplea el superíndice “*P*” o “*D*” para distinguir entre aquellos generados a partir de especies plegadas y desplegadas.

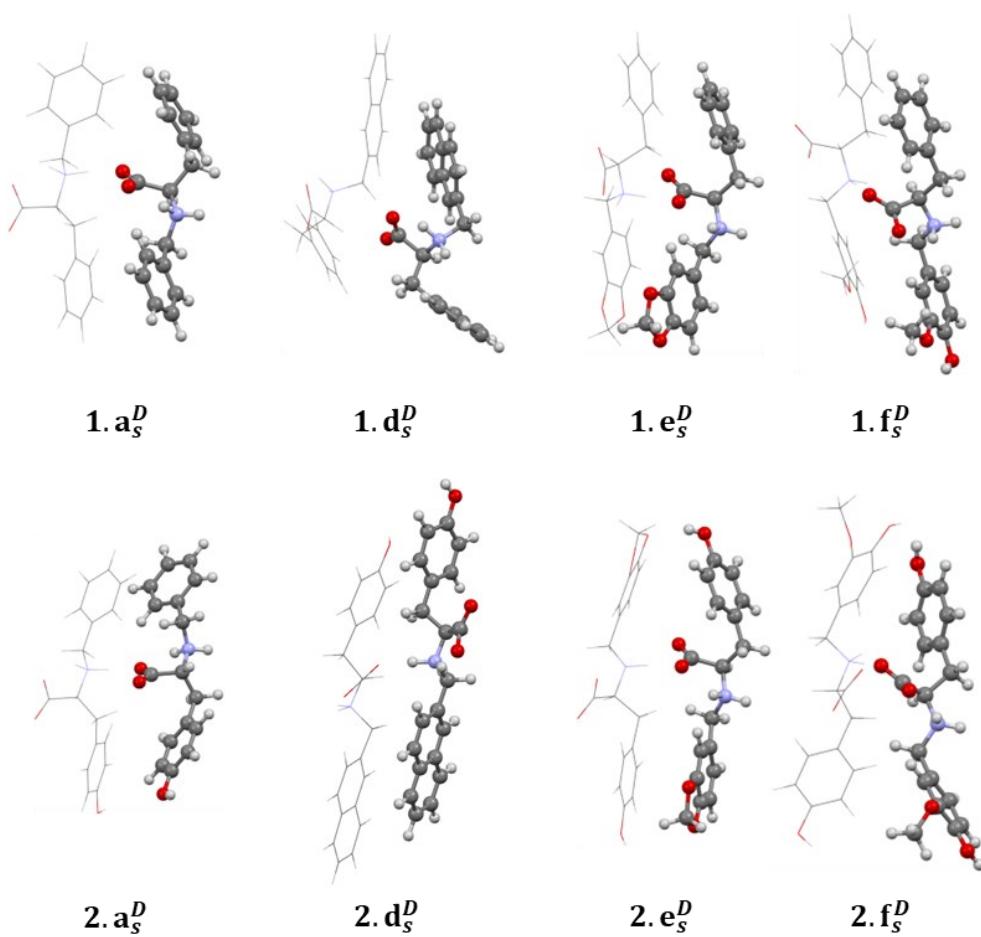


Figura 22. Dímeros supramoleculares construidos y pre-optimizados empleando monómeros desplegados, utilizados para los cálculos de termoquímica del proceso de ensamblaje. Se muestra como ejemplo los aductos obtenidos a partir de iones dipolares.

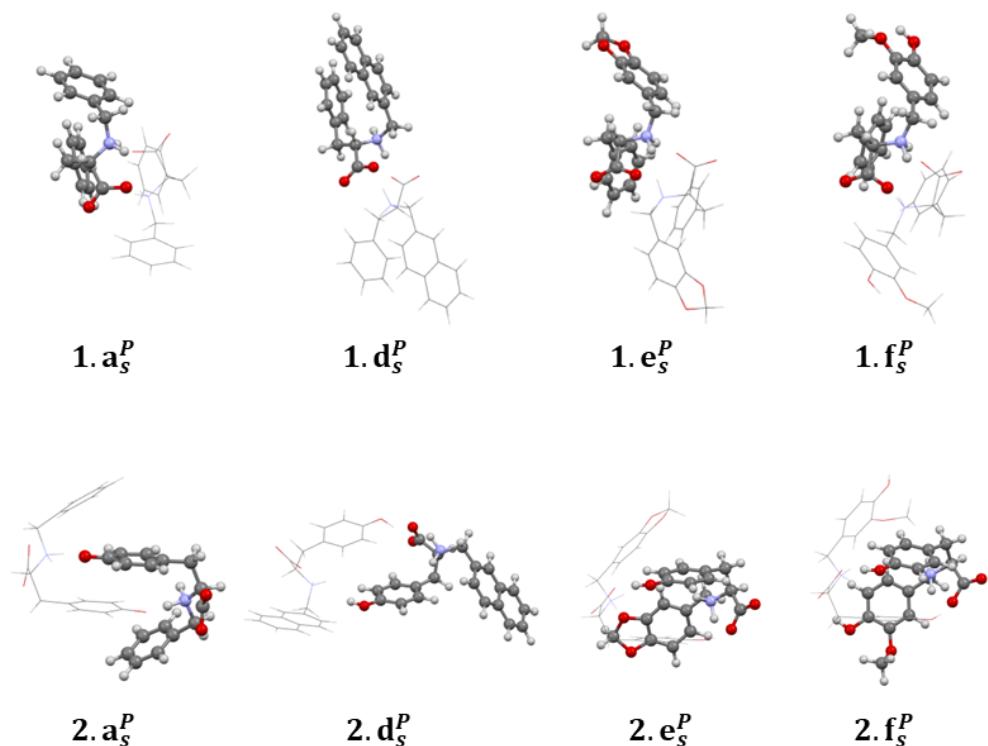


Figura 23. Dímeros supramoleculares construidos y pre-optimizados empleando monómeros plegados, utilizados para los cálculos de termoquímica del proceso de ensamblaje. Se muestra como ejemplo los aductos obtenidos a partir de iones dipolares.

En base a lo descrito anteriormente podemos proponer que, para todos estos derivados, pueden coexistir al menos cuatro entidades estructurales distintas. Los compuestos monoméricos, tanto sea en un estado configuracional plegado o desplegado, y los compuestos diméricos constituidos a partir de estos (Figura 24).

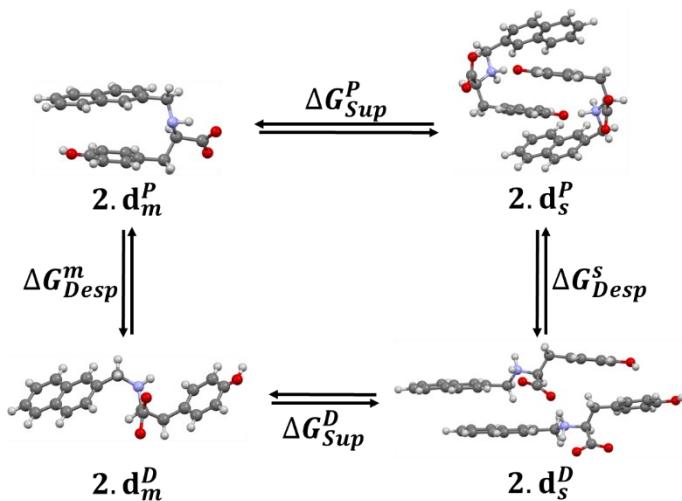


Figura 24. Las cuatro posibles entidades estructurales propuestas en los sistemas estudiados y su respectiva nomenclatura, tomando como ejemplo el compuesto **2.d**. Los superíndices indican el estado conformacional adquirido por los bloques monoméricos (*D* o *P*) y los subíndices distinguen las entidades supramoleculares (*s*) de los monómeros (*m*). Para los cambios de energía se emplea ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D para representar al proceso de formación de los agregados supramoleculares empleando los monómeros en un dado estado conformacional, y ΔG_{Desp}^m y ΔG_{Desp}^s para representar el fenómeno de despliegamiento de los monómeros o los agregados supramoleculares.

Debido a la marcada diferencia de tamaño y morfología que presentan estas cuatro especies es esperable que la capacidad difusiva, sea muy distinta para cada una de ellas. Considerando el rol protagónico que ha mostrado tener esta variable a la hora de determinar la naturaleza espinodal o cristalina del material que se genera a partir de una descomposición, resulta esencial tener una idea clara y precisa, tanto de la existencia de estas entidades en solución, como de su distribución poblacional.

Para poder estudiar la diversidad arquitectónica descrita en solución se emplearon espectroscopía UV-vis, RMN de protón, y cálculos de estructura electrónica por DFT.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de espectroscopía UV-Vis a temperatura variable brindaron información acerca de la formación de entidades supramoleculares en solución.⁵⁷ Se espera que, al incrementar la temperatura, se vea desfavorecida la formación estructuras supramoleculares, lo cual debería traer aparejado un efecto hipocrómico. Adicionalmente, esta técnica permite obtener, al menos de manera indirecta, información sobre la estabilidad de estas estructuras supramoleculares a través del análisis de la magnitud de los cambios observados.

La resonancia magnética nuclear de protón a temperatura variable permite extraer información sobre el entorno de un núcleo magnéticamente activo. Gracias a que los cambios conformacionales alteran este entorno al producirse distorsiones en los campos magnéticos locales a los que es sometido el núcleo irradiado, podemos extraer información directa sobre la conformación molecular. Además, debido a que los hidrógenos se encuentran siempre en la periferia molecular, los mismos son particularmente sensibles a las consecuencias que pueden traer los cambios conformacionales. Por este motivo, al realizar determinaciones espectroscópicas variando la temperatura, es posible inducir un desacople, parcial o total, de algunas señales. Esto sucede si se alcanza un régimen de libre rotación alrededor de los enlaces simples en el que la frecuencia de rotación supere la escala de tiempo de decaimiento de los núcleos. Como resultado se observa una especie de “promedio” de los ambientes químicos de protones que son estructuralmente no equivalentes, y lleva a que ambos desplazamientos químicos se igualen. A este fenómeno se lo conoce como coalescencia por efectos térmicos y es un comportamiento característico de hidrógenos diastereotópicos en mediciones dinámicas.^{58,59}

Estos experimentos no pudieron realizarse en DMSO-d₆ debido a que la señal de este solvente interfiere en gran medida con la región donde deberían salir las señales asociadas a los hidrógenos quirales y metilénicos. Cabe mencionar que, para poder realizar estos experimentos, fue necesario emplear una concentración de trabajo mayor a la utilizada para los experimentos de espectroscopía UV-Vis (\approx 50mM para RMN-¹H vs. \approx 5mM para UV-Vis). Aunque esta diferencia en la concentración podría dar lugar a procesos diferentes o favorecer fenómenos distintos en cada caso, el análisis que se desarrollará en este apartado buscará establecer alguna correlación entre los resultados de ambas técnicas en solución a partir de la información extraída para cada una de manera independiente.

Estudios mediante espectroscopía electrónica

Para corroborar la hipótesis de la existencia de dímeros estables en solución para los derivados de aminoácido sintetizados en este capítulo se realizaron experimentos de espectroscopía de absorción UV-Vis a temperatura variable, desde 25°C a 75°C, empleando concentraciones de *c.a.* 5 mM para todos los compuestos.

Los experimentos se llevaron a cabo empleando tanto DMSO, medio en el cual se espera que las moléculas estudiadas permanezcan en su forma switeriónica, como agua básica, con el fin de estudiar cómo se altera la estabilidad de los posibles agregados formados en función del estado de ionización (forma aniónica). Adicionalmente, el estudio de la relación entre el estado de carga de la especie y la formación de agregados supramoleculares puede aportar información relevante sobre la capacidad de agregación a diferentes pH, aun cuando no predomine el estado switeriónico. La información relacionada a estas variables puede ser empleado para el diseño de materiales bioinspirados y estudio de otros procesos de relevancia, como la formación de estructuras amiloides, para las cuales la obtención de un cierre electroestático es una de las características principales.

El espectro UV-Vis de la L-Fenilalanina a 25°C en DMSO presenta una serie de bandas superpuestas centradas en 258nm y otra banda ancha de menor intensidad con máximo en 301nm, mientras que para la L-Tirosina en las mismas condiciones, se observan al menos dos bandas superpuestas a 281 y 288 nm (Figura 25, paneles superiores). Para el caso de la L-Fenilalanina, las señales a 258 nm provienen del acoplamiento vibracional que se produce en las transiciones electrónicas del anillo aromático, dando lugar a la formación de transiciones vibriónicas.⁶⁰ La alteración de esta simetría por parte del hidroxilo presente en la estructura de la L-Tirosina podría ser el motivo por el cual no se aprecia en este caso un acoplamiento equivalente.⁶¹

Los espectros de estas moléculas en agua básica a temperatura ambiente muestran marcadas diferencias (Figura 25, paneles inferiores). Para la L-Fenilalanina se observa la aparición de una banda centrada en 203 nm acompañada de una marcada disminución en la intensidad de la señal vibriónica centrada en 258 nm. Para la L-Tirosina se observan varias bandas definidas a 224, 240 y 292 nm, con intensidad decreciente, respectivamente.

Las diferencias observadas en ambos espectros se pueden explicar debido a dos motivos independientes. Por un lado, gracias a la apertura de la ventana espectral que implica la utilización de agua como solvente. Debido a que el DMSO presenta una banda intensa de absorción alrededor de 252 nm, las señales de ambos aminoácidos que estuvieran por debajo de esta longitud de onda son substraídas total o parcialmente al restar el blanco experimental. Al desaparecer esta señal, no solamente se vuelven apreciables las transiciones a 203 y 224 nm, sino que también disminuye relativamente la señal vibriónica de la L-Fenilalanina. Por otro lado, las diferencias observadas para L-Tirosina podrían estar relacionadas con la formación de arquitecturas supramoleculares en solución, y no a la aparición de una carga neta en el sistema.⁶² Esta hipótesis proviene de que los espectros reportados en bibliografía para la L-Tirosina en solución presentan señales a 220 y 275 nm (bandas dadas por transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ desde el estado fundamental los estados L_a y L_b , respectivamente) y un hombro por encima de 280nm, que

son exactamente las mismas que se observan para nuestros experimentos a altas temperaturas (ver discusión a continuación).⁶³ Hasta donde sabemos, más allá de que está reportada la existencia de dímeros de este aminoácido en solución, en bibliografía no se encuentra disponible un análisis exhaustivo sobre la dependencia del espectro de absorción con la concentración o la temperatura. El análisis presentado en esta tesis doctoral sería el primero hasta ahora en abordar de manera detallada esta tendencia.

Los resultados para L-Fenilalanina y L-Tirosina variando la temperatura mostraron muy pocos cambios cuando el solvente utilizado fue DMSO (Figura 25). El hipocromismo observado es de alrededor de +13 % para L-Fenilalanina a 310 nm y -4 % para L-Tirosina a 280 nm. Si se compara este valor con la variación registrada para regiones sin bandas apreciables (*c.a.* +12,5 % a 550 y 700 nm), se observa que ambos cambios están dentro del rango de lo esperado para la propia oscilación térmica. Sin embargo, los resultados obtenidos para los experimentos en medio básico muestran que, mientras la L-Fenilalanina tampoco da lugar a cambios apreciables por encima de lo esperado por la fluctuación térmica en estas condiciones, el espectro de la L-Tirosina sí sufre modificaciones considerables. La desaparición y aparición de las bandas anteriormente mencionadas junto con la formación de puntos isosbésticos podría considerarse como evidencia de una profunda alteración de la estructura supramolecular.

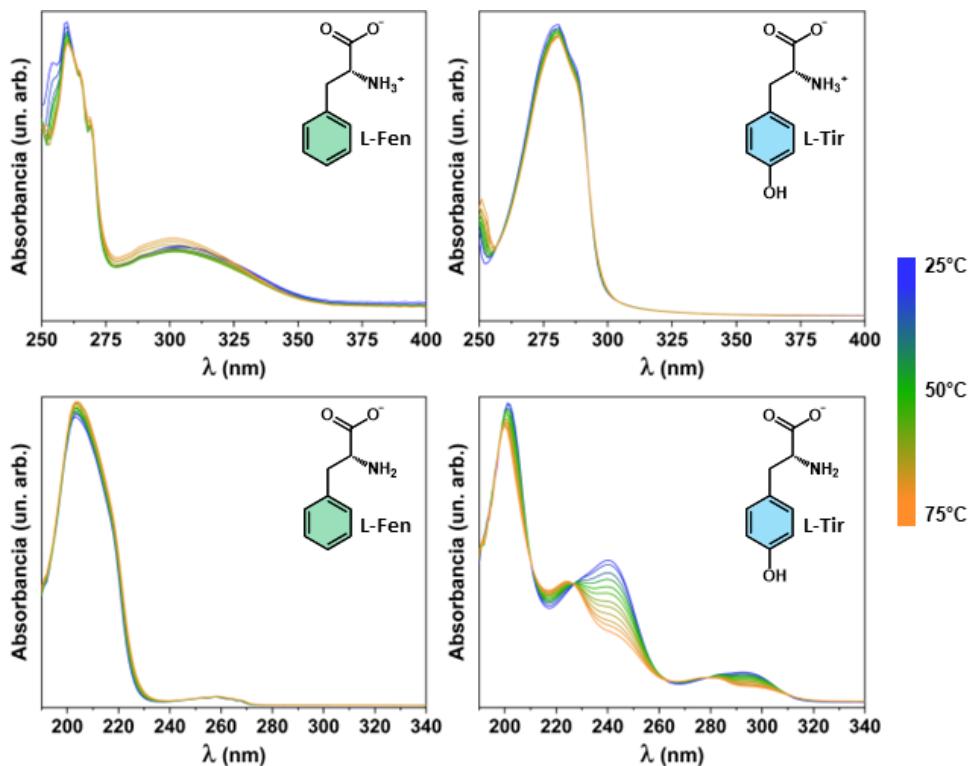


Figura 25. Estudio mediante espectroscopía UV-Visa temperatura variable para L-Fenilalanina y L-Tirosina en DMSO (arriba) y H₂O/HO⁻ (abajo).

El proceso de desensamblado de los dímeros de L-Tirosina implicaría un cambio sustancial en la densidad electrónica alojada sobre el anillo aromático. Esta se vería alterada debido a que, por un lado, el hidroxilo fenólico ya no estaría formando parte de una interacción no covalente y, por otro lado, el efecto de solapamiento producido por el apilamiento aromático se vería drásticamente disminuido. Es esencial tener en cuenta que

este proceso de desensamblado se ve favorecido por el medio básico, dado que ambos monómeros se encuentran con carga neta negativa, lo que contribuiría a la repulsión electroestática. Entendemos que este efecto no se observa en DMSO porque, a las temperaturas en que se realiza el experimento, el dímero establecido por dos en estado switeriónico sigue siendo muy estable.

El hecho de que no se observen cambios apreciables para la L-Fenilalanina en ambos medios puede estar vinculado con que no se desarrollen ensambles supramoleculares para esta sustancia en estas condiciones.¹⁶ Aunque en bibliografía existen reportados ensamblajes supramoleculares tanto en agua como en dimetilsulfóxido,⁶⁴ estos se producen a concentraciones mucho mayores que las empleadas para estos experimentos (≈ 5 mM para UV-Vis en ambos solventes vs 50mM para gelificación en DMSO y 212mM para gelificación en agua). Además, la estructura supramolecular propuesta para estos ensambles se desarrolla a través de interacciones electrostáticas entre el amonio y el carboxilato asistidas por puentes de hidrógeno y no requiere inducir alteraciones conformacionales en la molécula.⁶⁴

Los mismos estudios se realizaron con los derivados de ambos aminoácidos, tanto en DMSO (Figura 26 y Figura 28) como en una solución acuosa de NaOH 0,1M (Figura 27 y Figura 29).

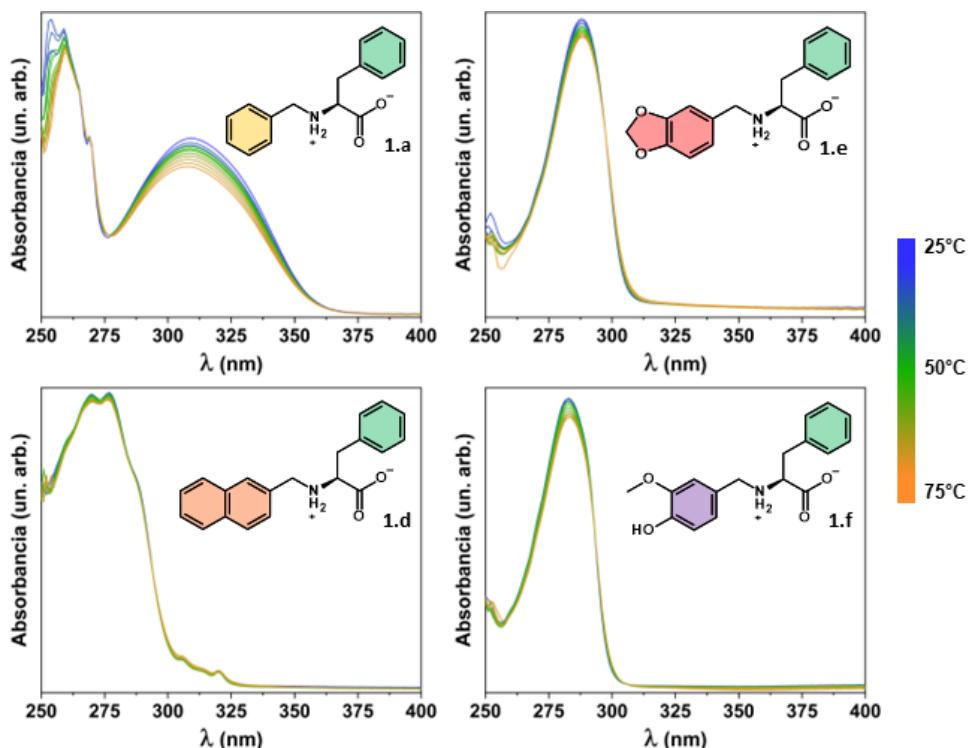


Figura 26. Estudio mediante espectroscopía UV-Visa temperatura variable para los derivados de L-Fenilalanina en DMSO.

Los espectros UV-Vis de los derivados de L-Fenilalanina a 25°C en DMSO muestran algunas diferencias entre sí, y también con respecto al aminoácido precursor (Figura 26). El derivado **1.a** presenta bandas muy similares a las observadas para la L-Fenilalanina, pero con un incremento en la intensidad de la señal ancha alrededor de 320nm. Estas bandas parecieran conservarse también para **1.d**, pero con cierto corrimiento

que hace que salgan superpuestas. Los espectros de **1.e** y **1.f** muestran una señal intensa centrada en ~280nm, que podría deberse a la superposición de al menos dos bandas.

En los experimentos a temperatura variable, en líneas generales, parecen no haber cambios para la mayoría de los miembros de la familia salvo para el compuesto **1.a** (derivado de L-Fenilalanina con benzaldehído), que presenta una disminución porcentual del 17.6% (~4% por encima del ruido térmico), para la banda centrada en 308nm. Así como se discutió para la L-Fenilalanina, se espera que estos derivados no presenten aductos supramoleculares estables en estas condiciones. O bien, que estos se desarrolle a través de interacciones electrostáticas entre el amonio y el carboxilato y no requieran inducir grandes alteraciones conformacionales en la molécula. No obstante, debido al carácter divergente del residuo aldehídico, sí es probable que para el derivado de la vainillina se desarrollen diferentes tipos de superestructuras.

Por otro lado, para el derivado de benzaldehído, el factor estérico y la alteración en la polaridad podrían estar induciendo de manera inespecífica la disminución observada. Esta podría generarse debido a un proceso de ensamblado inespecífico que está asistido por el efecto entrópico del solvente. A medida que la temperatura aumenta, el solvente aumenta considerablemente su energía cinética, lo que podría promocionar la agrupación de las moléculas de mayor tamaño. Estas, a su vez, podrían desarrollar interacciones entre sí, gracias a la inespecificidad y el alcance de las interacciones dispersivas.

Realizar un análisis comparativo entre las señales observadas en cada compuesto y las señales de los precursores es particularmente desafiante debido a que las bandas estudiadas corresponden a la región aromática de la molécula, y en todos los casos la misma sufre el aporte de ambos anillos. Sin embargo, es posible notar que tanto el compuesto **1.a** como el **1.d** conservan el aspecto vibriónico de la banda de mayor energía. Esto podría deberse a que ambos compuestos no presentan oxígenos directamente ligados a la estructura aromática, los cuales alterarían la distribución y la simetría de la densidad electrónica sobre estos cromóforos.⁶¹ Los otros dos compuestos, por el contrario, cuentan con la presencia de estos heteroátomos interactuando de forma directa con el anillo a través del enlace covalente. Esto genera que se estabilicen y mezclen algunos de los estados excitados y se fomenten transiciones similares en energía, lo cual da lugar a bandas anchas.

Los espectros UV-Vis de los derivados de L-Fenilalanina a 25°C en agua básica muestran algunas diferencias entre sí, y también con respecto al aminoácido precursor (Figura 27). Se observa la definición de las bandas más intensas centradas en ~220nm, un aumento de la intensidad de la señal ancha centrada en ~260 nm para **1.a** y **1.d** y la aparición de al menos dos bandas anchas centradas en ~240 y ~280 nm para **1.e** y **1.f**.

Para los experimentos a temperatura variable los resultados obtenidos demuestran que casi ninguno de los miembros presenta cambios apreciables, salvo por el compuesto **1.f** (derivado de vainillina), para el cual se observa una alteración muy similar a la observada para la L-Tirosina (Figura 27). Este cambio podría estar asociado a la formación de ensambles supramoleculares extendidos análogos a los desarrollados en la red cristalina de su switerión (Figura 7), producto de la presencia del grupo hidroxilo terminal aportado por el fragmento proveniente de la vainillina. Más allá de la entidad supramolecular

desarrollada, es claro que esta derivatización genera un impacto muy importante en las propiedades supramoleculares con respecto al aminoácido precursor y a los otros derivados, dando lugar a una respuesta más cercana a lo esperado para la L-Tirosina, aunque este fragmento no esté explícitamente presente en la estructura molecular del compuesto.

Para el resto de los compuestos, se observó un comportamiento similar al propuesto para L-Fenilalanina en medio básico, lo cual es consistente con lo esperado en base al análisis de sus estructuras moleculares. Este resultado pone de manifiesto nuevamente lo increíblemente versátiles que pueden ser estos compuestos y lo muy desafiante que puede llegar a ser predecir un resultado basándose únicamente en la extrapolación del comportamiento de sus precursores.

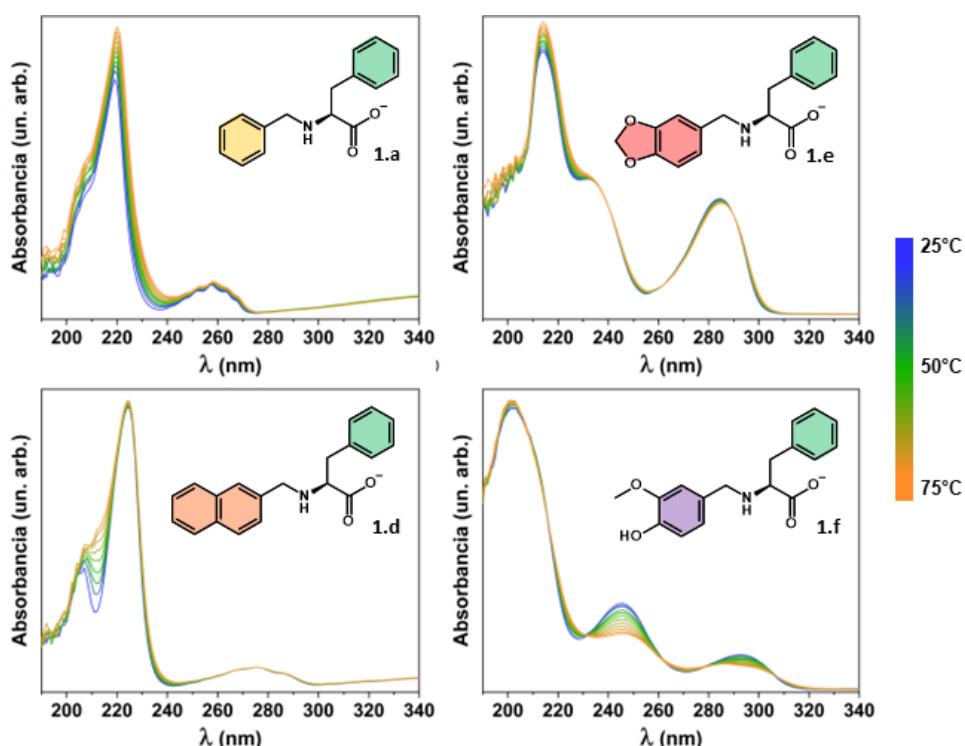


Figura 27. Estudio mediante espectroscopia UV-Vis a temperatura variable para los derivados de L-Fenilalanina en una solución acuosa de NaOH 0,1M.

Los espectros de los derivados de L-Tirosina en DMSO a 25°C no muestran cambios apreciables con respecto al del precursor (Figura 28). Para todos ellos se evidencia una banda ancha intensa centrada en ~280 nm, producto de la superposición de varias señales. En el caso puntual de los compuestos **2.a** y **2.d** se observa, además, un leve ensanchamiento que podría deberse a la superposición de diversas transiciones a energías similares. Los experimentos a temperatura variable tampoco muestran cambios apreciables para ninguno de estos compuestos. Estos resultados son consistentes con la idea de que, en solución y en las condiciones del experimento, tanto la L-Tirosina como sus derivados, al estar en estado switeriónico, es probable que formen dímeros muy estables que no son susceptibles a un proceso de desensamblado ni a cambios conformatacionales.

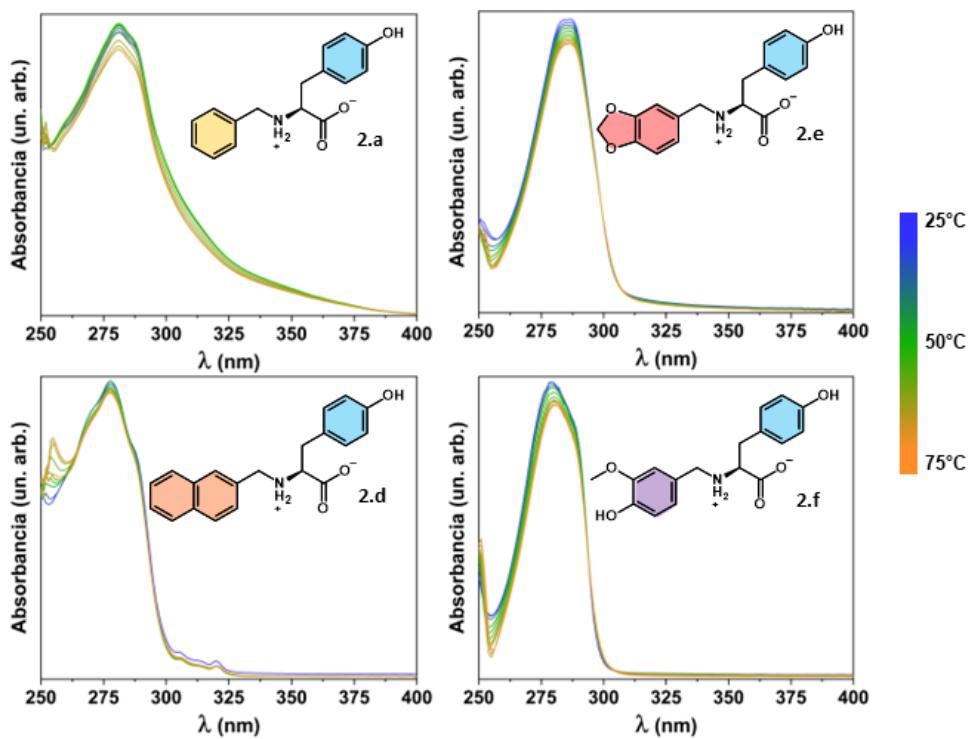


Figura 28. Estudio mediante espectroscopía UV-Visa temperatura variable para los derivados de L-Tirosina en DMSO.

Por otro lado, los espectros UV-Vis de los derivados de L-Tirosina a 25°C en agua básica muestran un comportamiento similar al del aminoácido precursor (Figura 29). Se observa una banda principal más intensa centrada en ~210-220nm, dependiendo del compuesto, y varias señales anchas y de mediana o baja intensidad en el rango ~240-280 nm. De todos los compuestos, sin embargo, el derivado **2.d** es el que presenta un conjunto de señales con menor grado de similitud con el resto y con el precursor.

Al analizar los resultados obtenidos al cambiar la temperatura se puede apreciar un patrón de cambios muy similar al observado para el aminoácido precursor (Figura 29). La formación y desaparición de picos, junto con la presencia de puntos isosbésticos, podría estar indicando nuevamente el desarrollo de un cambio estructural a medida que la temperatura aumenta. Es importante notar que, además de los cambios sufridos por la nube electrónica de los anillos aromáticos fenólicos que se discutió para la L-Tirosina, estos compuestos presentan la necesidad de adquirir una conformación que oriente correctamente tanto el grupo amino como el hidroxilo terminal. Si se diera la pérdida de esta conformación durante el desensamblado de las arquitecturas supramoleculares se alteraría de manera considerable el entorno molecular del cromóforo y esto se vería reflejado en diversas alteraciones del espectro de absorción.

A diferencia del resto de la familia de derivados, el compuesto **2.d** (derivado de naftaldehído) casi no presenta cambios espectrales al variar la temperatura. Esto podría deberse a que el cambio conformacional sufrido por este compuesto no es tan drástico como los otros, o que este compuesto no ha logrado conformar entidades supramoleculares estables en solución que se estén desestabilizando.

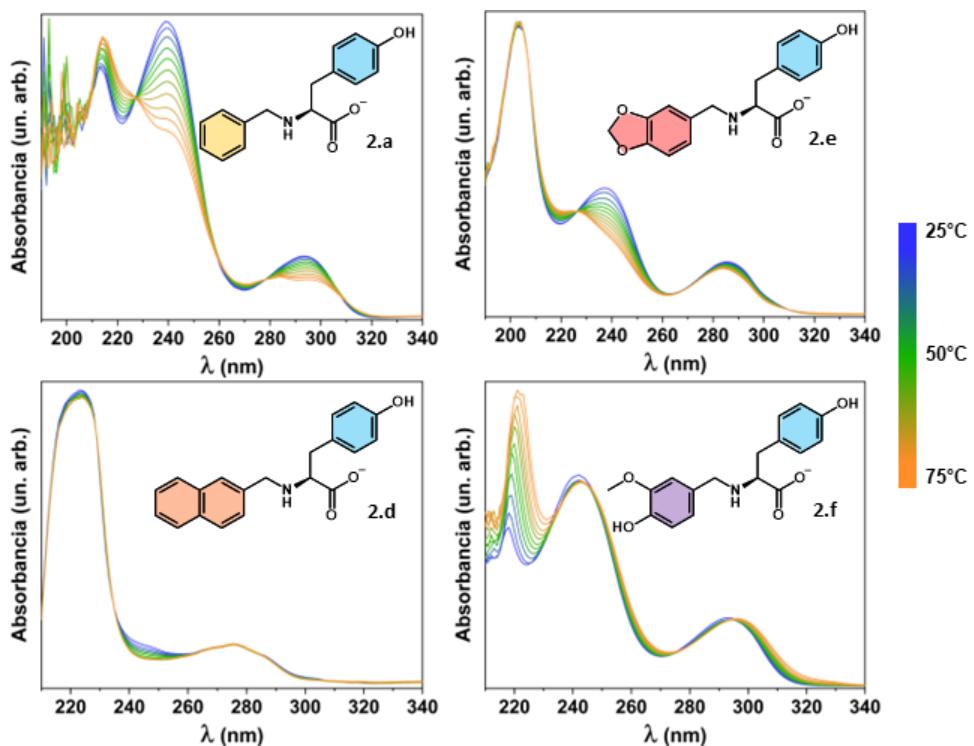


Figura 29. Estudio mediante espectroscopía UV-Visa temperatura variable para los derivados de L-Tirosina en una solución acuosa de NaOH 0,1M.

Aunque la posible formación de arquitecturas supramoleculares en solución parece ser suficiente para explicar los cambios espectrales observados, este aspecto ahora dispara un nuevo interrogante, ¿cuál es el estado conformacional del monómero en solución luego de desensamblarse? Considerando que el monómero libre en solución actuará como bloque de construcción para el resto de las arquitecturas de orden superior, contar con información sobre su estado conformacional a una dada temperatura podría ayudar a predecir los mecanismos de su ensamblado.

Con el objetivo de poder identificar la naturaleza de los cambios espectroscópicos observados fue realizado un análisis empleando DFT dependiente del tiempo (TD-DFT) sobre estructuras diméricas y monoméricas de todos estos compuestos. Por cuestiones de extensión, los resultados de este análisis y su correspondiente discusión se encuentran detallados en el material suplementario de este capítulo. Si bien es posible establecer algunas conclusiones parciales de utilidad, la totalidad de los resultados de estos cálculos no fueron concluyentes debido a que, probablemente, es necesario emplear un modelo que describa de forma más rigurosa los ensambles supramoleculares.

Estudios mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear

En primera instancia, al realizar los experimentos de resonancia magnética nuclear de H^1 a temperatura variable para L-Fenilalanina y L-Tirosina, no se observaron cambios de ningún tipo en las condiciones empleadas en toda la ventana espectral estudiada (Figura 30, paneles superiores). Estos resultados son consistentes con los cambios sutiles que se producen al alterar la química conformacional de estas dos sustancias. Estos compuestos presentan una barrera conformacional muy pequeña frente a la libre rotación

de sus enlaces, lo que permite que coexistan a cada temperatura una amplia diversidad de confórmeros, casi degenerados en energía. Sin embargo, hubiera sido esperable apreciar algún tipo de alteración en las señales asignadas a la región aromática de la L-Tirosina, siendo que estas están directamente relacionadas con los cambios observados en los experimentos de UV-Vis a temperatura variable. El hecho de que no se evidenció ninguna alteración en todo el rango de temperaturas estudiadas podría deberse a una compensación entre el efecto protector que implica recobrar la densidad electrónica en el anillo luego de desensamblarse y el efecto desprotector que se genera debido a la pérdida del cono de protección generado por el apilamiento aromático sobre estos hidrógenos. Debido a que el desplazamiento químico de una dada señal está dado por un complejo entramado de factores actuando todos al mismo tiempo sobre el mismo núcleo, no es posible predecir en todos los casos cuál será el resultado final de un dado cambio sobre un parámetro que depende intrínsecamente de tantas condiciones.

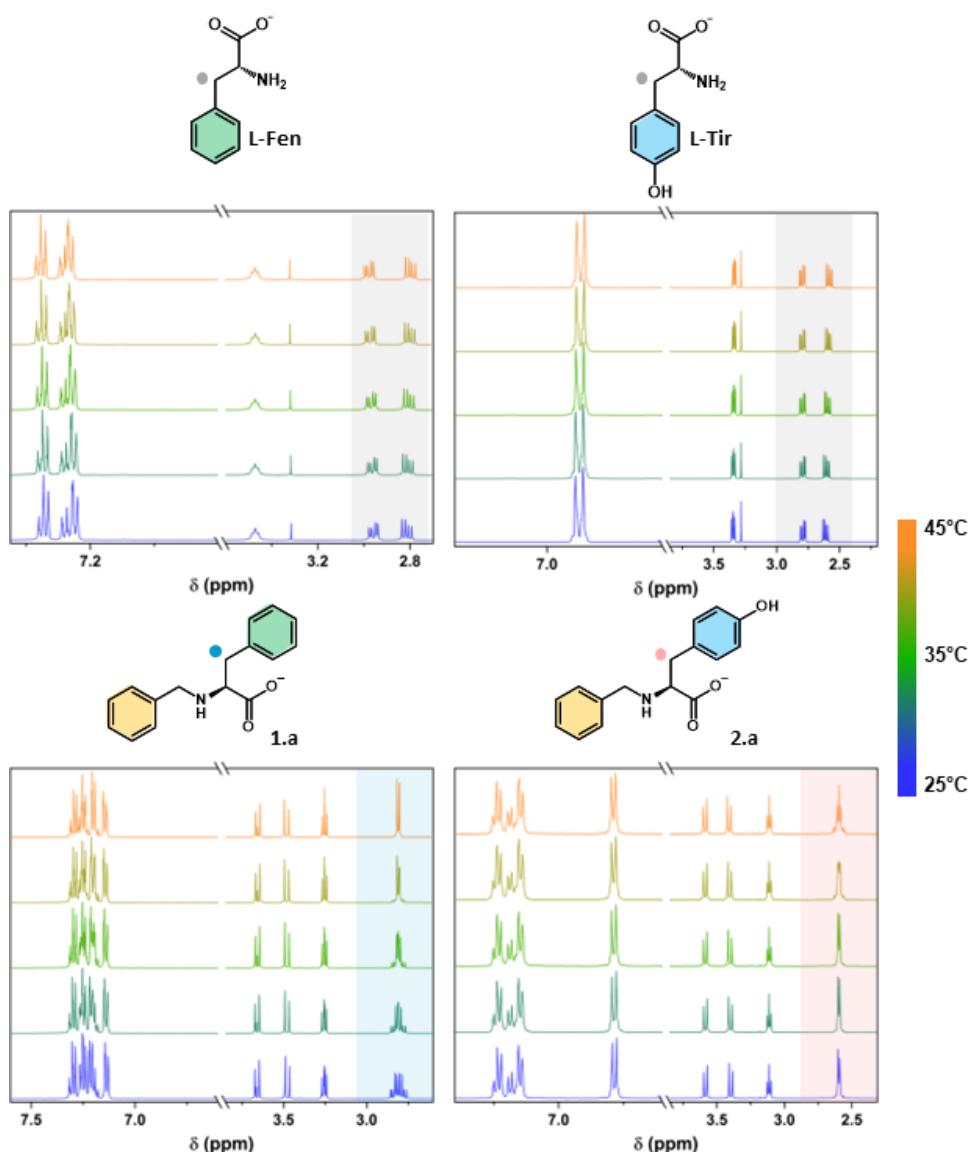


Figura 30. Espectros de RMN ^1H en solución acuosa básica de L-Fenilalanina, L-Tirosina y los compuestos **1.a** y **2.a** a distinta temperatura.

Para soluciones de los compuestos **1.a** y **2.a** (derivados de benzaldehído) en las mismas condiciones de los experimentos realizados para los aminoácidos precursores, se detectaron cambios apreciables en las señales correspondientes al grupo $-\text{CH}_2-$ aminoacídico que está acoplado al centro estereogénico heredado de la estructura aminoacídica (Figura 30, paneles inferiores). En ambos se observa una alteración en el grado de desdoblamiento de esta señal, mientras que todo el resto del espectro, en ambos casos, parece no desarrollar ningún otro tipo de cambio apreciable.

Para el caso del compuesto **1.a** la alteración se manifiesta como una pérdida del acoplamiento entre los núcleos, lo que da como resultado la coalescencia de la señal desdoblada en un doblete. Al contrario, para el compuesto **2.a** la señal se ensancha y desdobra, dando la sensación de que el aumento de la temperatura hubiera generado que el entorno de los hidrógenos metilénicos fuera claramente distinguible.

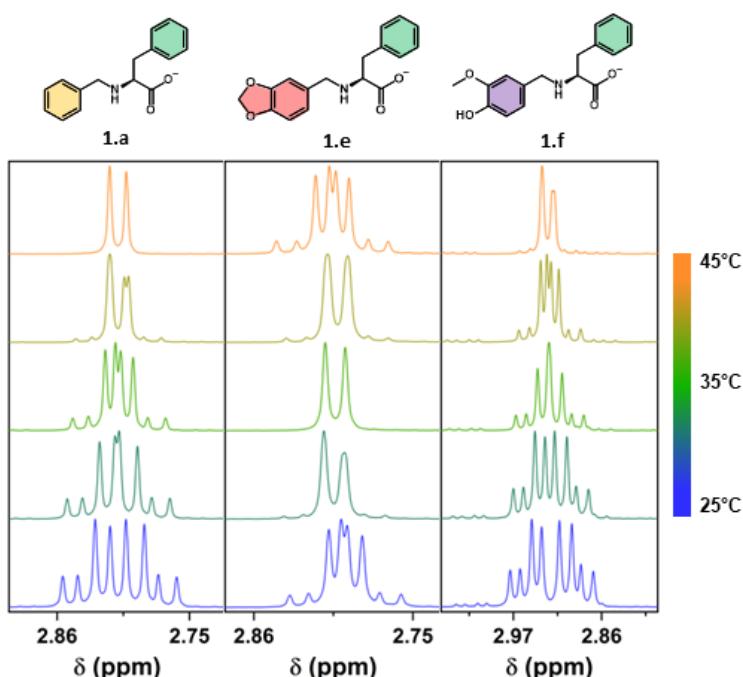


Figura 31. Detalle de la señal correspondiente al grupo $-\text{CH}_2-$ aminoacídico en los espectros de RMN ^1H en solución acuosa básica de los compuestos **1.a**, **1.e** y **1.f** a distinta temperatura.

Al extender este mismo análisis para el resto de los compuestos de ambas familias se observa que, para la familia de los derivados de L-Fenilalanina, todos parecen coalecer a medida que aumenta la temperatura, salvo el compuesto **1.e**, para el cual la señal de referencia coalece y luego vuelve a desdoblarse (Figura 31). Por otro lado, para la familia de los derivados de L-Tirosina, el aumento en la temperatura parece dar lugar al desdoblamiento de esta misma señal para **2.a** y **2.e**, aunque el compuesto **2.f** presenta una multiplicidad desafiante y poco concluyente a temperatura ambiente, pero al aumentar la temperatura la misma pareciera coalecer (Figura 32). Los derivados del 2-naftaldehído con ambos aminoácidos no pudieron ser estudiados por esta metodología debido a su baja solubilidad en agua básica.

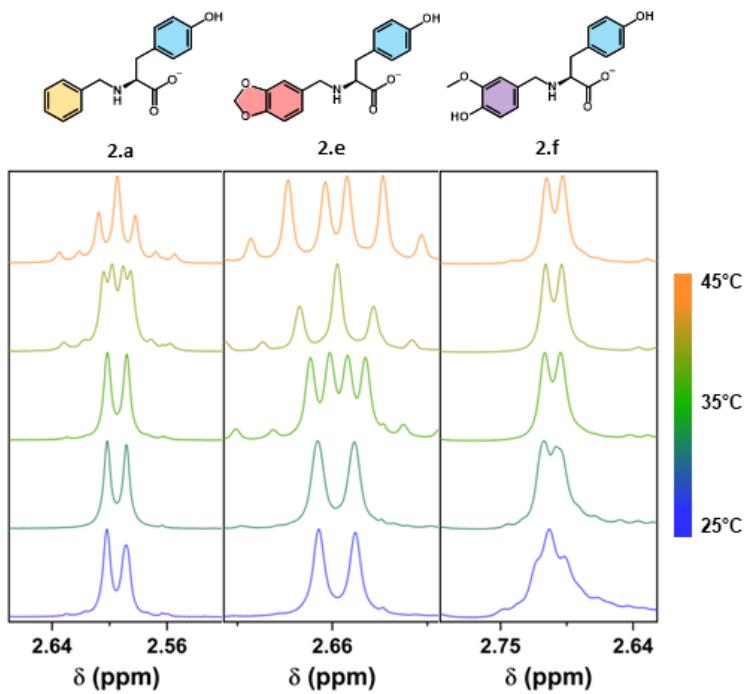


Figura 32. Detalle de la señal correspondiente al grupo —CH₂— aminoacídico en los espectros de RMN-¹H en solución acuosa básica de los compuestos **2.a**, **2.e** y **2.f** a distinta temperatura.

Lo observado en estos experimentos de RMN-¹H guarda cierta correlación con los resultados obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis. Como se discutió en el inicio del apartado de caracterización de la química supramolecular en solución, si consideramos que los cambios espectrales observados para los experimentos de RMN-¹H están directamente relacionados con alteraciones en el estado conformacional de las moléculas, entonces la coalescencia observada para las señales de referencia podría estar indicando la adquisición de un grado de libertad conformacional dado principalmente por la libre rotación del grupo metilénico. Esta situación es inconsistente con la presencia de estados configuracionales plegados, tanto sea en los monómeros como en las entidades supramoleculares. Por lo tanto, esta observación podría ser un indicativo de la existencia de una transición desde los estados conformacionales plegados y hacia los desplegados.

En resumen, los resultados para los derivados de L-Fenilalanina **1.a** y **1.f** demuestran que, a temperatura ambiente, el grado de rigidez es mayor, dando lugar a que la señal de referencia se encuentre desdoblada. Esto puede ocurrir tanto como consecuencia de la existencia de una estructura supramolecular multimérica estable, o una estructura monomérica rígida. Esta última podría tratarse de un estado plegado solvatado, por ejemplo. Al aumentar la temperatura, la libertad conformacional de la estructura aumenta notablemente, lo que conduce a la coalescencia de la señal de referencia. Este estado podría corresponderse tanto con la ruptura del agregado supramolecular en monómeros desplegados o bien, en el caso de existir como monómeros plegados a temperatura ambiente, a la adquisición de una configuración desplegada, o de menor rigidez relativa.

En el caso del compuesto **1.e** podría estar desarrollándose un fenómeno equivalente al incrementar la temperatura desde la temperatura ambiente hasta 35 °C. Sin

embargo, a temperaturas superiores se podría estar generando algún tipo de arreglo supramolecular estable que le volvería a conferir rigidez al sistema.

El resultado obtenido por RMN-¹H para los derivados de L-Fenilalanina guarda cierta correlación con lo observado en los de espectroscopía UV-vis, aunque no es posible identificar con certeza la existencia de una estructura tipo dimérica (o de orden superior) en solución. No se descarta que exista algún tipo de agregado, pero no es tan claro como ocurre para los derivados de L-Tirosina, los cuales pudieron correlacionarse también con los resultados cristalográficos. No obstante, sí es posible identificar que durante los experimentos en solución a temperatura variable ocurren claros cambios conformacionales.

Por otro lado, el desdoblamiento observado para los compuestos derivados de L-Tirosina también está indicando cambios conformacionales, pero esta vez a favor de la obtención de entidades con mayor rigidez, en las cuales la libre rotación se encuentra restringida. Si consideramos que la espectroscopía UV-Vis permitió observar la existencia en solución de entidades supramoleculares diméricas que se pierden al aumentar la temperatura, es posible construir una idea del mecanismo de desensamblaje partiendo desde las entidades diméricas propuestas. Al aumentar la temperatura y propiciar la separación en monómeros, estos podrían, *a priori*, acceder a al menos dos estados conformacionales posibles. Pero, de estos dos, sólo el confórmero plegado favorece el apilamiento aromático y el desarrollo de interacciones intramoleculares, tanto dipolares como de puente de hidrógeno cuando estas son posibles.

Por lo tanto, con este resultado como referencia, y así como se anticipó en base a las estructuras cristalinas, se puede proponer que en solución a temperatura ambiente los derivados de L-Tirosina **2.a** y **2.e** están formando dímeros supramoleculares estables en los que el núcleo dimérico se conserva. Pero, gracias a la libertad conformacional de estos compuestos, el resto de la molécula que no está directamente involucrado en la formación del núcleo dimérico puede adquirir diferentes orientaciones posibles. Todas estas generarían cambios leves en el entorno molecular alrededor de los hidrógenos metilénicos y el hidrógeno quiral. Al realizar el experimento de resonancia magnética nuclear sobre esta población tan diversa de estados conformacionales obtendremos un “resultado promediado sobre todas ellas”, el cual daría una señal ancha compuesta por las diferentes posibilidades de núcleos en entornos “casi equivalentes” entre sí. A medida que este dímero se desensambla conforme aumenta la temperatura y el monómero tiende a adquirir el estado conformacional mayoritario, esta cantidad de posibles conformaciones disminuye y da como resultado el conjunto de señales correspondiente a la situación en la que ambos hidrógenos metilénicos ya no presentan entornos químicos equivalentes.

El compuesto **2.f** a temperatura ambiente presenta una un conjunto de señales anchas y poco resueltas, consistente con una muestra que presenta restos de sólido en suspensión. A medida que la temperatura aumenta esta señal se define, lo cual podría deberse a que aumenta la solubilidad. Pero, una vez disuelto, la señal resultante pareciera corresponder a la situación de coalescencia, probablemente siguiendo un comportamiento similar al descrito para los derivados de L-Fenilalanina (conformación desplegada y menos rígida). Este compuesto en particular presenta un marcado carácter divergente que favorece la formación de interacciones inter e intramoleculares tanto en su configuración

plegada como desplegada. Considerando que ambas conformaciones parecen, *a priori*, entálpicamente equivalente, es coherente que la conformación desplegada sea la seleccionada en el monómero ya que esta favorece el apilamiento y disminuye la intensidad de las fuerzas entrópicas.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para las espectroscopías electrónicas y de resonancia magnética nuclear en agua básica para cada compuesto. Se incluye también el carácter convergente o divergente de los residuos de cada compuesto a modo de resumen de los resultados obtenidos por cristalografía, y debido a que serán relevantes para contextualizar la discusión siguiente. Los resultados de UV-Vis en DMSO no se incluyen debido a que no observaron cambios apreciables para ninguno de los compuestos ni los aminoácidos precursores.

Tabla 1. Resumen de los resultados de las espectroscopías a temperatura variable en solución acuosa básica para cada compuesto, y el carácter supramolecular de sus residuos.

	RMN	UV-Vis (Hipo/Hiperchromismo)	Carácter de sus residuos	
	señal CH ₂	Agua Básica	AA	Aldehído
1	No cambia	No	Convergente	-
1.a	Coalece	Leve	Convergente	Convergente
1.d	-	No	Convergente	Convergente
1.e	Coalece, luego desdobra	Leve	Convergente	Dual
1.f	Coalece	Si	Convergente	Divergente
2	No cambia	Si	Divergente	-
2.a	Desdobra	Si	Divergente	Convergente
2.d	-	No	Divergente	Convergente
2.e	Desdobra	Si	Divergente	Dual
2.f	Coalece*	Si	Divergente	Divergente

*efecto que se observa una vez que se completa la solubilidad del compuesto

Simulación computacional para el estudio conformacional en solución

Con el objetivo de estudiar tanto el proceso de desensamblaje de entidades supramoleculares, como la transición configuracional asociada al plegamiento o despliegamiento, se evaluaron las propiedades termodinámicas de los diferentes compuestos basándose en el modelo de coexistencia de 4 posibles especies introducidos a inicio de este apartado (Figura 24). Esto se realizó empleando los valores de entalpía y entropía que se obtienen como resultado de los cálculos de termoquímica para cada molécula/ion y sus respectivos dímeros, plegados y desplegados (Figura 23 y Figura 22), calculando el valor de la energía libre asociada a cada especie a una dada temperatura. Las temperaturas utilizadas fueron elegidas para poder extender el análisis del proceso de formación de entidades supramoleculares a todo el rango de temperaturas que permite el solvente.

Para calcular el valor de ΔG asociado a un proceso de ensamblado (ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D en la Figura 24) se restó el valor de la energía libre del dímero correspondiente menos la energía libre de Gibbs de dos moléculas/iones independientes en el estado configuracional que se desea estudiar. Para calcular el valor de ΔG asociado a un proceso de desplegamiento de un confórmero (ΔG_{Desp}^m y ΔG_{Desp}^s en la Figura 24), tanto sea de un dímero como de un monómero, se restó el valor del confórmero desplegado menos el valor del confórmero plegado.

Es importante notar que todos estos valores tienen que ser corregidos por el número de puentes de hidrógeno que se forman de manera explícita en las distintas estructuras comparadas, luego de realizar la optimización geométrica. Esta corrección es necesaria debido a que, en ninguna de las optimizaciones geométricas realizadas, han podido agregarse de manera explícita las moléculas de solvente que estarían actuando como donoras de puente de hidrógeno. Por lo tanto, al no poder introducir explícitamente este factor, la energía obtenida para el compuesto que haya podido desarrollar puentes de hidrógeno en el sistema (por ejemplo, los monómeros que conforman un dímero, o los monómeros plegados interactuando intramolecularmente) sufriría una disminución artificial respecto a la energía la sustancia con la que se compare.

Para construir los dímeros supramoleculares de los derivados de L-Tirosina empleados para los cálculos de optimización geométrica y termoquímica se utilizó como estructura de partida los dímeros observados en las estructuras determinadas por difracción de rayos X. Para el caso del compuesto **2.f**, dado que este dio lugar a redes extendidas que no presentaban el núcleo dimérico característico, se construyó el dímero partiendo de una estructura equivalente del compuesto **2.e** y realizando las alteraciones correspondientes sobre el piperonal. En el caso de los derivados de L-Fenilalanina, se construyeron utilizando una entidad dimérica del arreglo supramolecular descrito en las estructuras cristalinas reportadas para este aminoácido en bibliografía,⁶⁵ la cual se caracteriza por la presencia de interacciones entre cargas opuestas que conforman un “cierre electroestático” entre los centros aminoacídicos, y localizan los residuos por encima y por debajo de este.

Para todos los casos se emplearon las estructuras cristalinas disponibles en bibliografía o las determinadas en nuestro grupo como punto de partida para construir las geometrías de partida para realizar los cálculos de estructura electrónica. En todos aquellos casos en los que se pudo observar un confórmero desplegado en la estructura cristalina, este fue utilizado como base para la construcción del dímero desplegado. En el caso de las estructuras que no presentaron el estado de carga, o la quiralidad deseada, la misma se adaptó removiendo los contraíones y distribuyendo los hidrógenos de forma tal de complacer ambos requerimientos (Figura 22). Para la construcción de los dímeros plegados se empleó una metodología similar, pero utilizando como molde de construcción las estructuras plegadas previamente obtenidas para algunos de estos compuestos (Figura 16) y extrapolando las estructuras al resto de los ligandos (Figura 23).

Todos los dímeros construidos fueron previamente optimizados empleando mecánica molecular a través de un campo de fuerzas universal con el fin de disminuir el efecto de la congestión estérica y garantizar que las estructuras de partidas estuvieran cercanas a un mínimo local de energía.

En la Figura 33 y la Figura 34 (Tabla S11 del material suplementario) se muestran los valores de ΔG_{Desp}^m , ΔG_{Desp}^s , ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D calculados para todos los compuestos, empleando DMSO como solvente, a temperatura ambiente y a la temperatura de ebullición de este, considerada como temperatura máxima posible de trabajo. El valor de energía indicado corresponde al sentido de la reacción según la flecha que se ubica más cercano al mismo.

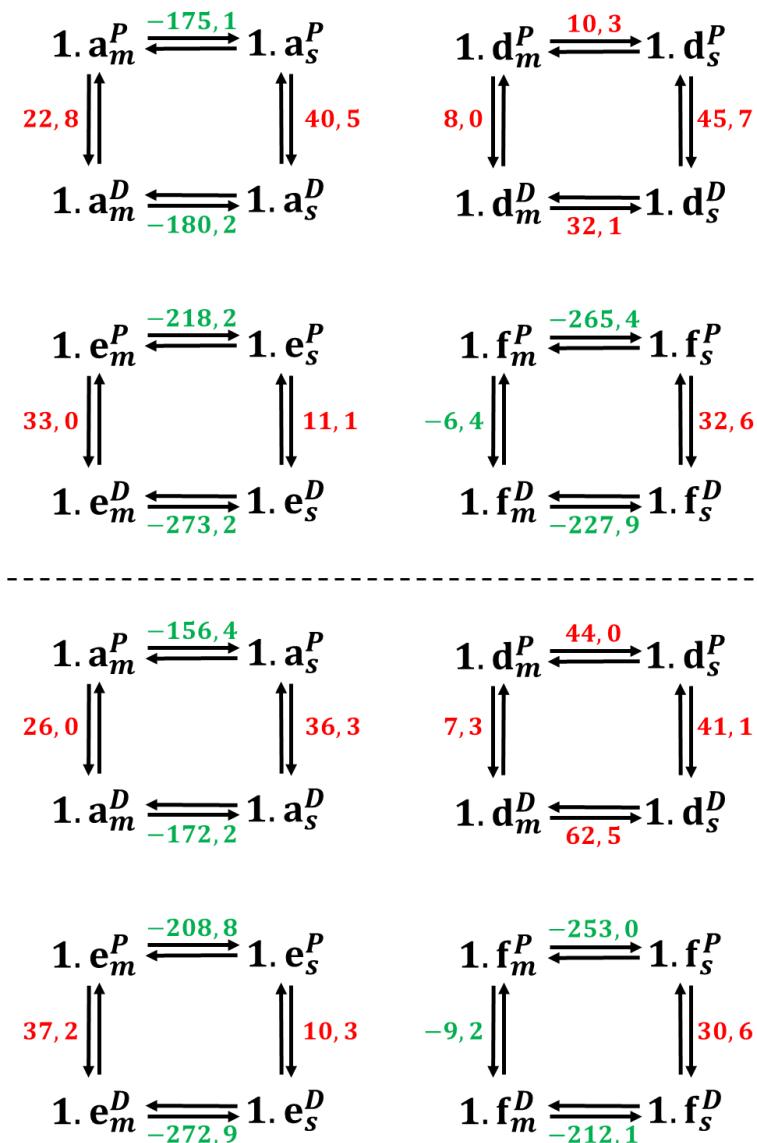


Figura 33. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de despliegamiento y dimerización de todos los derivados de L-Fenilalanina en DMSO a temperatura ambiente (arriba) y a la temperatura de ebullición del solvente (abajo). Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo del valor de la energía térmica a esa temperatura (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol.

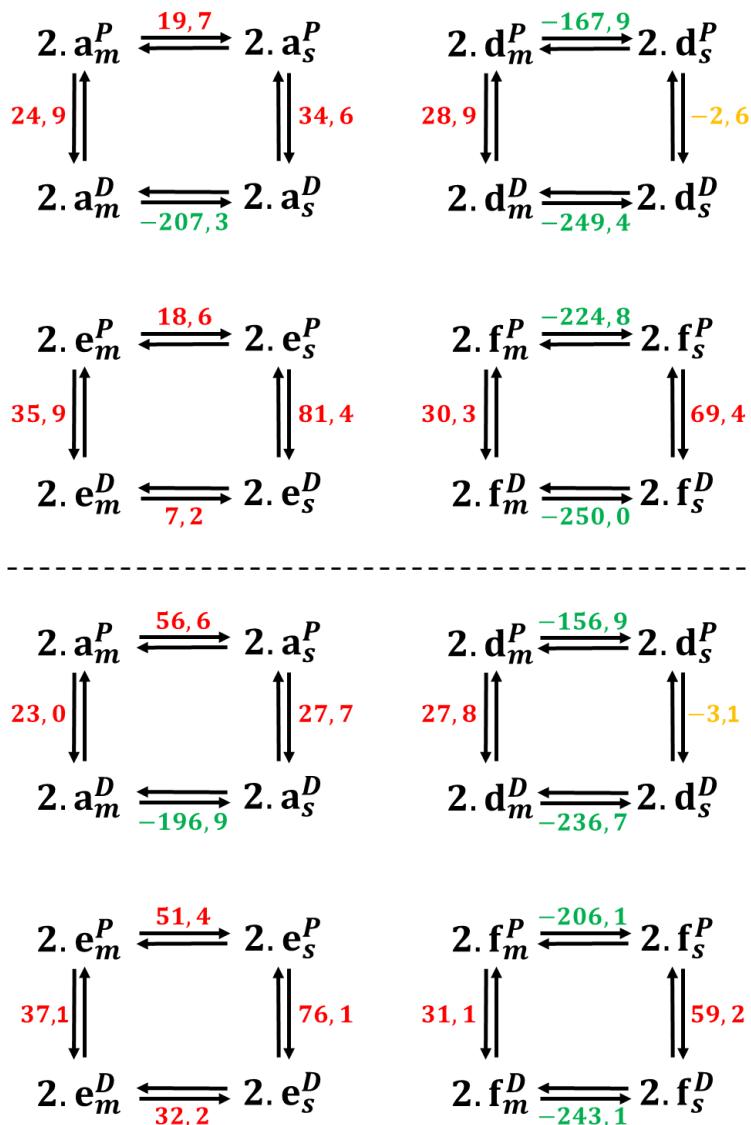


Figura 34. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los derivados de L-Tirosina en DMSO a temperatura ambiente (arriba) y a la temperatura de ebullición del solvente (abajo). Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo del valor de la energía térmica a esa temperatura (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol.

En líneas generales podemos observar que todos los compuestos parecen tener una clara preferencia por la formación de aductos diméricos (estado *s*), tanto sea empleando monómeros (*m*) plegados (*P*) o desplegados (*D*). Esto se evidencia por los valores negativos de la energía libre Gibbs asociados a los procesos de ensamblado de los dímeros y contrasta con los valores positivos de energía libre de Gibbs obtenidos para los fenómenos de despliegamiento.

Sin embargo, esto no se cumple para el caso de los compuestos **1.d** y **2.e**. Para el caso del compuesto **1.d** (derivado de naftaleno de L-Fenilalanina), sus cuatro parámetros termodinámicos son positivos, lo cual podría ser una sugerencia de que el estado monomérico plegado es el predominante. Este resultado es consistente con lo observado previamente en los experimentos de espectroscopía electrónica a temperatura variable y

la hipótesis propuesta de que el impedimento estérico podría estar inhibiendo la formación de arquitecturas supramoleculares bien definidas.

Por el contrario, para el caso del compuesto **2.e** (derivado de piperonal de L-Tirosina), se observa una tendencia análoga, el cual es un resultado inesperado. Sin embargo, el valor de energía libre de Gibbs obtenido para la formación del ensamblaje dimérico desplegado está muy cercano al valor de la energía térmica a esa temperatura (7,2 vs. 5,76 kJ/mol). En resumen, según los cálculos, es probable la coexistencia tanto de monómeros libres y como entidades supramoleculares en solución.

Al analizar lo que sucede al aumentar la temperatura se observa que la tendencia general es la misma, con una marcada preferencia por la formación de las entidades supramoleculares en solución, independientemente del estado conformacional empleado. Para simplificar el análisis se confeccionó la tabla S12, en la que se calcula la diferencia obtenida por el aumento de la temperatura en todos los parámetros. Analizando estos resultados se observa la tendencia propuesta en base a los resultados experimentales: la formación de entidades supramoleculares se desfavorece en absolutamente todos los compuestos, y la adquisición de un estado desplegado se ve favorecida, tanto para algunos monómeros como para todos los dímeros.

Por otro lado, la nula o prácticamente indetectable variación producida al cambiar la temperatura en los experimentos de espectroscopía electrónica realizados en DMSO es consistente con el hecho de que, al variar la temperatura en los cálculos, no se observa cambios en las tendencias observadas a temperatura ambiente.

Esta misma metodología de análisis de los parámetros termoquímicos fue empleada para estudiar qué sucede con estos compuestos en agua en medio básico a temperatura ambiente y al variar la temperatura. En la Figura 35 y la Figura 36 (Tablas S13 del material suplementario) se indican los resultados obtenidos para ambas familias.

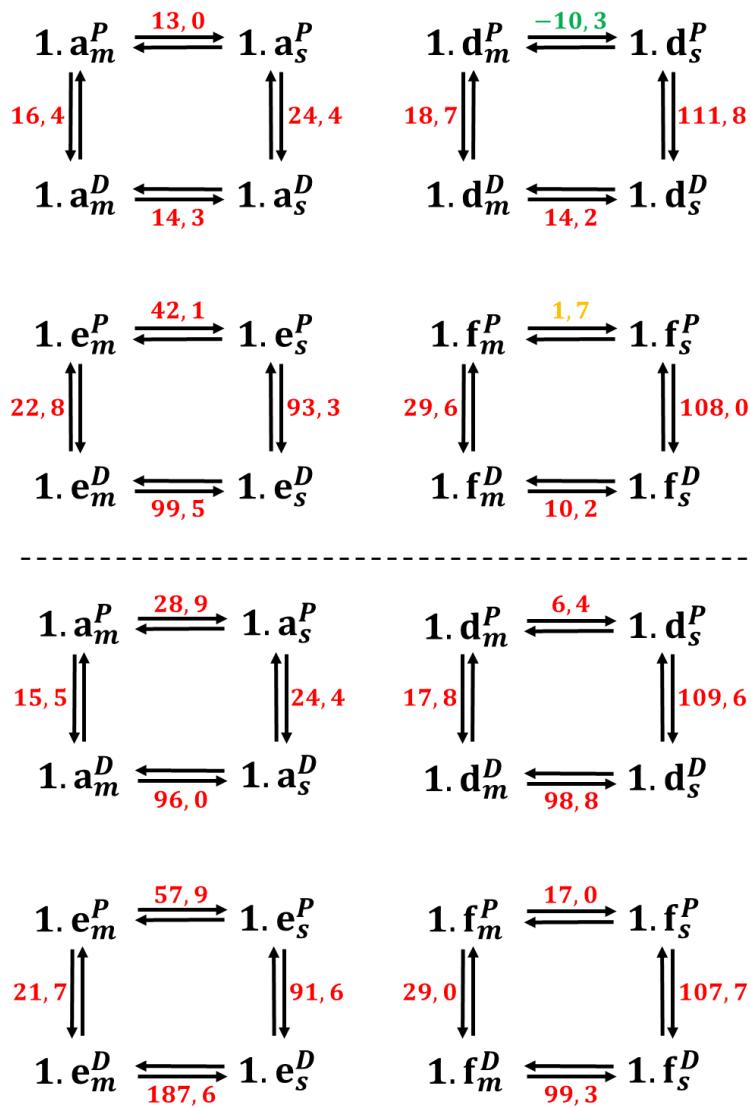


Figura 35. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los derivados de L-Fenilalanina en agua básica a temperatura ambiente (arriba) y a la temperatura de ebullición del solvente (abajo). Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo del valor de la energía térmica a esa temperatura (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol.

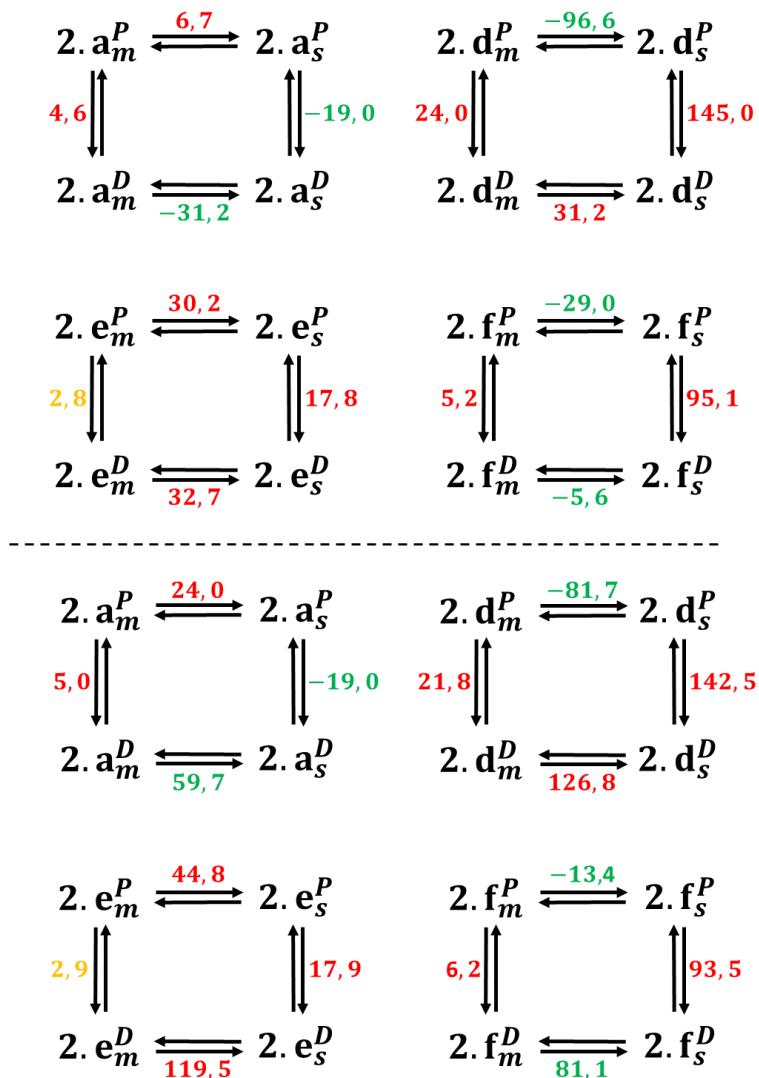


Figura 36. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los derivados de L-Tirosina en agua básica a temperatura ambiente (arriba) y a la temperatura de ebullición del solvente (abajo). Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo del valor de la energía térmica a esa temperatura (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol.

En este caso, al analizar los resultados obtenidos a temperatura ambiente no resulta tan directo poder extraer una tendencia clara. Lo primero que es posible observar es que todos los derivados de la L-Tirosina, salvo el compuesto **2.e**, presentan al menos una entidad dimérica estable en solución. Esto es parcialmente consistente con lo observado en los experimentos de espectroscopía electrónica, para los cuales se había propuesto la formación de entidades supramoleculares que luego se desensamblaban al aumentar la temperatura. Aunque, nuevamente, es desconcertante lo que sucede con el compuesto **2.e**, el cual parece preferir también en estas condiciones, estar como monómero libre en solución, y en la conformación desplegada. Ya veremos más adelante que este resultado, aunque no es del todo consistente con lo observado para la espectroscopía UV-Vis, sí podría ayudar a explicar la marcada cristalinidad que presentaron los materiales supramoleculares obtenidos para este compuesto.

El análisis de la familia de los derivados de L-Fenilalanina es un poco más complejo debido a que no parece haberse establecido una tendencia clara. Aunque una primera aproximación parece indicar que todos los compuestos muestran una preferencia por adquirir un estado conformacional plegado para sus entidades monoméricas, resalta el caso del compuesto **1.d** y **1.f**. El primero parece tener una inesperada preferencia por establecer entidades supramoleculares diméricas a través de la interacción de monómeros plegados. Esta tendencia no se corresponde con lo esperado y sólo puede entenderse en términos de disminuir las fuerzas entrópicas a través de la formación de entidades supramoleculares compactas y densas. Por otro lado, el compuesto **1.f** muestra una tendencia parcial a formar dímeros, en tanto el valor de energía libre de Gibbs asociado al proceso de dimerización a partir de monómeros plegados se encuentra cercano a 0. Esto podría estar sugiriendo que coexisten en solución tanto monómeros plegados como sus respectivas entidades supramoleculares, un resultado consistente con los cambios espectrales vistos durante las espectroscopías.

Al aumentar la temperatura vemos nuevamente la misma tendencia previamente discutida para el caso del DMSO: una marcada prevalencia a favorecer los desplegamientos por encima de las dimerizaciones (Tabla S14). Sin embargo, en este caso sucede algo muy particular al analizar la intensidad de estos cambios, la cual es extremadamente baja. Tanto es así que llega a ser nula para algunos compuestos. Pero esto no es así para las desestabilizaciones sufridas por las entidades diméricas, las cuales se encuentran todas en el rango de los ~15 kJ/mol para los dímeros plegados y ~85k J/mol para los dímeros desplegados. Es mucho mayor el efecto desestabilizante sufrido por las entidades supramoleculares que lo que se favorece el despliegamiento de cualquier entidad en solución. Este resultado es fundamental para explicar lo observado en los experimentos de RMN-¹H dinámicos para estas sustancias.

Aquellas que pudieron ser estudiadas empleando esta metodología presentaron un efecto de desdoblamiento de sus señales que, *a priori*, había sido asignado a la formación de alguna especie en solución que presentara cierto grado de impedimento a la rotación en sus enlaces. El candidato propuesto para cumplir este rol era el monómero plegado. Efectivamente, ahora vemos por cálculos de estructura electrónica que elevar la temperatura parece desestabilizar la formación de entidades supramoleculares de forma tal de que esta no puede ser compensada por el despliegamiento de los monómeros liberados, dando lugar a la estabilización de la especie en la conformación monomérica plegada. En el caso específico del compuesto **1.e** podría llegar a suceder que la temperatura sea suficiente para permitir que se sortee la barrera de activación conformacional y se adquiera la conformación desplegada del monómero, explicando así la tendencia tan peculiar observada para sus señales metilénicas en el RMN. Aunque este último comportamiento no se ve reflejado de manera directa en los resultados de los análisis termoquímicos, la tendencia general parece favorecer esta hipótesis.

En líneas generales podemos concluir que, como se había propuesto inicialmente, todos estos compuestos presentan un marcado detrimento de su tendencia a formar entidades supramoleculares al emplear agua en medio básico. Posiblemente esto provenga de la repulsión electroestática que se genera debido a la carga neta negativa adquirida por todas las especies. No obstante, la acción conjunta de las interacciones no covalentes y las

fuerzas entrópicas asisten a la formación de agregados supramoleculares y permiten que coexistan en solución con sus monómeros.

En base a los resultados expuestos podemos proponer un panorama general de lo que podría estar ocurriendo en solución para sistemas mayoritariamente convergentes y divergentes. Los sistemas duales, que no pueden posicionarse claramente en alguna de estas dos categorías (como el compuesto **1.e**), serán abordados por separado durante la discusión.

Para poder describir la química en solución es necesario enfocarnos en dos características principales. Primero, debemos tener una idea aproximada de cuál podría ser la entidad mayoritaria presente en solución, si los monómeros o los agregados supramoleculares. Para el caso de los sistemas divergentes, y basados en los resultados observados por espectroscopía electrónica y los cálculos DFT, podemos asumir que las entidades mayoritarias en solución son los agregados supramoleculares (Figura 37, entidad A, a la izquierda). Al contrario, basados en estos mismos resultados, para los sistemas convergentes podemos asumir que las entidades mayoritarias son los monómeros plegados (Figura 37, entidad A, a la derecha).

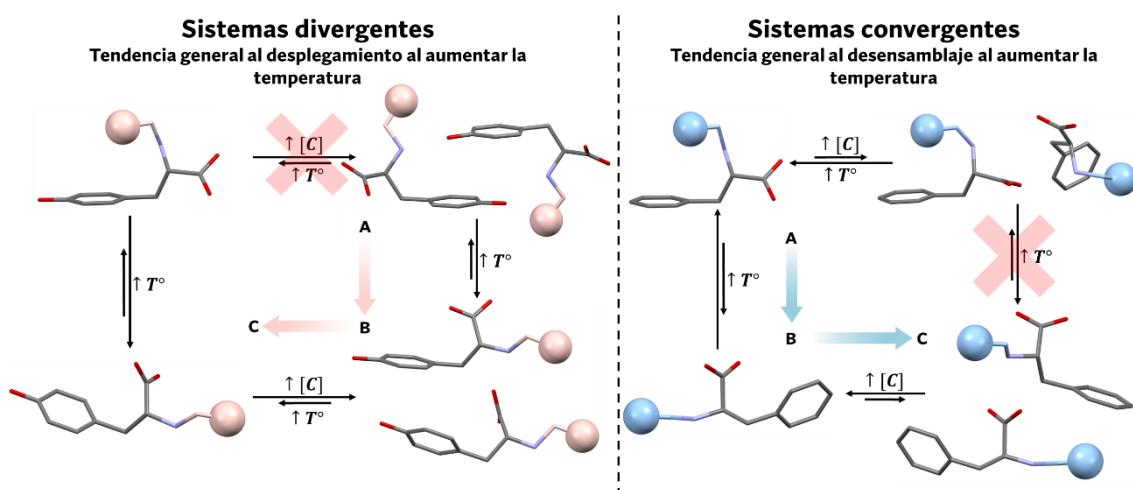


Figura 37. Esquema de resumen de las dos tendencias sugeridas para los fenómenos observados al elevar la temperatura de sistemas convergentes y divergentes. Los sistemas divergentes se representan como derivados de la L-Tirosina y los sistemas convergentes como derivados de la L-Fenilalanina. Los hidrógenos se omiten por claridad. Las esferas de color representan derivatizaciones genéricas de cada aminoácido. Las flechas gruesas representan el mecanismo propuesto al aumentar la temperatura para cada compuesto.

Luego, es necesario poder tener una idea clara de cómo es la barrera energética asociada a la desagregación de las entidades supramoleculares respecto a la asociada al despliegamiento de los confórmeros. Esto se debe a que ambos fenómenos se pueden producir por efecto de un aumento en la temperatura, lo cual implicaría una competencia entre ambos. De forma equivalente se puede decir que, o bien la energía cedida al sistema “se emplea para separar las entidades supramoleculares”, o “se usa para alterar la conformación de los monómeros”, o ambas. Particularmente, para el caso de los sistemas divergentes, los resultados obtenidos por ambas espectroscopías, los cálculos de DFT y los reportes en bibliografía sobre la química en solución de la L-Tirosina,¹⁶ sugieren que la barrera energética asociada a la ruptura de las interacciones no covalentes es mayor que

aquella asignada a la alteración conformacional. Esto conlleva a que este tipo de sistemas sea más proclive “a alterar su conformación que ha desensamblarse” (estructura B en la Figura 37, izquierda). Por el contrario, para los sistemas convergentes, se puede establecer un comportamiento antagónico. En estos sistemas será “más accesible energéticamente que se produzca la ruptura de la entidad supramolecular antes que la alteración conformacional” (estructura B en la Figura 37, derecha).

Con este panorama general en mente, podemos abordar una descripción completa de los resultados obtenidos para la caracterización de la química en solución de todos estos compuestos en ambos solventes.

Primero, para las espectroscopías electrónicas llevadas a cabo en DMSO, podemos asumir que la atracción electroestática es tal que la temperatura alcanzada en el experimento no fue suficiente como para producir una alteración en el ensamble supramolecular, si lo hubiera. Por este motivo, para ninguno de los compuestos fue posible observar algún cambio apreciable.

Segundo, para las espectroscopías llevadas a cabo en agua básica (tanto UV-Vis como RMN), tenemos dos caminos distintos según el sistema:

Para los sistemas divergentes podría estar dándose un mecanismo por pasos donde primero, se produce la alteración conformacional con el agregado supramolecular todavía establecido, para luego dar el desensamblado y la liberación de los monómeros desplegados (Ruta A-B-C del panel izquierdo de la Figura 37). Para estos sistemas, al aumentar la temperatura no se estaría dando una pérdida de la entidad supramolecular, por lo que la flecha de desensamblado por aumento de la temperatura se encuentra tachada.

Para los sistemas convergentes podría estar dándose, también, un mecanismo por pasos. Pero, en este caso, el mecanismo partiría directamente de la alteración conformacional de los estados monoméricos plegados para la formación de los estados desplegados (Flecha A-B del panel derecho de la Figura 37). Es importante notar que, si la temperatura es suficiente como para permitir que la mayoría de las moléculas adquieran el estado conformacional desplegado, podría alcanzarse una concentración tal que el ensamblado de un nuevo tipo de entidad sea espontáneo. Esta entidad sería aquella constituida a partir de la agregación de monómeros desplegados (Flecha B-C del panel derecho de la Figura 37). Este mecanismo, consistente de tres instancias, es el escenario que podría estar dándose para el compuesto **1.e**. Para este tipo de sistemas, el aumento en la temperatura no induce una alteración conformacional, sino que propiciaría el desensamblado de la entidad supramolecular. Para resaltar esta diferencia entre ambos sistemas es que se encuentra tachada la flecha asociada a este fenómeno.

Finalmente, los resultados de DFT también pueden emplearse para analizar si existe una correlación entre los parámetros estructurales calculados para las entidades en solución y las propiedades observadas por microscopía confocal para los materiales obtenidos por precipitación *in situ* (Figura 19, Figura 20 y Figura 21). Considerando el rol troncal que parece tener la difusión molecular en la selección de la vía de descomposición durante la separación de fases, se calculan los factores de forma y los diámetros de colisión de cada entidad en solución para identificar una posible tendencia. La determinación de

estos parámetros se realiza sobre los monómeros plegados en estado aniónico para el caso de **1.a**, **1.e** y **1.d**. Para el compuesto **2.e**, los cálculos se realizaron considerando la estructura dimérica plegada en solución, y para **1** y **2**, se tomaron las entidades diméricas construidas a partir de las coordenadas observadas en sus estructuras cristalinas y empleado datos en solución reportados en bibliografía.^{16,65} En todos los casos las estructuras fueron optimizadas por DFT.

Tabla 2. Tabla de parámetros estructurales calculados sobre las distintas entidades propuestas en solución. La indicación “dim” entre paréntesis implica que el cálculo se realizó sobre una entidad dimérica.

	Ff (u. a.)	Diámetro (Å)	D _{ff} (Å)
1(dim)	3.07	9.63	29.6
2.e(dim)	1.80	12.36	22.2
2(dim)	1.98	9.07	18.0
1.d	1.74	9.12	15.9
1.e	1.73	8.83	15.3
1.a	1.61	8.62	13.9

Al comparar los valores de factor de forma de todas estas entidades se observa que existe una correlación directa con los tiempos de decaimiento de fluorescencia y la morfología de los materiales obtenidos. A medida que el factor de forma aumenta, el tiempo de decaimiento disminuye y se estabiliza, y la morfología de los materiales se vuelve más regular y elongada. Aunque las limitaciones experimentales de la técnica impiden resolver con claridad las formas y los aspectos de las partículas que componen los sólidos obtenidos para **1** y **2.e**, podríamos formular la hipótesis de que estos serían mayoritariamente cristalinos. A modo de ejemplo, y como una prueba indirecta de un comportamiento similar, en los primeros trabajos publicados para los geles de L-Fenilalanina se acuñó el término de “gelificación-cristalización” para describir el carácter cristalino, pero nanoscópico, de sus componentes.⁶⁶

Por otro lado, si se comparan los valores del diámetro de colisión calculado para todas las entidades se encuentra una tendencia completamente distinta. En este caso, a medida que el diámetro aumenta, (tendencia: **1.a < 1.e < 2(dim) < 1.d < 1(dim) < 2.e(dim)**) los materiales obtenidos ven disminuido su tamaño promedio. Efectivamente, podemos notar que en los extremos se encuentra **1.a**, el cual presentó sólidos extremadamente elongados y gruesos, y **2.e(dim)**, para el cual se observa material sólido que, en algunos casos, tiene apenas el tamaño de unos pocos píxeles. En este caso el diámetro parece estar determinando la capacidad difusiva y, en última instancia, el tamaño del sólido obtenido.

Por último, si en vez de utilizar ambos parámetros por separado construimos un nuevo parámetro a través de la multiplicación entre ambos, el cual podría entenderse como una especie de “diámetro corregido por el factor de forma” (D_{ff}), podemos observar que quedan generadas dos categorías claras. Por un lado, aquellos tres compuestos que presentan el diámetro corregido mayor (**1(dim)**, **2.e(dim)** y **2(dim)**), y para los cuales sus materiales sólidos pueden ser clasificados, en base a su tiempo de decaimiento de fluorescencia y su morfología, como materiales cristalinos. Por otro lado, aquellos que

presentan diámetros corregidos menores (**1.d**, **1.e** y **1.a**). Estos pueden ser clasificados, empleando los mismos criterios, como materiales espinodales.

Gracias a este análisis hemos podido encontrar un criterio general, y fácilmente calculable, que permite ubicar a los “materiales duales” en una de las dos categorías usualmente empleadas para la caracterización de los materiales sólidos: Cristalinos o Espinodales. Al mismo tiempo, hemos podido entender que la naturaleza de su dualidad reside en que son, o bien materiales extremadamente cristalinos pero muy pequeños (como sucede con el caso de la L-Fenilalanina, **1(dim)**), o bien materiales muy poco cristalinos, pero con partículas elongadas (como sucede con el compuesto **1.a**).

En el capítulo siguiente se extenderá este análisis a compuestos con distinto grado de derivatización, y se mostrarán los beneficios de emplear el diámetro corregido sobre diversas estructuras para comprender algunas de sus propiedades asociadas a la capacidad difusiva y el orden por apilamiento.

Materiales autoensamblados: Mesocristales y organogeles

Materiales cristalinos

Para el caso particular de los compuestos **1.e** y **2.e** (derivados de L-Fenilalanina y L-Tirosina con piperonal) se han obtenido distintos materiales a través del control de las condiciones experimentales de formación de la fase sólida. Estos materiales presentaron diferencias apreciables en su cristalinidad, morfología y grado de agregación.

En líneas generales, los materiales obtenidos para el compuesto **2.e** mostraron un marcado carácter cristalino en casi todas las condiciones testeadas. Particularmente, además de los monocrstales descritos al comiendo de la sección de discusión, para este compuesto se obtuvieron materiales cristalinos meso-estructurados, también conocidos como *mesocristales*. Estos fueron cristalizados bajo distintas condiciones de pH o fuerza iónica, y presentaron morfologías diversas entre las que se pueden apreciar agregados esféricos, elongados tipo cilindros o de aspecto dendrítico (Figura 38).

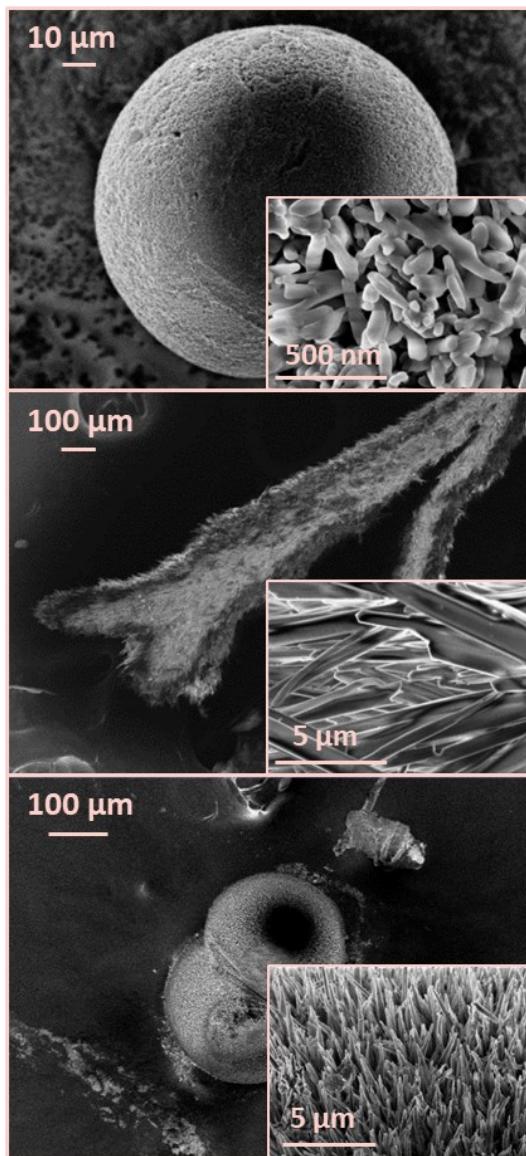


Figura 38. Imágenes de SEM de las mesoestructuras de **2.e** obtenidas por difusión en un gel de agarosa (primera fila), en una solución a fuerza iónica 1M (segunda fila) y fuerza iónica 4,75M (tercera fila).

Podemos observar que, tanto al emplear una matriz de gel de agarosa como una solución de elevada fuerza iónica durante la cristalización, se obtuvieron agregados esféricos. Por el contrario, la disminución de la fuerza iónica de la solución dio lugar a la obtención de agregados con un aspecto elongado y algunas ramificaciones. Esta dependencia con la matriz podría estar indicando que uno de los factores determinantes a la hora de seleccionar el aspecto final del sólido obtenido es la imposibilidad de desarrollar sólidos monocristalinos longitudinales, tanto sea por un impedimento estérico impuesto por la red, o por un apantallamiento de las especies en solución que inhibe la migración de nuevas moléculas a los sólidos ya formados. En ambos casos, el rol del entorno parece ser regular el tamaño y el aspecto de los nanocristales que constituyen el agregado, determinando de esta manera la morfología final del mismo.

Sin embargo, todos estos mesocristales podrían estar siendo ensamblados a través de partículas cristalinas isomórficas, en las que solamente cambia el hábito cristalino y la

orientación preferencial con que se agrupan, pero no el orden interno de los iones que los componen. Para corroborar esta hipótesis, más adelante se detalla un experimento de difracción de rayos X de polvos bidimensional diseñado para estudiar este tipo de mesoestructuras.

Al analizar en detalle el rol que cumple la matriz de agarosa, es posible entender como esta asiste a la formación de bloques de construcción pequeños y muy regulares a través de una reducción del efecto del potencial gravitatorio y las posibles perturbaciones mecánicas externas, además de constituir una red sólida que aumenta la tortuosidad e inhibe la difusión molecular. Este último efecto tiene cierto grado de semejanza con lo que sucede al aplicar como condición de cristalización una elevada fuerza iónica. Esta provoca un efecto de “apantallamiento” de los bloques de construcción y restringe la interacción entre ellos. Ambas condiciones de cristalización, en última instancia, impiden la interacción eficaz entre moléculas. Esto impacta de manera directa en el proceso de crecimiento de los núcleos cristalinos y fuerza al sistema a desarrollar un mayor número de núcleos pequeños para distribuir toda la masa de **2.e** que debe precipitar. Es interesante notar que el efecto producido por ambas condiciones de cristalización puede entenderse como un aumento en el carácter espinodal del fenómeno de separación de fases a través de la inhibición de la difusión molecular. Este caso ilustra de manera clara cómo es posible extender este paradigma del continuo cristalino-espinodal aún a sistemas mesoestructurados y la coexistencia entre el carácter cristalino y espinodal en un mismo material.

Para comprobar la hipótesis de que el orden cristalino en los materiales mesocristalinos está conservado y que las alteraciones morfológicas devienen únicamente de la forma y la orientación de las partículas cristalinas que los componen, se realizaron experimentos de difracción de rayos X sobre mesoestructuras de diversa morfología. El estudio se realizó en la línea MX2 de difracción de rayos X de monocristal en el LNLS (Laboratorio Nacional de Luz de Sincrotron) en São Paulo, Brasil. Esta línea cuenta con un haz de alta intensidad y un detector bidimensional de gran área, lo que permitió estudiar la orientación preferencial en una mesoestructura a través de ausencias sistemáticas en su patrón de difracción (Figura 39).

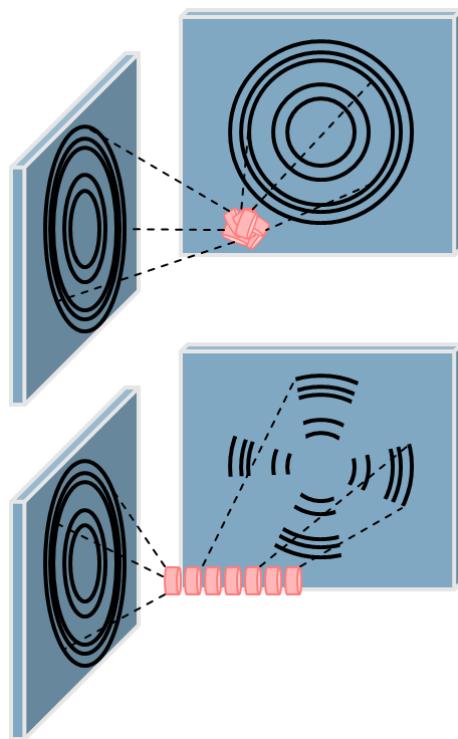


Figura 39. Esquema de los experimentos de difracción de rayos X con un sistema de detección bidimensional realizados para estudiar la meso estructura de los sólidos obtenidos para **2.e**

Para poder estudiar la existencia de ausencias sistemáticas debidas a una orientación preferencial fue necesario analizar dos tipos de morfologías mesocristalinas distintas. Por un lado, se empleó una morfología cilíndrica, la cual permite estudiar la dependencia del patrón de difracción con la orientación relativa entre el haz y el eje mayor del ensamblado. Por otro lado, para corroborar que estas ausencias no se perciben en materiales isotrópicos, se realizó el mismo experimento sobre una morfología esférica. Esto permitió confirmar que no hay ausencias sistemáticas en sistemas isotrópicamente conformados y que estas devienen únicamente del arreglo de las partículas cristalinas.

En la Figura 40 se detallan los patrones de difracción obtenidos para una morfología cilíndrica esférica (a), una morfología cilíndrica orientada paralela al haz incidente (b) y la misma morfología orientada perpendicular al haz incidente (c).

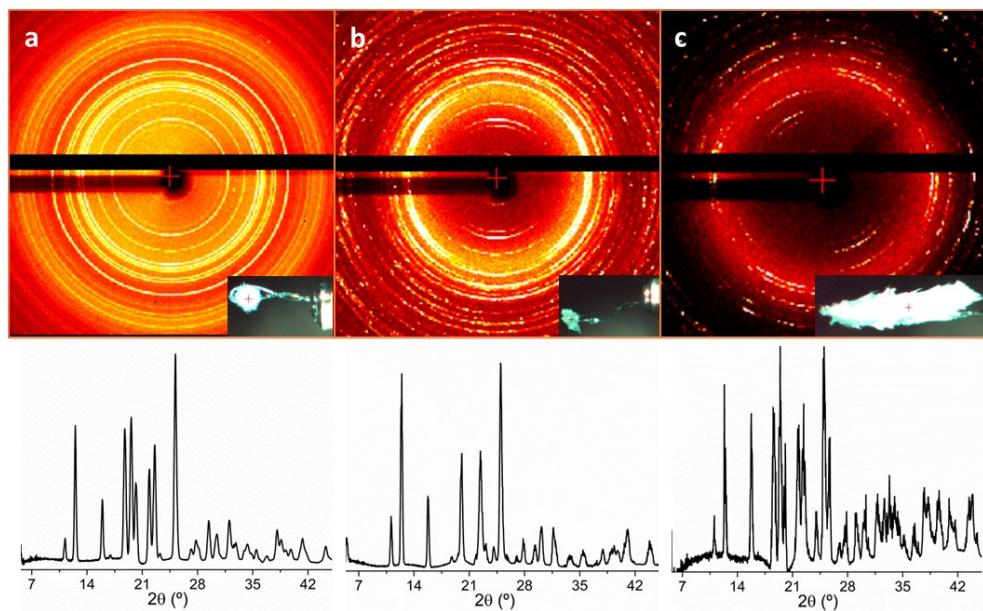


Figura 40. Patrones de difracción obtenidos para meso estructuras de **2.e** esféricas (a), y con forma longitudinal orientadas en paralelo (b) y perpendicular (c) al haz incidente.

Integrando radialmente los patrones de difracción obtenidos para las estructuras mesoscópicas de **2.e** se obtienen los difractogramas correspondientes. En estos podemos observar que aquel generado por la muestra de morfología elongada orientada perpendicular al haz incidente (Figura 40, c) presenta las ausencias sistemáticas esperadas para un conjunto de cristales orientados anisotrópicamente. Al mismo tiempo, la relación señal ruido en este último difractograma es mucho menor al observado tanto para la misma muestra orientada paralela al haz incidente como para la muestra esférica. Esto se debe a que, en esta orientación, el número de cristales que son irradiados es mucho menor al que se irradia al orientar la muestra en línea con el haz incidente (Figura 39).

Más allá de estas diferencias, es posible realizar un refinamiento de LeBail de los tres difractogramas empleando como modelo estructural la estructura cristalina resuelta para el switerión de **2.e** (Figura 10). En los tres casos la coincidencia entre el patrón calculado y el experimental no es lo suficientemente buena como para establecer una caracterización estructural total debido a la presencia de ausencias sistemáticas intrínsecas al material mesoestructurado, pero es lo suficientemente satisfactoria como para confirmar que las tres morfologías están construidas a partir de la misma estructura cristalina.

Al estudiar los sólidos que se generan para el compuesto **1.e** empleando las mismas condiciones, se observó la formación de agregados mesoestructurados construidos a partir de filamentos entrecruzados (Figura 41). En este material no se observa la presencia de bloques de construcción cristalinos, con figuras regulares bien definidas, vértices y aristas apreciables, sino que se aprecia un entramado de fibras flexibles sin orientación aparente que conforman una textura filamentosa. El desarrollo de esta textura filamentosa para estos arreglos es consistente con el carácter amilogénico esperado para este derivado considerando su similitud estructural con un dímero supramolecular de L-Fenilalanina (ver Capítulo V).

Estos dos materiales mesoestructurados ejemplifican el impacto que tiene el carácter convergente de un bloque de construcción en la cristalinidad de un material. Por un lado, el derivado de la L-Tirosina dio lugar a la formación de materiales intrínsecamente cristalinos constituidos a partir de switeriones desplegados ensamblados en dímeros que conforman redes supramoleculares extendidas en el espacio, equivalentes a lo observado para su estructura cristalina en el monocrystal (Figura 10). Por el otro lado, el compuesto derivado de la L-Fenilalanina dio lugar a la obtención de materiales filamentosos de aspecto flexible, en cuyos agregados no se distingue un claro orden.

Esto es consistente con la presencia en solución de entidades supramoleculares estabilizadas a través de un cierre electroestático flexible y adaptable que permite la coexistencia de un orden local de corto alcance con una movilidad molecular al extender la longitud del ensamble. En el Capítulo V se hará un análisis pormenorizado de esta tendencia y del impacto que tiene la convergencia o divergencia supramolecular en el carácter cristalino de distintos materiales.

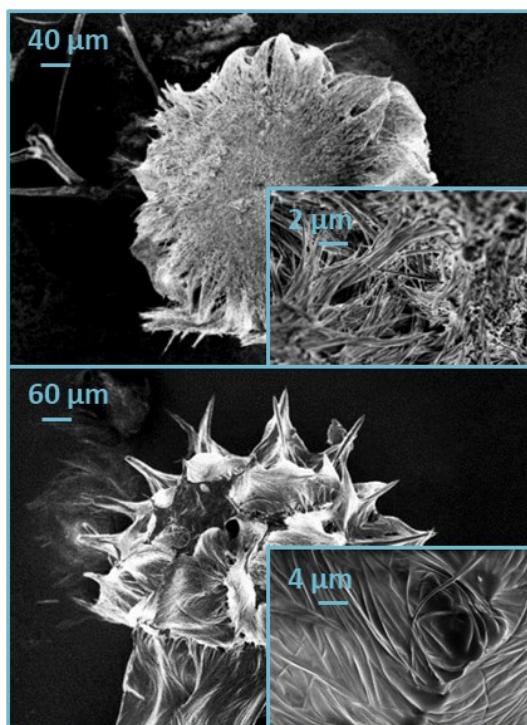


Figura 41. Imágenes de SEM de las mesoestructuras de **1.e** obtenidas empleando soluciones diluidas utilizando 2-(2-etoxietoxi)etanol (arriba) y n-butanol (abajo) como solventes.

Organogeles supramoleculares

Al realizar experimentos de solubilidad de estos dos compuestos en DMSO a altas temperaturas, y luego del enfriamiento posterior, se observó la formación de los correspondientes organogeles. Para estos compuestos también se ensayaron otros solventes, resultados que se discutirán en el próximo apartado. Para verificar la formación de estos materiales se empleó el método del tubo invertido. Considerando que este resultado ya fue observado para la L-Fenilalanina pero no así para la L-Tirosina, se ensayó la capacidad de formar organogeles de todos los derivados presentados en este capítulo en DMSO en concentraciones isocóricas a las de los geles de L-Fenilalanina 90mM o 2,9%

volumen (Figura 42).⁶⁴ El concepto de concentración isocórica se basa en emplear el volumen molecular de las sustancias comparadas en un dado estado conformacional para calcular concentraciones que impliquen el mismo volumen ocupado por el soluto en todos los casos. Este concepto se discute en detalle en el Capítulo V, en el apartado de cristales líquidos.



Figura 42. Organogeles obtenidos en condiciones de concentración isocórica al gel de L-Fenilalanina en DMSO para ambas familias de compuestos.

Tanto la L-Tirosina como casi todos sus derivados dieron lugar a formación de materiales que dan positivo al ensayo del vial invertido, pero cuyo aspecto es ceroso y grumoso, muy similar al esperado para un conjunto de cristales densamente compactado (Figura 42, fila inferior). Por el contrario, para la otra familia de compuestos solo la L-Fenilalanina, el compuesto **1.a** (derivado de benzaldehído) y **1.e** dieron positivo el ensayo del vial invertido. Pero, en estos casos, se pueden observar geles translúcidos y tersos, en claro contraste a sus análogos de la L-Tirosina (Figura 42, fila superior).

Esta diferencia en la capacidad de formar organogeles y el aspecto de estos puede estar íntimamente relacionada, y podría estar dando otro claro indicio en la relación entre la vía de descomposición (proceso de separación de fases) que llevó a la formación del material y sus propiedades. Si consideramos que los derivados de L-Tirosina tienen un carácter intrínsecamente cristalino debido a su divergencia supramolecular y la posibilidad de desarrollar factores de forma elevados al desplegarse, podemos entender que los materiales observados en la Figura 42 para estos derivados son, en realidad, cúmulos de cristales confinados en una pequeña región del espacio, de forma tal de desarrollar una respuesta mecánica colectiva que simula lo esperado para un material entrecruzado (gel). No son geles en el sentido estricto de la definición sino, más bien, un material que simula su respuesta mecánica frente a ciertos estímulos. Entender este material en términos de un “gel de cristales” permite comprender la extrema sinéresis que se observa luego de su síntesis y el aspecto grumoso que desarrollan frente a cualquier disruptión mecánica.⁶⁴

Por otro lado, los geles obtenidos para la L-Fenilalanina y sus derivados sí presentan el aspecto esperado para un gel físico o gel supramolecular, con una textura tersa que permite el pasaje de la luz y con una menor sinéresis. Considerando el carácter convergente de los derivados de L-Fenilalanina podemos entender estos materiales como producto de una descomposición de mayor carácter espinodal, lo que da como resultado

la formación de un gran número de pequeños nodos que no tienen tamaño suficiente para dispersar la luz. Al mismo tiempo, el entrecruzamiento intrínseco a este mecanismo de descomposición da como resultado un gel terso cuya respuesta mecánica no parece colapsar al ser estresado mecánicamente.

Por último, se observa que el hecho de que los compuestos derivados de L-Tirosina parecen tener mayor afinidad por la formación de organogeles también puede explicarse en términos de sus propiedades estructurales y la capacidad de formación de entidades supramoleculares en solución discutidas anteriormente. Teniendo en cuenta que ya ha sido reportada para la L-Tirosina una muy baja solubilidad en DMSO, producto de la formación de dímeros, y considerando que ya hemos probado que estos dímeros existen en solución también para algunos de sus los derivados, podemos extender la idea de que la solubilidad de estos en DMSO también será muy baja. Por lo tanto, durante el proceso de enfriamiento de una solución que se encuentra a mayor temperatura, estos sistemas expulsarán una gran cantidad de material como sólido durante la descomposición. Todo este sólido deberá “acomodarse” al volumen del recipiente que lo contiene y, en un caso extremo, puede llegar a confinarse para dar lugar al material de aspecto cetrino observado. Este es un claro ejemplo de que, a la hora de diseñar un material sólido obtenido a través de la descomposición de una solución, no solamente debemos ser capaces de controlar el mecanismo a través del cual este proceso sucede sino, también, la cantidad de sólido que estará involucrado.

La diferencia observada entre los organogeles de ambas familias permiten ilustrar también la relación directa que hay entre el material obtenido y el grado de cristalinidad de la vía de descomposición establecida durante la separación de las fases. Esto se debe a que poder desarrollar una red tridimensional capaz de percolar un volumen de solvente, por ejemplo, está íntimamente ligado al uso eficaz de los bloques de construcción con los que cuenta el sistema. Si estos se apilan densamente para dar lugar a un sólido eficazmente empaquetado, se ocupará muy poco volumen para un dado número de partículas. Si, al contrario, los bloques de construcción se distribuyen en pequeños cúmulos homogéneamente distribuidos en todo el seno del sistema, será mucho más simple conectarlos entre sí para formar una red tridimensional capaz de percolar. Este mecanismo de distribución eficaz de bloques de construcción para conformar un entramado de filamentos finos se asemeja al fenómeno de descomposición por la vía espinodal (Figura 18).

Con el fin de estudiar si existe una correlación directa entre la estructura molecular de las sustancias sintetizadas y su capacidad de formar organogeles, se estudió esta propiedad para los compuestos **1.e** y **2.e** en diversos solventes. Por limitaciones de tiempo no se realizó el mismo estudio para todos los miembros de las dos familias. Sin embargo, estos resultados podrían considerarse parcialmente representativos de cada conjunto. Para realizar el análisis se testearon 29 solventes distintos buscando maximizar la variedad de constantes dieléctricas, la presencia de un momento dipolar permanente y el carácter prótico de las sustancias. Sorprendentemente, aunque el compuesto **1.e** presentó una respuesta muy satisfactoria frente a casi todos los solventes empleados, el compuesto **2.e** únicamente logró formar organogeles con DMSO y DMF. (Tabla 3 y Figura 43).

Tabla 3. Test de gelificación y concentraciones críticas de gelificación para **1.e** y **2.e**

Solvente	1.e ^[a] (CCG) ^[b] [mg/mL]	2.e ^[a] (CCG) ^b [mg/mL]
1,2-dicloroetano		
1,4-dioxano	G (4.0)	
1-propanol	GO (4.0)	
1-butanol	GO (6.0)	
1,4-butandiol	GO (12.0)	
1-pentanol	G (8.0)	
1-hexanol	G (8.0)	
1-heptanol	G (8.0)	
1-octanol	G (8.0)	
S-2-octanol	G (20.0)	
2-etoxietanol	GO (6.7)	
2-(2-etoxietanol)etanol	GO (6.7)	
Acetona		
Acetonitrilo		
Benceno		
CCl ₄		
Cloroformo		
Diclorometano		
Dietiléter		
DMF	G (<i>c.a.</i> 15)	G (<i>c.a.</i> 15)
DMSO	G (15.0)	G (20.0)
Etanol		
Acetato de Etilo		
Isobutanol	GO (4.2)	
Metanol		
<i>n</i> -Hexano		
THF	GO (4.0)	

Tolueno		
Agua		
[a] G: Gel translúcido, GO: Gel opaco, I: Insoluble.		
[b] CCG: Concentración Crítica de Gelificación.		

Figura 43. De izquierda a derecha: Geles de **1.e** obtenidos con isobutanol, DMSO, 1,4-butanodiol, 2-(2-etoxietanol), 1,4-dioxano, 1-pentanol, 1-butanol y 2-etoxioetanol.

Debido a que **1.e** presentó la capacidad de gelificar en una gran variedad de solventes, se pudieron estudiar los xerogeles obtenidos a partir de algunos de ellos con el fin de comprender el rol que cumple la matriz en la formación de los filamentos. Las microscopías en ultra alto vacío de xerogeles de **1.e** (Figura 44, a) y en condiciones ambientales de geles de 1-butanol (Figura 44, b) y dioxano (Figura 44, c) mostraron estructuras de aspecto filamentoso y un gran entrecruzamiento.

Un análisis estadístico de la distribución de espesores en los tres materiales arrojó valores de ~200 – 300 nm para los filamentos con solvente, y 150 nm para los filamentos secos. Esta disminución en el espesor debido a la remoción del solvente podría estar indicando que este cumple un rol no inocente en el mecanismo de ensamblado del filamento.

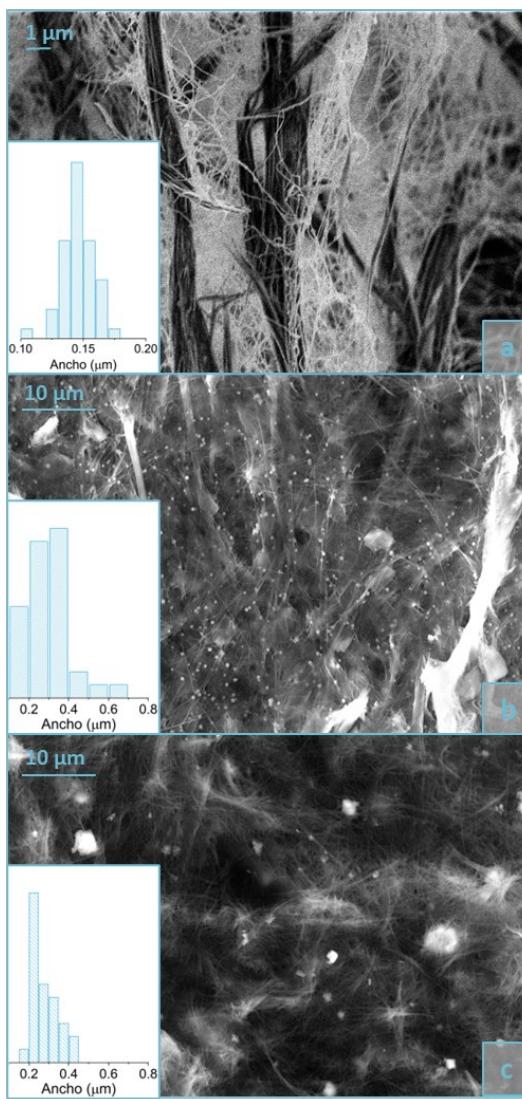


Figura 44. Microscopía por dispersión de electrones en ultra alto vacío de un xerogel de **1.e** obtenido a partir del secado en vacío de un gel de dioxano (4mg/ml) (a). (b) y (c) Microscopía por dispersión de electrones en condiciones ambientales de un gel de **1.e** en butanol (4mg/ml) y en dioxano (4mg/ml)

Diseño racional de pequeñas moléculas para la selección del mecanismo de separación de fases

La relación que existe entre la distribución de los bloques de construcción de un material supramolecular, la afinidad de estos por el empaquetamiento eficaz, y las propiedades del material resultante podría llegar a explicar por qué el compuesto basado en L-Tirosina (**2.e**), que se caracteriza por desarrollar materiales sólidos con un gran carácter cristalino, sólo formó geles en solventes de alta viscosidad como DMSO y DMF, mientras que el derivado de L-Fenilalanina (**1.e**), que tiene menos facilidad para desarrollar redes tridimensionales extendidas por su carácter convergente, dio lugar a materiales fibrilares y gelificó en una gran variedad de solventes.

Por un lado, como se discute en el Anexo, la viscosidad está directamente asociada con la capacidad difusiva de la molécula, y cumple un rol fundamental en determinar la naturaleza del régimen de fluctuaciones que el sistema adquiere antes de precipitar

(Ecuación 23). Por otro lado, podemos pensar que la sinergia que surge entre el factor de forma, el volumen, el estado conformacional preferido en solución y el carácter convergente, vuelve a los derivados de L-Fenilalanina intrínsecamente “más espinodales” que los de L-Tirosina y, por lo tanto, más afines a desarrollar entramados de filamentos al precipitar.

Si queremos diseñar un material que sea capaz de percolar el volumen que lo contiene debemos tener en cuenta la solubilidad como el principal parámetro a controlar, ya que será el material expulsado del seno del líquido el que se deposite en el recipiente y termine llenando ese espacio. Para este tipo de materiales, a la hora de hablar de condiciones isocóricas, debemos considerar al volumen ocupado por el sólido expulsado de la solución, lo que se traduce en la Ecuación 7:

Ecuación 7. Condiciones isocóricas para el material generado por precipitación de dos sustancias distintas.

$$(S_a^f - S_a^i) \cdot N_A \cdot V_a = (S_b^f - S_b^i) \cdot N_A \cdot V_b$$

En esta ecuación S_a y S_b refieren a la solubilidad de los compuestos a y b a la temperatura final (f) e inicial (i), y V refiere al volumen por molécula de cada sustancia.

Las microscopías por dispersión de electrones en ultra alto vacío (SEM) de los distintos xerogeles obtenidos a partir de organogeles de DMSO en concentraciones isocóricas a la L-Fenilalanina de los compuestos permiten observar una clara tendencia a la formación de sólidos con aspecto cristalino a medida que aumenta el factor de forma y/o el carácter divergente de la sustancia (Figura 45). Debido a que los geles son materiales en los que las fases sólida y líquida se encuentran íntimamente interconectadas, poder estudiar los xerogeles nos brinda mucha información respecto al impacto que tiene la química en solución sobre los materiales sólidos obtenidos por la separación de fases.

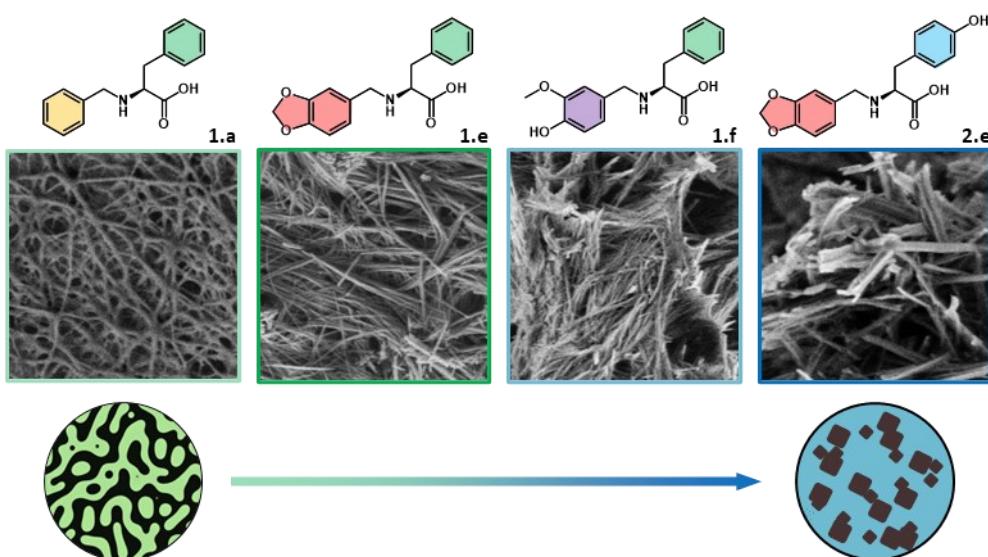


Figura 45. Micrografías SEM de los xerogeles de los compuestos **1.a**, **1.e**, **1.f** y **2.f** obtenidos a partir de organogeles en DMSO.

La formación de partículas elongadas con bordes rectos y caras definidas que no parecen mostrar ninguna evidencia de flexibilidad es un claro indicio del carácter cristalino

de los materiales obtenidos (Figura 45, último panel). Al comparar estas micrografías con el aspecto de los sólidos que dieron positivo al ensayo del vial invertido (Figura 42) podemos observar que, para el compuesto **2.e**, para el cual se observaba la formación de un sólido grumoso y opalescente, se aprecia un xerogel conformado por material cristalino particulado. Por otro lado, para los compuestos **1.a** y **1.e**, para los que se habían obtenido geles translúcidos y tersos, se obtuvo un xerogel compuesto casi exclusivamente de filamentos finos y entrecruzados, con un aspecto flexible y carente de cristalinidad. Estos filamentos se asemejan bastante a los observados para las estructuras fibrilares de la L-Fenilalanina.⁶⁵ Este resultado es otra evidencia clara del rol que cumple el mecanismo de descomposición a la hora de determinar las propiedades finales de un compuesto.

Estudio de los ensambles supramoleculares que dan lugar a la formación de los geles

Complementariamente, se utilizó la técnica de dispersión de rayos X a bajo ángulo para estudiar si existían diferencias entre las estructuras de los ensambles supramoleculares formados por **1.e** en cada uno de los solventes. Por limitaciones instrumentales, esta técnica solo se pudo utilizar para caracterizar los geles de **1.e** debido a que el azufre presente en el DMSO tiene una gran absorbancia a la longitud de onda a la que se irradia la muestra. Para realizar este experimento se eligieron los geles obtenidos empleando una familia de alcoholes de diferente longitud de cadena (Figura 46).

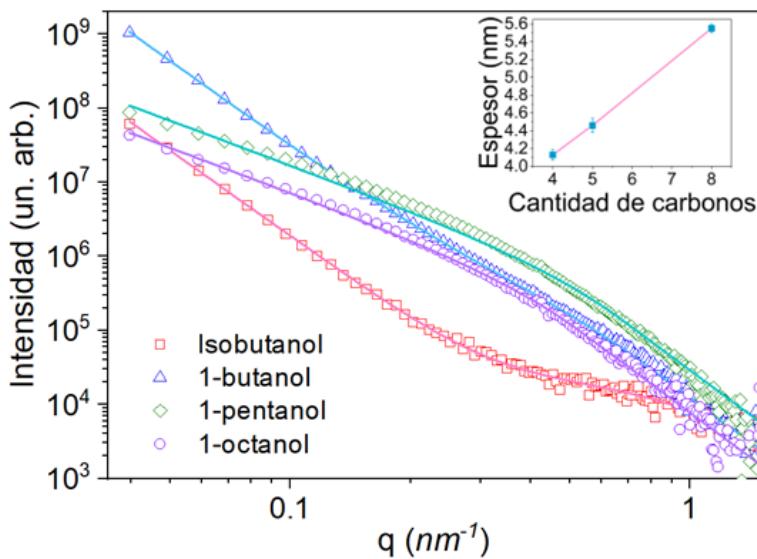


Figura 46. Patrones de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de geles de **1.e** (8mg/mL) en isobutanol (cuadrado), 1-butanol (triángulo), 1-pentanol (rombo) y 1-octanol (círculo). Las curvas provenientes del ajuste empleando un factor de forma lamelar para los 1-alcoholes y esférico para el isopropanol se muestran superpuestos a los datos en línea continua.

Los experimentos de SAXS mostraron una tendencia clara para todos los alcoholes lineales (1-butanol, 1-pentanol, y 1-octanol), para los cuales se puede proponer la existencia de una estructura bilamelar extendida en el espacio cuyo espesor depende de forma lineal de la longitud de la cadena del solvente empleado. Sin embargo, cuando se utiliza un alcohol no lineal, como el isobutanol, la arquitectura supramolecular parece cambiar para dar como resultado una entidad mayoritariamente esférica. Estos resultados

ponen de manifiesto el rol fundamental que cumple el solvente en la conformación de estas estructuras supramoleculares y suman un ejemplo más al ya probado rol que ejercen las fuerzas entrópicas en la selección de las arquitecturas supramoleculares.

Por otro lado, para los geles de **1.e** y **2.e** en DMSO se llevó a cabo un experimento mediante resonancia magnética nuclear resuelta en el tiempo con el objetivo de estudiar el mecanismo de formación de la red supramolecular en ese solvente. Inicialmente, se prepararon soluciones de concentración mayor a la CCG (Concentración Crítica de Gelificación) para cada uno de los gelantes en tubos de RMN y se llevaron a una temperatura mayor a la T_g (temperatura de gelificación). Luego, el sistema fue termoestabilizado a 25°C y se midieron espectros de resonancia magnética nuclear ^1H cada 7 minutos, hasta que no se apreciaron más cambios en las señales. Cuantificando el desplazamiento sufrido por cada señal y, gracias a la asignación estructural de cada una de ellas, se pudo correlacionar el grado de implicancia de cada porción molecular en el proceso de ensamblado (Figura 47).

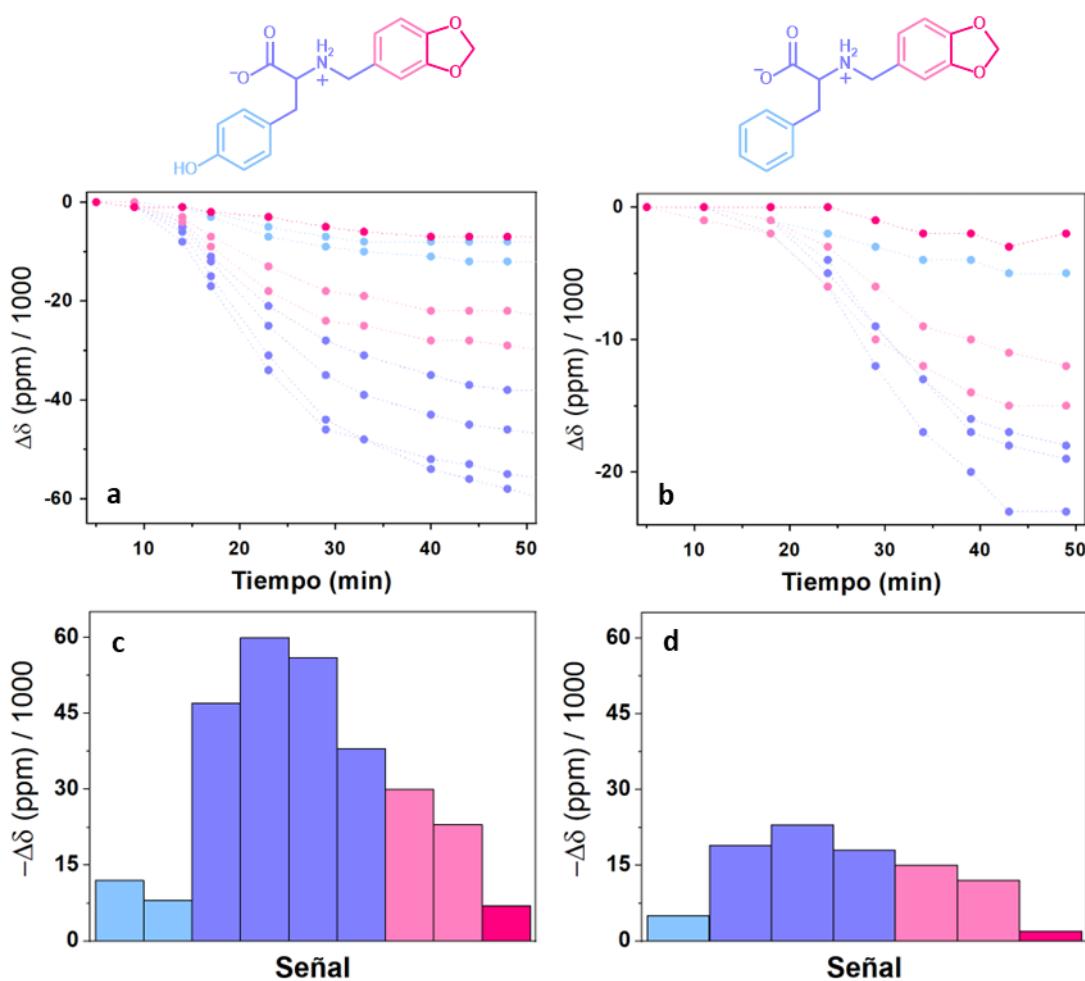


Figura 47. Análisis de los cambios sufridos por los desplazamientos químicos de distintas señales a medida que se producía el ensamblado molecular para los compuestos **1.e** (a) y **2.e** (b) y cambio total acumulado durante todo el proceso para cada una de las señales (c y d).

De forma similar a lo que se observó en agua básica, no se identifican corrimientos importantes en las señales correspondientes a la región aromática, aun considerando que

la concentración, las condiciones de medición y el medio empleado en ambos tipos de experimentos es muy diferente.

Por otro lado, sí se observa un rol protagónico del centro aminoacídico durante el ensamblado, lo cual muestra cierta correlación con los experimentos discutidos previamente en ambos casos. Este cambio en el desplazamiento de las señales, todas a campos más altos, podría estar sugiriendo la formación de entidades supramoleculares apiladas a partir de monómeros que exhiben una conformación preferentemente desplegada, las cuales se estabilizan por la atracción electroestática. Esto fuerza a los anillos a orientarse parcialmente de cara al centro aminoacídico, apilándolos entre sí y propiciando un efecto protector a través de su campo magnético (Figura 48a).

Sin embargo, considerando que el cambio de las señales para el compuesto **1.e** es mucho menor que para el compuesto **2.e**, y teniendo en cuenta que los parámetros termoquímicos arrojaron cierta tendencia general de los derivados de L-Fenilalanina a permanecer plegados, podemos sugerir que el ensamble supramolecular del compuesto **1.e** no presenta a sus monómeros completamente extendidos si no en una conformación semi-desplegada (Figura 48b). Bajo este modelo, el cono de protección de los anillos de la L-Fenilalanina casi no llega a alcanzar la región del piperonal, lo cual podría explicar el desplazamiento casi nulo que sufren estas señales respecto al resto.

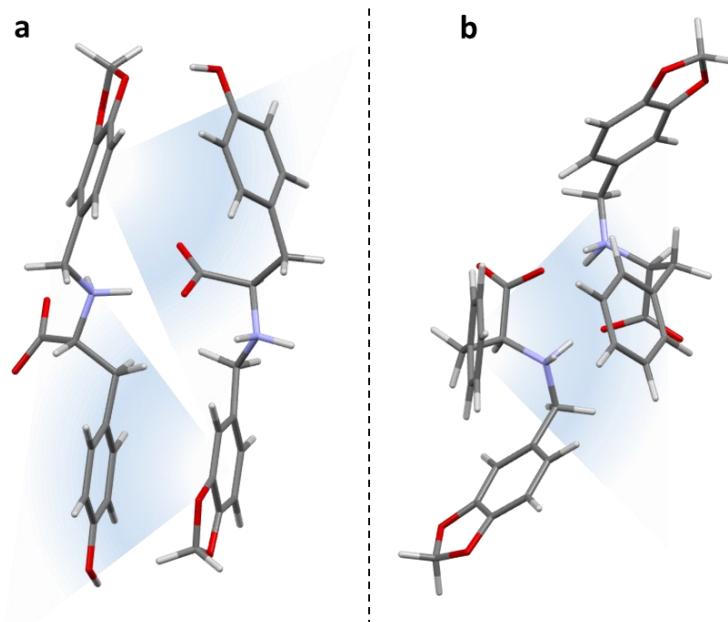


Figura 48. Cono de blindaje generado por la anisotropía del campo magnético alrededor de los anillos aromáticos.

Como resumen de este apartado podemos decir que, en base a los datos de SAXS, la confirmación del rol del solvente mediante las imágenes de las microscopías, la presencia de entidades supramoleculares estables en solución inferida de los experimentos de espectroscopía UV-Vis (Figura 26) y la adquisición de una conformación preferentemente desplegada que explica los resultados obtenidos por RMN, se pudo proponer un modelo para el ensamble molecular que se desarrolla en el gel. Este consiste en un arreglo

extendido de moléculas que adquieren una conformación desplegada en el compuesto **2.e** y semi-plegado en el compuesto **1.e** que están interactuando longitudinalmente, tanto entre sí como con el solvente (Figura 49).

Estos modelos condensan toda la información extraída de los distintos análisis realizados:

- 1) La adquisición de diversos estados conformacionales conforme se altera la temperatura, como se observó en las espectroscopías de resonancia magnética nuclear.
- 2) La existencia de entidades supramoleculares en solución interactuando a través de interacciones de apilamiento aromático, como se extrajo de las alteraciones espectrales observadas para los derivados de L-Tirosina en agua básica.
- 3) El rol esencial que cumplen las interacciones electroestáticas y la marcada estabilización que se observa para los ensambles generados empleando los estados de carga switeriónicos respecto a los estados con carga neta negativa, extraída de los datos termoquímicos.
- 4) El favorecimiento de la adquisición de conformaciones desplegadas por sobre las plegadas al elevar la temperatura. Información que también fue inferida de los datos termoquímicos.
- 5) El desarrollo de una estructura de aspecto lamelar con una fuerte intervención del solvente en su estabilización, como se vio en los resultados del modelado de los datos de SAXS.

Todas estas piezas permiten ensamblar un modelo para los agregados supramoleculares en solución de los compuestos **1.e** y **2.e**. Este modelo incluye de manera explícita las moléculas de solvente para poder corroborar el impacto que tienen sus cadenas alifáticas en la extensión de la longitud características. Estas estructuras fueron optimizadas geométricamente y convergieron a un mínimo de energía (Figura 49). Podemos observar que ambos ensambles consideran todo lo enunciado anteriormente. Ambos poseen un cierre electroestático que estabiliza el agregado, contienen solvente interactuando en la periferia de este y tienen el estado conformacional propuesto para justificar tanto las espectroscopías de resonancia magnética como las electrónicas.

Aunque este modelo está acuñado específicamente para estos dos compuestos y no pretende ser generalizado sin modificaciones para el resto de las familias, sí es factible pensarlo como un excelente punto de partida para la construcción de modelos de ensamble para todos los compuestos presentados en este capítulo.

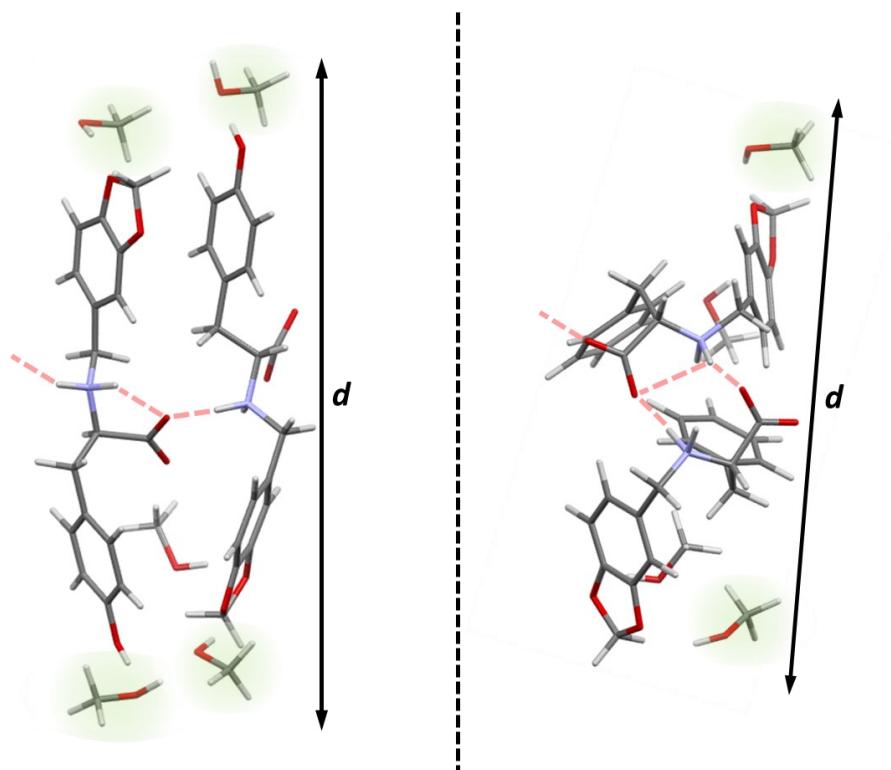


Figura 49. Modelos de ensamblado en solución propuesto para los compuestos **2.e** y **1.e**. El valor d refiere a la distancia que separa las moléculas de solvente que rodean el ensamble y se corresponde con la longitud característica del arreglo lamelar observado en los experimentos de SAXS. En verde se resaltan las moléculas de solvente, en este caso metanol, interactuando con la estructura.

Capacidad de gelificación de muestras complejas

Para finalizar y como prueba de concepto, se ensayó la capacidad de formación de organogeles de **1.e** y **2.e** en mezclas complejas que presentaran relevancia tecnológica. Particularmente, se estudió la capacidad de gelificar muestras de crudo patagónico (densidad: 0,753g/cm³ y viscosidad: 0,9cP a 25°C). Ambas sustancias presentaron una excelente respuesta frente a la gelificación, dando lugar a materiales densos y con muy poca sinéresis. En ambos casos se ha observado la formación de geles estables aún a concentraciones tan bajas como 1,2 %m/v, la cual es menor aun que lo reportado para otras moléculas especialmente diseñadas para el tratamiento de derrames de crudo.⁶⁷ Adicionalmente, todos estos materiales mostraron una excelente reversibilidad térmica, estabilidad frente al envejecimiento y la capacidad de regenerarse luego de una perturbación mecánica al cabo de unos días (Figura 50). Esta gran estabilidad durante almacenamientos prolongados, en combinación con la capacidad de regenerarse luego de una perturbación mecánica o a través de un curado térmico los vuelven materiales potencialmente interesantes para su aplicación en diversas tecnologías de remediación y transporte.^{68,69}

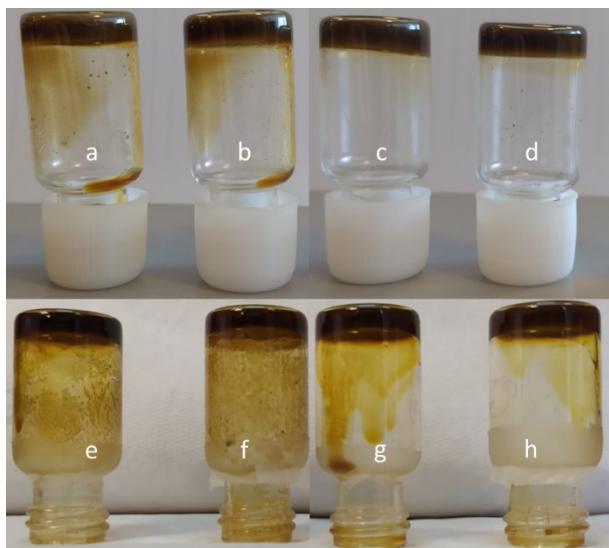


Figura 50. Organogeles de **1.e** y **2.e** empleando petróleo crudo como solvente. (a) **1.e** 12mg/ml, (b) **1.e** 20mg/ml, (c) **2.e** 12mg/ml y (d) **2.e** 20mg/ml. (e), (f), (g) y (h) son los mismos sistemas al cabo de 7 meses.

Conclusiones y Perspectivas

Las plataformas estudiadas durante este capítulo, sintetizadas a partir de los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina y los aldehídos aromáticos Benzaldehído, 2-naftaldehído, piperonal y vainillina, han demostrado tener un gran potencial para formar una vasta variedad de arquitecturas supramoleculares. Estas moléculas tienden a agregarse dando lugar a la formación de arreglos supramoleculares con distintos grados de anisotropía en la distribución de sus interacciones. Esta capacidad de interacción tan variada se vio reflejada en la numerosa y diversa cantidad de materiales obtenidos a partir de estos bloques de construcción, entre los que se encuentran los organogeles, los cristales líquidos, los sólidos monocristalinos y los mesocristales. La obtención de cada uno de estos materiales fue modulada a través del control riguroso de las condiciones fisicoquímicas que rigen el fenómeno de autoensamblado, como son la fuerza iónica del medio, la naturaleza del solvente, el tratamiento térmico empleado antes y durante la formación del ensamble o los cambios repentinos en la acidez del sistema. Las derivatizaciones incorporadas al esqueleto aminoacídico permitieron la utilización de solventes no polares para algunos de estos experimentos, lo cual dio como resultado la obtención de varios materiales innovadores que no podrían haber sido obtenidos empleando tanto los precursores aislados como las derivatizaciones más frecuentes encontradas en bibliografía, que son aquellas realizadas empleando la formación de un enlace peptídico. A modo de prueba de concepto, la capacidad de gelificación de estas nuevas plataformas fue testeadas frente a sistemas complejos de interés tecnológico, como el crudo patagónico, dando resultados muy prometedores.

Gracias a la búsqueda exhaustiva de condiciones de cristalización óptimas, junto con la implementación de experimentos de resolución estructural de cristales únicos en una línea de luz sincrotrón, fue posible resolver las estructuras cristalinas de la gran mayoría de las moléculas sintetizadas. Adicionalmente, para algunos compuestos se pudieron estudiar dos estados de carga distintos, como los switeriones y los aniones presentes en sales de cloruro. Toda esta información estructural resultó esencial para poder comprender de manera precisa el rol que cumplen las interacciones supramoleculares en el fenómeno de interacción de cada una de estas moléculas entre sí y con su entorno.

A lo largo de este capítulo se han presentado varios ejemplos en los que se ha podido observar cómo la introducción de un grupo hidroxilo en la posición *para* de un anillo aromático, tanto sea en el grupo residual del aminoácido o en el correspondiente al aldehído, conlleva a cambios excepcionales en la química supramolecular de una sustancia. Principalmente, el agregado de esta funcionalidad altera la divergencia supramolecular de la red de interacciones desarrollada, lo cual impacta de manera directa en la formación de los diversos ensambles moleculares que actúan como bloques de construcción de los materiales obtenidos. Claros ejemplos de este impacto se han dado tanto para los materiales sólidos, como sucede al comparar la distribución de zonas de interacción que se genera en las estructuras cristalinas de los derivados de L-Fenilalanina y el caso particular del compuesto **1.f** (Figura 7), como en solución, al observar las distintas tendencias a la

pérdida de la agregación por temperatura observadas para los derivados de L-Tirosina y el caso del compuesto **2.d** (Figura 29).

Al mismo tiempo, a lo largo de este capítulo se han discutido extensamente al menos dos maneras experimentales de enmascarar este efecto de alteración en la divergencia supramolecular empleando un solvente de constante dieléctrica elevada, como el DMSO, o un pH lo suficientemente básico como para cargar negativamente los compuestos y favorecer el desagregado por la repulsión electroestática. Estas técnicas han sido utilizadas, en casi todos los compuestos, para sintetizar organogeles supramoleculares a través del desarrollo de redes extendidas de interacción (Figura 42). Utilizando diversas microscopías hemos podido observar que, más allá de la derivatización implementada, la tendencia a formar fibras en estado sólido que se ha reportado previamente para estos dos aminoácidos ha sido conservada. No obstante, el grado de cristalinidad de estas fibras se ha visto fuertemente alterado, a un punto tal que muchas de estas han sido descriptas con el mismo grado de orden macroscópico (en términos de lados bien definidos, adquisición de morfologías regulares y baja variabilidad en los tiempos de decaimiento de fluorescencia), usualmente empleado para cristales únicos. Nuevamente, estos resultados permiten ejemplificar de manera clara el rol que cumple la divergencia supramolecular y el factor de forma en el grado de cristalinidad y, en última instancia, en las propiedades del material obtenido.

El grado de similitud en la capacidad de interacción supramolecular que se observó entre el derivado de L-Fenilalanina con un hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático del aldehído, el compuesto **1.f**, y los derivados de L-Tirosina. De la misma manera, también se pudo demostrar la similitud recíproca entre el derivado de L-Tirosina cuyo aldehído presenta un residuo voluminoso, el compuesto **2.d**, y los derivados de L-Fenilalanina. Ambos son un claro ejemplo de la capacidad de “imitar” la química supramolecular de una dada sustancia objetivo introduciendo alteraciones específicas en las estructuras moleculares. En nuestro caso, esto se logró mediante la elección de la unidad incluida mediante la derivatización. Esta capacidad de “simular comportamientos supramoleculares” partiendo de precursores diferentes, resulta esencial a la hora de diseñar racionalmente nuevas moléculas que busquen reproducir la respuesta que tiene un determinado compuesto en un dado entorno. En líneas generales, contar con nuevas herramientas que permitan simular, o sintetizar, sistemas bioinspirados resulta fundamental para diversas aplicaciones tecnológicas, como el diseño de nuevos fármacos.

Empleando un abordaje integral a través de múltiples técnicas espectroscópicas, en complementariedad con cálculos de energía y optimización estructural por DFT, se pudo proporcionar información sobre la naturaleza del fenómeno de autoensamblado de todas estas moléculas bajo distintas condiciones experimentales. Estos resultados permitieron proponer un modelo de agregación basado en la formación de dos tipos de arquitecturas marcadamente diferenciables.

Por un lado, en todos aquellos casos donde la divergencia supramolecular resultó ser baja, como en el caso de los derivados de L-Fenilalanina, salvo el compuesto **1.f**, y en **2.d**, se espera la formación de estructuras bidimensionales extendidas con una morfología similar a la de una lámina β , denominadas también bicapa β por su naturaleza no covalente. Este tipo de estructuras bilamelares son frecuentemente encontradas en la naturaleza,

principalmente en compuestos anfifílicos o en proteínas con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos cuando estos son expuestos a medios polares. La implicancia de la conformación de este tipo de estructuras en su potencial citotoxicidad, así como su similitud con estructuras biogénicas supramoleculares reportadas para proteínas y pequeños metabolitos, se discutirá en detalle en el Capítulo V.

Por otro lado, para todas aquellas moléculas en las que se observó un grado de divergencia mayor, como es el caso de los derivados de la L-Tirosina, salvo el compuesto **2.d**, y en **1.f**, se identificó el desarrollo de una red isotrópica de interacciones intermoleculares extendida en el espacio que llevó a un aumento en el grado de cristalinidad de los sólidos obtenidos. Sólo en un único caso, que fue en la especie switeriónica del compuesto **2.a**, se observó la formación de una entidad supramolecular dimérica estable que se comportó de manera similar a lo que hubiera sido esperado para un bloque de construcción convergente. La posición y orientación de los grupos amino, carboxilato e hidroxilo, junto la capacidad de adquirir una conformación semi—plegada que expone el centro aminoacídico, pero no aleja del todo el grupo hidroxilo, fue esencial para permitir la formación de este bloque de construcción.

Por último, todos casos presentados anteriormente sirven para ejemplificar la utilidad de contar con herramientas que permitan cuantificar y predecir el grado de cristalinidad de un sistema en términos de un continuo de posibles valores, y no como una propiedad binaria, la cual está o no presente en el sistema de estudio. Para esto es esencial poder describir tanto la divergencia supramolecular del bloque de construcción empleado, como el factor de forma adquirido por este en un dado ensamble, dos herramientas que ya estaban previamente discutidas en bibliografía para otros sistemas en otras ramas de la ciencia, pero que fueron introducidas para el estudio de la química supramolecular de pequeñas moléculas durante este trabajo de tesis (Figura 51).

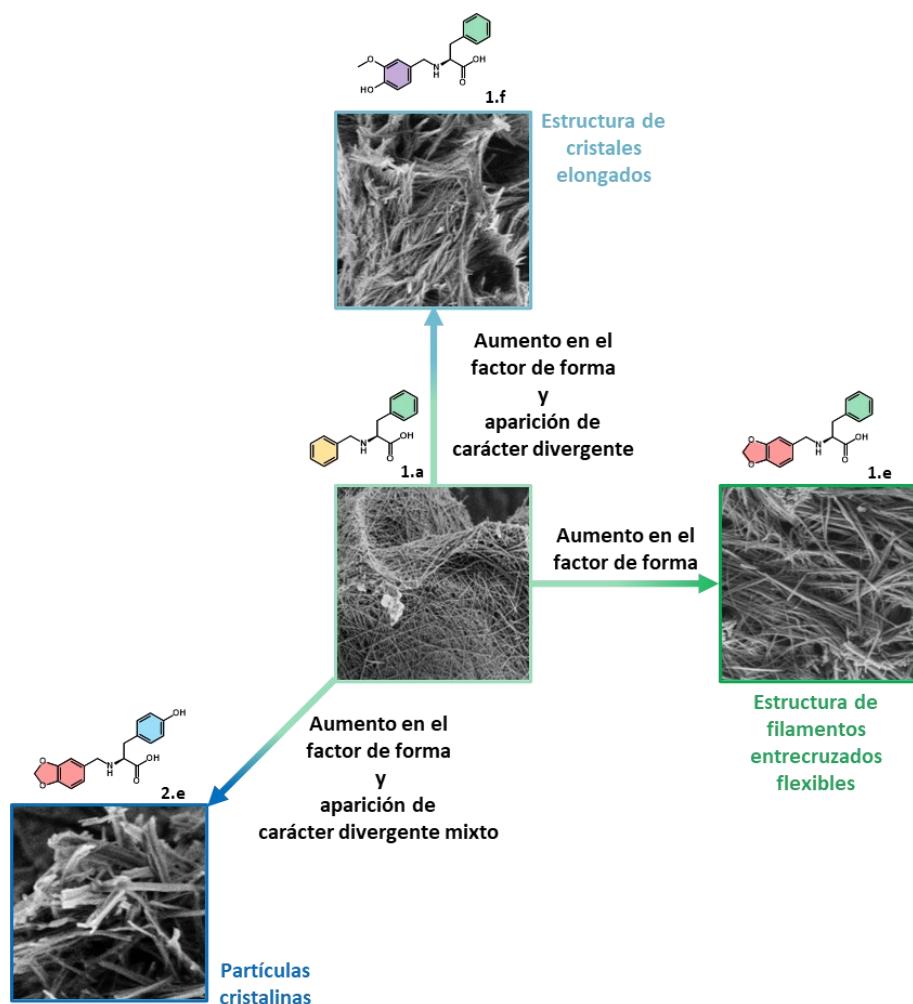


Figura 51. Relación entre la estructura de un compuesto y el material sólido desarrollado.

Experimental

Instrumentación

Los espectros UV-Vis fueron medidos empleando un especlómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W). Las microscopías ópticas de luz polarizada se realizaron utilizando un microscopio triocular Nikon SMZ-745T con un sistema de iluminación Nikon Ni-150. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa MicrometricsTM SE Premium para las mediciones y el programa ImageJ⁷⁰ para el análisis.

Microscopia electrónica de barrido en alto vacío y en condiciones ambientales (SEM)

La obtención de imágenes de alta resolución por dispersión de un haz de electrones se realizó utilizando un microscopio Carl Zeiss NTS – SUPRA 40 en alto vacío, disponible en el centro de Microscopía Avanzada, DF, FCEN – UBA. La obtención de imágenes de alta resolución en condiciones ambientales se realizó empleando un microscopio Quanta 250 *Field Emission Gun* operando a 15kV disponible en el Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, UnSam. Las muestras estudiadas a alto vacío fueron purificadas y secadas previamente y se las sembró sobre sobre cinta de carbón soportada en pines de aluminio aptos para SEM. Las muestras estudiadas en condiciones ambientales fueron sembradas sobre cintas de carbón sin acondicionamiento previo.

Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)

Los experimentos de microscopía confocal de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia fueron realizados con un equipo Abberior Expert Line empleando un láser pulsado de excitación de 375 nm para las moléculas en solución. Para la detección se emplearon fotomultiplicadores híbridos con filtros pasabajos de 405 nm. El tiempo de exposición por píxel fue seleccionado específicamente para cada muestra como una solución de compromiso entre tiempo de captura de imagen e intensidad de fluorescencia detectada. La electrónica empleada para la adquisición fue un módulo HydraHarp 400 de PicoQuant trabajando a una tasa de repetición de 20 MHz. Las imágenes de FLIM se construyeron considerando tiempos de vida de fluorescencia 1.5ns a 3ns para los casos de moléculas sin sonda y 2ns a 6ns para aquellas obtenidas en presencia de AQui. El análisis de las imágenes de FLIM se realizó empleando el software SymphoTime 64 de PicoQuant y macros propias programadas en ImageJ. Los tiempos de vida de fluorescencia fueron modelados empleando un modelo mono exponencial.

Medidas de difracción de rayos X de cristal único

Todos los cristales presentados durante este capítulo fueron estudiados empleando tres sets ups experimentales distintos.

Para las medidas a temperatura ambiente se empleó un difractómetro Oxford Diffraction Gemini E con radiación Mo K α ($\lambda = 0,71 \text{ \AA}$) y Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) con un monocromador de grafito, disponible en el INQUIMAE (FCEN-UBA). Las estrategias de medida, así como el procesamiento de los datos, fueron realizados utilizando el programa CrysAlis Pro.⁷¹ Un método gausiano implementado en WinGX⁷² o un modelo numérico fueron utilizados para realizar la corrección por absorción.

Los experimentos a baja temperatura de los cristales de **2.e**, junto con los experimentos de difracción de rayos X de las estructuras mesoestructuradas fueron medidos en la línea MX2-LNLS del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil) usando longitud de onda $\lambda = 0,80 \text{ \AA}$, mientras que el resto de los datos adquiridos a baja temperatura fueron colectados en la línea MANACÁ-Sirius, usando una longitud de onda de $\lambda = 0,67 \text{ \AA}$. Los datos fueron colectados usando un detector de área PILATUS2M (Dectris). Debido a que ambas líneas de difracción están diseñadas especialmente para macromoléculas, fue necesario colectar datos de múltiples ángulo Kappa para evitar la carencia de completitud a grandes ángulos.⁷³ Para esto se empleó una cabeza goniométrica mini-kappa. Las medidas fueron realizadas a 100 K y la reducción de datos fue hecha con el software XDS,⁷⁴ empleando el protocolo de trabajo MANACAutoproc.⁷⁵ Los datos fueron corregidos por los efectos de absorción utilizando un método empírico implementado en el software XDS.⁷⁶

Las estructuras fueron resueltas utilizando el programa Olex2⁷⁷ con la metodología ShelXL⁷⁸ y refinadas utilizando el programa ShelXL. Los átomos distintos de hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno fueron incluidos, en su mayoría, en la posición calculada geométricamente sobre según el tipo de enlace formado y se les asignó un parámetro térmico extrapolado del calculado para su átomo parental. Los átomos de hidrógeno unidos al agua fueron localizados en los mapas de Fourier de cada estructura, y se les asignó una posición relativa fija con un parámetro de desplazamiento isotrópico. Debido a que, en algunas estructuras, el átomo de Cl (Cl1) se encontraba desordenado, este se desdobló en dos átomos de cloro independiente en dos sitios distintos con ocupancias de 0.26 y 0.74. El desorden no fue modelado para ninguna de las moléculas de solvente por lo que estas presentan elipsoides de mayor tamaño.

Las estructuras fueron subidas a la base de datos cristalográfica de Cambridge con códigos de referencia: 1984179 para el switerión de **2.e**, 2322151 para la sal de cloruro del compuesto **1.e**, 2322152 para la sal de cloruro del compuesto **2.a**, 2322154 para el switerión del compuesto **1.f**, 2322157 para el switerión del compuesto **1.d**, 2322158 para el switerión del compuesto **2.f**, 2322159 para el switerión del compuesto **2.a**, 2322160 para la sal de cloruro del compuesto **1.d**, 2322162 para la sal de cloruro del compuesto **1.a**, y 2322155 para la sal de sodio del compuesto **1.d**.

Metodología computacional

Los cálculos de estructura electrónica empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT) fueron realizados utilizando el programa ORCA.⁷⁹ El funcional utilizado fue BP86 en conjunto con un set de bases de Ahlrichs def2-SVP y una triple corrección de dispersión (DFT-D3). En todos los casos se empleó la aproximación por resolución de la identidad. Los cálculos de SCF fueron del tipo de spin polarizado y se utilizó un criterio de

convergencia de 10^{-8} Eh en energía y 5.10^{-7} como elemento máximo de error tolerable en el vector de DIIS. En todos los casos la grilla de integración final fue elevada a 6 para garantizar la precisión de los valores obtenidos.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para el estudio del mecanismo de ensamblado durante el proceso de gelificación se realizaron medidas resueltas en el tiempo cada 5 minutos y a temperatura variable, cada 5°C desde 25°C a 45°C . Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AM-500 MHz, disponible en UMYMFOR, FCEN-UBA. Las muestras fueron estudiadas en óxido de deuterio-d₂ (D_2O), deuteróxido-d₁ de sodio (NaOD) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆). Los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) son reportados referidos a la señal del solvente empleado. Las constantes de acoplamiento (J) se presentan en Hz. La multiplicidad de las señales de ^1H RMN se indican mediante las abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; m, multiplete. La obtención de los espectros, su corrección y el tratamiento de los datos fue realizado con el software MNova 14.3.2 de MestreLab.

Espectroscopía electrónica a temperatura variable

Los espectros UV-Vis fueron medidos empleando un espectrómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W). Para los experimentos a temperatura variable se utilizó un termoestatizador Lauda RE 207 con una mezcla de etilenglicol:agua 70:30 como fluido de transferencia de calor.

Síntesis de los compuestos

Los compuestos de este capítulo se sintetizaron siguiendo procedimientos reportados previamente en bibliografía para compuestos similares, pero con algunas modificaciones para adaptarlos a las distintas solubilidades y reactividades de cada par de aldehído y aminoácido en específico.⁸⁰ Todos los reactivos y solventes empleados en la síntesis se obtuvieron de manera comercial y se utilizaron sin purificación previa. El metanol utilizado fue destilado antes de cada síntesis. Todas las reacciones se realizaron en condiciones aeróbicas.

A continuación, se describe el protocolo general de síntesis y en la tabla se indican las cantidades específicas de aminoácido, aldehído, base y agente reductor empleados para cada compuesto. Las condiciones de reacción de cada uno de los pasos y para cada uno de los pares aminoácido–aldehído, fueron optimizadas por Cromatografía de Capa delgada (CCD) y RMN. Todos los compuestos obtenidos luego de la acidificación resultaron ser insolubles en agua, acetonitrilo, metano y etanol, pero solubles en DMSO.

Protocolo: Una cantidad de aminoácido (4,71 mmoles) e hidróxido de litio (7,06 mmoles) se suspende en metanol anhidro y se calienta hasta disolución total de ambos sólidos. A esta solución se le agrega el aldehído (4,71 mmoles) y se lleva a refluo por 4 horas. Luego del agregado del aldehído la solución adquiere una coloración amarilla intensa. Al seguir la reacción por CCD se observa una apreciable disminución de la mancha correspondiente al aldehído. A la solución resultante se le agrega el NaBH₄ (9,42 mmoles) en baño de hielo y se deja reaccionar a baja temperatura por un periodo de dos horas. En

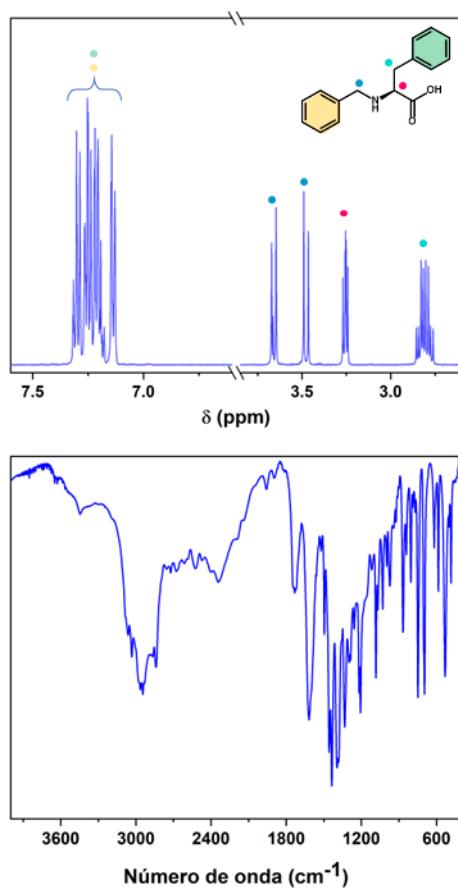
este paso la solución pierde su coloración característica y se vuelve incolora. Para finalizar, la solución es acidificada con HCl (c) hasta pH=5, lo cual conlleva a la aparición de un sólido blanco de aspecto fino. Es sólido es purificado a través de lavados sucesivos con agua, etanol y acetona y caracterizado por técnicas espectroscópicas.

Cantidades: Masas utilizadas para 500 mg de aldehído. Todas las masas están expresadas en miligramos (mg).

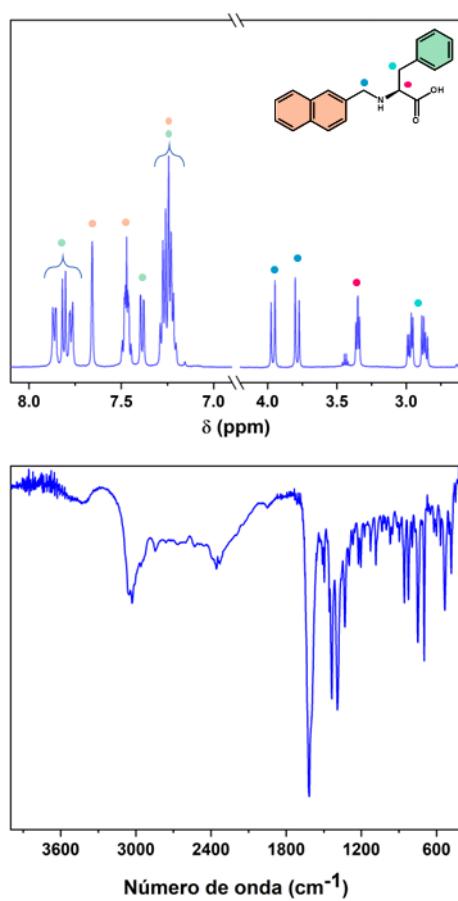
	Aminoácido	Base	Aldehído	NaBH ₄
1.a	778	169	500	356
2.a	854	169	500	356
1.d	529	115	500	242
2.d	580	115	500	242
1.e	550	120	500	252
2.e	603	120	500	252
1.f	543	118	500	249
2.f	595	118	500	249

Caracterización.

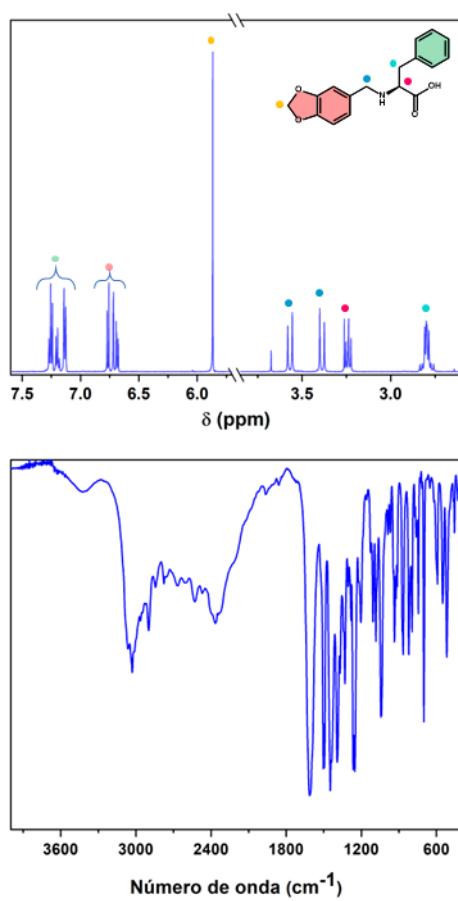
1.a: Datos para la sal de sodio. RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ= 7,34 – 7,17 (m, 8H), 7,17 – 7,10 (m, 2H), 3,69 – 3,63 (m, 1H), 3,48 (d, J = 12,7 Hz, 1H), 3,29 – 3,22 (m, 1H), 2,84 (dd, J = 13,4, 6,2 Hz, 1H), 2,78 (dd, J = 13,5, 7,6 Hz, 1H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max}=220nm, 258nm; en DMSO λ_{max}=259nm, 265nm, 309nm, Frecuencias de FT-IR (KBr): ν(O—H) = 3174 cm⁻¹, ν(O—H) = 3100 cm⁻¹, ν(C=O) = 1607 cm⁻¹,



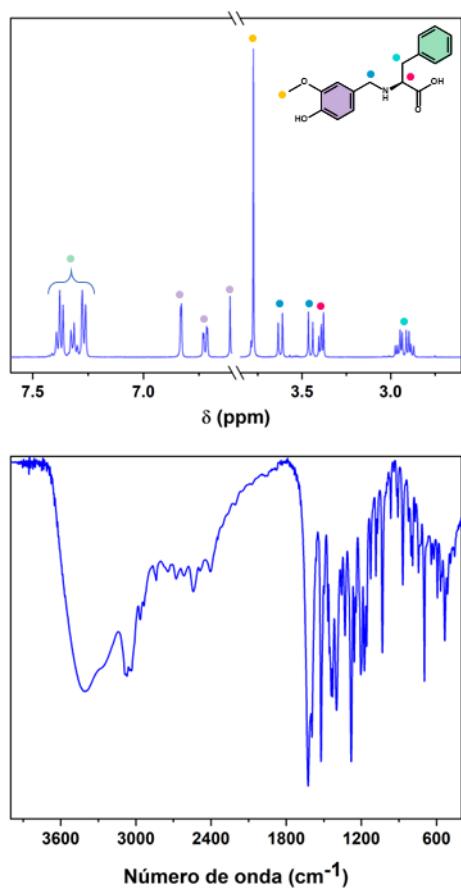
1.d: Datos para el switerión. RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ= 7,89 – 7,75 (m, 4H), 7,66 (s, 1H), 7,51 – 7,43 (m, 3H), 7,39 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,25 (dq, *J* = 13,3, 7,0 Hz, 6H), 3,96 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 3,79 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 3,35 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 2,97 (dd, *J* = 13,6, 5,9 Hz, 1H), 2,87 (dd, *J* = 13,6, 7,5 Hz, 1H), 2,52 – 2,48 (m, 9H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =224nm, 275nm; en DMSO λ_{max} =277nm, 306nm, 320nm, Frecuencias de FTIR (KBr): ν(O—H) = 3029,8 cm⁻¹, ν(C=O) = 1616,1 cm⁻¹.



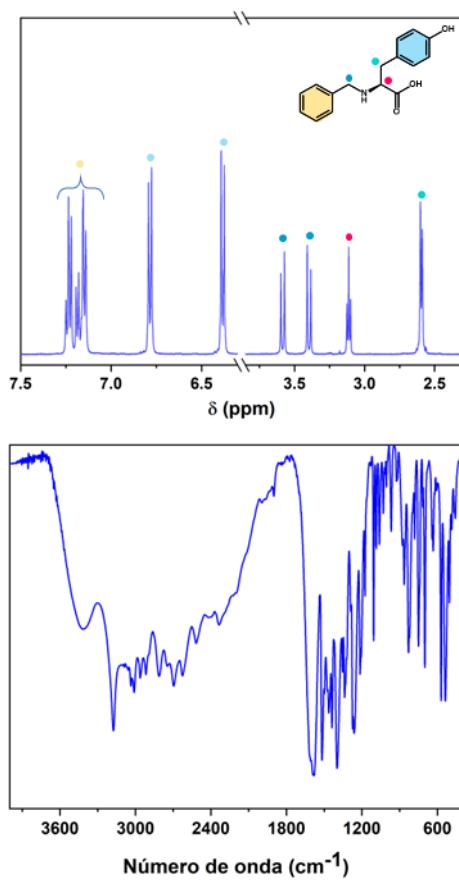
1.e: Datos para la sal de sodio. RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ= 7,27 – 7,18 ppm (m, 12H), δ= 6,80 – 6,78 ppm (m, 2H), δ=6,69 – 6,67 ppm (m, 1H), δ= 5,97 ppm (m, 2H), δ=3,70 – 3,67 ppm (m), δ= 3,58 – 3,53 (m), δ= 3,27 (d), δ= 2,97 – 2,93 (m), δ= 2,85 – 2,82 (m), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =233nm, 285nm, en DMSO λ_{max} =288nm, Frecuencias de FTIR (KBr): ν(O—H) = 3029,7 cm⁻¹, ν(C=O) = 1614,2 cm⁻¹.



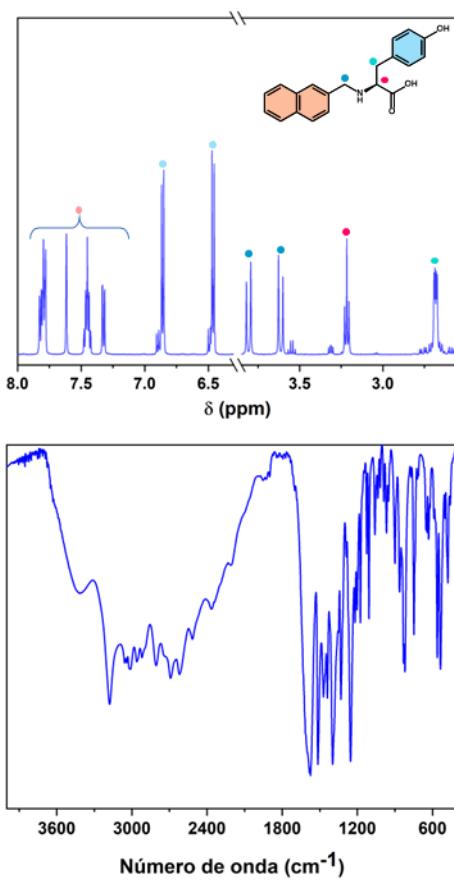
1.f: Datos para la sal de sodio. RMN ^1H (500 MHz, D_2O) δ = 7,36 – 7,17 (m, 6H), 6,76 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,65 (dd, J = 8,0, 2,1 Hz, 1H), 6,53 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,55 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 3,38 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 3,35 – 3,29 (m, 1H), 2,92 – 2,78 (m, 2H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =245nm, 286nm, en DMSO λ_{max} =283nm, Frecuencias de FTIR (KBr): $\nu(\text{O}-\text{H})$ = 3402,8 cm^{-1} , $\nu(\text{C}=\text{O})$ = 1625,2 cm^{-1} .



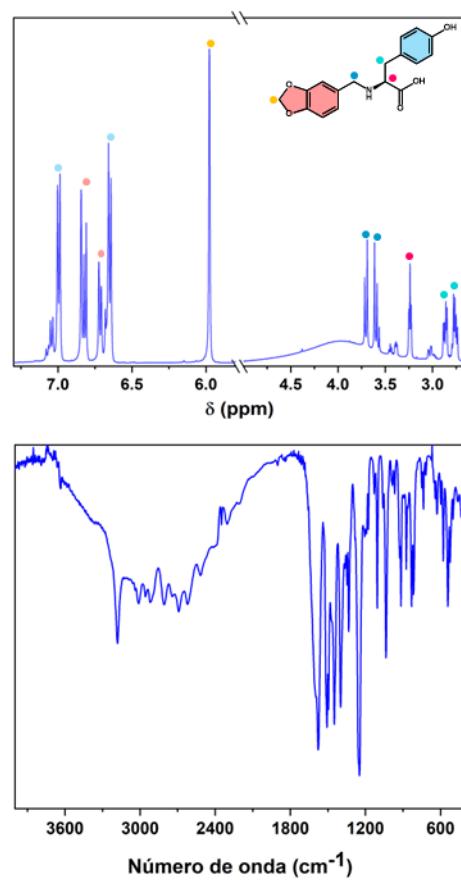
2.a: Datos para la sal de sodio: RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ= 7,32 – 7,18 (m, 5H), 6,84 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,44 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,81 (s, 2H), 3,64 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,45 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,17 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 2,65 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =240nm, 283nm, en DMSO λ_{max} =281nm, Frecuencias de FTIR (KBr): ν(O—H) = 3408,6 cm⁻¹, ν(N—H) = 3176,7 cm⁻¹, ν(C=O) = 1578,9 cm⁻¹.



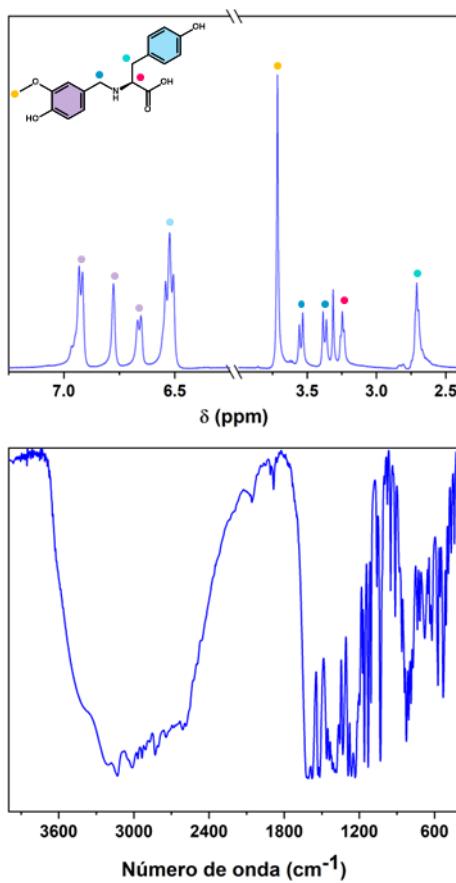
2.d: Datos para la sal de sodio: RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ = 7,85 – 7,76 (m, 5H), 7,62 (s, 1H), 7,50 – 7,41 (m, 3H), 7,32 (dd, J = 8,4, 1,6 Hz, 1H), 6,93 – 6,83 (m, 2H), 6,52 – 6,44 (m, 2H), 3,81 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 3,61 (d, J = 13,1 Hz, 1H), 3,22 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 2,68 (dd, J = 6,7, 3,1 Hz, 2H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =224nm, 246nm, en DMSO λ_{max} =278nm, Frecuencias de FTIR (KBr): $\nu(\text{O}-\text{H})$ = 3419,6 cm^{-1} , $\nu(\text{N}-\text{H})$ = 3177,5 cm^{-1} , $\nu(\text{C}=\text{O})$ = 1574,1 cm^{-1} .



2.e: Datos para la sal de sodio. RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ = 7,04 – 6,95 ppm (d, J = 8,4 Hz, 2H), δ = 6,86 – 6,78 ppm (m, 2H), δ = 6,74 – 6,67 ppm (d, J = 7,7 Hz, 1H), δ = 6,69 – 6,59 ppm (d, J = 8,4 Hz, 2H), δ = 6,04 – 5,93 ppm (s, 2H), δ = 3,73 – 3,65 ppm (d, J = 13,4 Hz, 1H), δ = 3,61 – 3,50 ppm (d, J = 13,4 Hz, 1H), δ = 3,26 – 3,19 ppm (t, J = 6,6 Hz, 1H), δ = 3,20 – 3,10 ppm (s, 1H), δ = 2,88 – 2,80 ppm (dd, J = 13,8, 6,2 Hz, 1H), δ = 2,79 – 2,69 ppm (m, 1H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} = 239 nm, 287 nm, Frecuencias de FTIR (KBr): $\nu(\text{O}-\text{H})$ = 3376,9 cm⁻¹, $\nu(\text{N}-\text{H})$ = 3180,2 cm⁻¹, $\nu(\text{C}=\text{O})$ = 1577,6 cm⁻¹.



2.f: Datos para la sal de sodio: RMN ¹H (500 MHz, D₂O) δ= 6,92 (d, *J* = 7,4 Hz, 3H), 6,78 (s, 1H), 6,66 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,52 (t, *J* = 8,7 Hz, 5H), 3,71 (s, 3H), 3,54 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,37 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H), 3,31 (s, 1H), 3,25 (s, 1H), 2,71 (s, 2H), UV-Vis en solución acuosa básica, λ_{max} =220nm, 242nm, en DMSO λ_{max} =279nm, Frecuencias de FTIR (KBr): ν(O—H) = 3394,1 cm⁻¹, ν(N—H) = 3128,0 cm⁻¹, ν(C=O) = 1575,1 cm⁻¹.



Síntesis de los materiales mesoestructurados

Geles supramoleculares

Los geles supramoleculares fueron sintetizados utilizando la metodología de sobresaturación térmica, que consiste en calentar una suspensión del agente gelificante en el solvente seleccionado hasta la disolución total, para luego bajar la temperatura hasta alcanzar el punto de sobresaturación. La formación del gel se evidencia por un cambio la consistencia de la muestra y se verifica empleando el ensayo del tubo invertido. La proporción de agente gelificante para cada solvente fue puesta a punto en función del ensayo realizado y se encuentra debidamente informada en el apartado de discusión correspondiente.

Mesocristales

Los sólidos mesocristalinos fueron sintetizados a través del secado directo de soluciones de igual concentración de **1.e** y **2.e** y distinta concentración de NaOH, variando de 5 a 0,22M por medio de diluciones sucesivas empleando una placa multiwells. El material obtenido fue lavado con agua y secado al vacío.

Información Suplementaria del Capítulo III

Tablas cristalográficas.

Tabla S1. Tablas cristalográficas para la estructura de la sal de cloruro del compuesto **1.a**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C6	1.264(2)	C14	N1	C8	113.18(16)
N1	C8	1.507(3)	C24	N2	C3	109.10(17)
N1	C14	1.503(3)	C18	C1	C10	120.0(2)
O4	C4	1.193(3)	C18	C1	C26	118.9(2)
N2	C24	1.493(3)	C26	C1	C10	121.0(2)
N2	C3	1.495(3)	O4	C4	O3	125.8(2)
O2	C6	1.225(3)	O4	C4	C14	122.5(2)
O3	C4	1.297(3)	O3	C4	C14	111.7(2)
C1	C10	1.514(3)	O1	C6	C24	115.89(17)
C1	C18	1.395(3)	O2	C6	O1	124.63(19)
C1	C26	1.399(3)	O2	C6	C24	119.47(17)
C4	C14	1.529(3)	N1	C8	C16	111.95(17)
C6	C24	1.545(3)	C1	C10	C24	109.80(17)
C8	C16	1.510(3)	C20	C12	C16	120.1(2)
C10	C24	1.533(3)	N1	C14	C4	109.88(17)
C12	C16	1.401(3)	N1	C14	C17	109.70(17)
C12	C20	1.394(4)	C17	C14	C4	111.20(18)
C14	C17	1.528(3)	C12	C16	C8	119.9(2)
C16	C28	1.399(3)	C28	C16	C8	121.0(2)
C18	C9	1.393(4)	C28	C16	C12	119.1(2)
C20	C2	1.386(4)	C9	C18	C1	120.7(2)
C22	C17	1.519(3)	C2	C20	C12	120.5(3)
C22	C23	1.379(4)	C23	C22	C17	121.8(2)
C22	C15	1.367(4)	C15	C22	C17	121.5(2)
C26	C11	1.399(3)	C15	C22	C23	116.6(3)
C28	C21	1.385(4)	N2	C24	C6	108.42(16)
C30	C3	1.507(4)	N2	C24	C10	110.49(16)
C30	C13	1.390(5)	C10	C24	C6	110.67(17)
C30	C29	1.390(4)	C1	C26	C11	120.2(2)
C32	C9	1.381(5)	C21	C28	C16	120.5(3)
C32	C11	1.388(4)	C13	C30	C3	121.0(3)
C2	C21	1.398(5)	C29	C30	C3	120.8(3)
C19	C5	1.360(5)	C29	C30	C13	118.1(3)
C19	C23	1.392(4)	C9	C32	C11	120.0(2)
C5	C31	1.352(6)	C20	C2	C21	119.6(3)
C25	C27	1.355(6)	C22	C17	C14	111.5(2)
C25	C29	1.416(5)	C32	C9	C18	120.1(3)
C13	C7	1.387(4)	C5	C19	C23	120.9(3)
C27	C7	1.385(6)	C31	C5	C19	118.0(3)
C15	C31	1.393(5)	C28	C21	C2	120.3(3)
			C32	C11	C26	120.1(3)
			C22	C23	C19	121.5(3)

N2	C3	C30	115.3(2)
C27	C25	C29	120.3(3)
C7	C13	C30	121.6(3)
C25	C27	C7	120.5(3)
C27	C7	C13	119.4(4)
C30	C29	C25	120.0(3)
C22	C15	C31	121.4(3)
C5	C31	C15	121.5(4)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
N1	H1A	O1 ¹	0.91	1.83	2.685(3)	155.5
N1	H1B	Cl1	0.91	2.19	3.081(2)	166.6
N2	H2A	O2 ²	0.91	1.98	2.876(3)	166.9
O3	H3	O1 ³	0.84	1.68	2.516(3)	170.8

¹—1/2+X,3/2—Y,1—Z; ²3/2—X,—1/2+Y,—Z; ³1—X,1—Y,+Z

Tabla S2. Tablas cristalográficas para la estructura de la sal de cloruro del compuesto **1.d**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C6	1.206(7)	C20	N1	C15	117.5(4)
O4	C6	1.321(6)	C8	C1	C11	118.4(5)
N1	C20	1.484(6)	C16	C1	C8	118.7(5)
N1	C15	1.510(6)	C16	C1	C11	122.9(5)
C1	C8	1.413(7)	C7	C4	C10	121.2(5)
C1	C16	1.409(7)	O1	C6	O4	125.9(5)
C1	C11	1.424(7)	O1	C6	C20	124.8(5)
C4	C10	1.397(7)	O4	C6	C20	109.2(4)
C4	C7	1.391(8)	C1	C8	C2	119.1(4)
C6	C20	1.516(7)	C14	C8	C1	119.3(4)
C8	C14	1.413(7)	C14	C8	C2	121.6(5)
C8	C2	1.423(7)	C4	C10	C12	120.8(5)
C10	C12	1.505(7)	C18	C10	C4	117.7(5)
C10	C18	1.393(7)	C18	C10	C12	121.5(4)
C12	C20	1.543(7)	C10	C12	C20	114.6(4)
C14	C13	1.372(7)	C13	C14	C8	121.4(5)
C16	C22	1.354(7)	C22	C16	C1	121.5(5)
C18	C19	1.388(8)	C19	C18	C10	121.1(5)
C22	C13	1.439(7)	N1	C20	C6	111.1(4)
C11	C3	1.358(7)	N1	C20	C12	111.0(4)
C3	C9	1.412(8)	C6	C20	C12	110.0(4)
C13	C15	1.495(7)	C16	C22	C13	120.4(5)
C7	C17	1.373(8)	C3	C11	C1	121.2(5)
C2	C9	1.362(8)	C11	C3	C9	120.4(5)
C17	C19	1.392(8)	C14	C13	C22	118.6(5)
O2	C21	1.327(12)	C14	C13	C15	120.7(5)
O3	C21	1.257(11)	C22	C13	C15	120.7(5)
C5	C21	1.475(13)	C17	C7	C4	120.3(5)
			C13	C15	N1	113.1(4)
			C9	C2	C8	120.8(5)
			C7	C17	C19	119.5(5)
			C2	C9	C3	120.1(5)

C18	C19	C17	120.2(5)
O2	C21	C5	114.4(9)
O3	C21	O2	121.6(10)
O3	C21	C5	124.0(9)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O4	H4	Cl1	0.84	2.19	2.963(4)	153.3
N1	H1A	Cl1 ¹	0.91	2.28	3.150(5)	160.7
N1	H1B	Cl1 ²	0.91	2.46	3.164(5)	134.1
C20	H20	O1 ³	1.00	2.35	3.159(6)	137.7
O2	H2A	O3 ⁴	0.84	1.87	2.664(11)	157.2

¹1—X,1/2+Y,3/2—Z; ²—X,1/2+Y,3/2—Z; ³1+X,+Y,+Z; ⁴1/2+X,1/2—Y,2—Z

Tabla S3. Tablas cristalográficas para la estructura del switerión del compuesto **1.d**

Tabla de distancias de enlace

Átomo	Átomo	Distancia (Å)
O1	C1	1.2501(13)
O2	C1	1.2586(14)
N1	C10	1.5048(13)
N1	C20	1.4924(13)
C1	C10	1.5486(16)
C4	C6	1.4158(16)
C4	C18	1.3809(15)
C4	C20	1.5160(14)
C6	C16	1.3769(15)
C8	C14	1.4201(17)
C8	C16	1.4167(15)
C8	C13	1.4246(15)
C10	C11	1.5311(15)
C12	C5	1.3992(16)
C12	C11	1.5116(15)
C12	C15	1.3980(16)
C14	C18	1.4224(15)
C14	C3	1.4262(15)
C5	C17	1.3926(16)
C3	C19	1.3759(16)
C13	C7	1.3734(17)
C7	C19	1.4116(18)
C15	C2	1.3945(16)
C2	C9	1.3917(17)
C17	C9	1.3911(17)

Tabla de ángulos de enlace

Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
C20	N1	C10	113.16(8)
O1	C1	O2	125.61(10)
O1	C1	C10	117.20(9)
O2	C1	C10	117.17(9)
C6	C4	C20	122.57(9)
C18	C4	C6	119.41(10)
C18	C4	C20	117.99(9)
C16	C6	C4	120.36(10)
C14	C8	C13	119.61(10)
C16	C8	C14	118.74(10)
C16	C8	C13	121.65(10)
N1	C10	C1	108.34(8)
N1	C10	C11	106.46(8)
C11	C10	C1	112.17(8)
C5	C12	C11	120.74(10)
C15	C12	C5	118.61(10)
C15	C12	C11	120.60(10)
C8	C14	C18	118.96(10)
C8	C14	C3	118.59(10)
C18	C14	C3	122.45(10)
C6	C16	C8	121.25(10)
C4	C18	C14	121.27(10)
N1	C20	C4	113.37(9)
C17	C5	C12	120.68(10)
C12	C11	C10	114.50(9)
C19	C3	C14	120.49(11)
C7	C13	C8	120.32(11)
C13	C7	C19	120.30(10)
C2	C15	C12	120.78(10)
C9	C2	C15	119.97(11)
C9	C17	C5	120.15(10)
C17	C9	C2	119.79(11)
C3	C19	C7	120.68(11)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
N1	H1A	O2 ¹	0.91	1.84	2.7362(17)	167.0
N1	H1B	O1 ²	0.91	1.91	2.8101(15)	167.6

¹1+X,+Y,+Z; ²1-X,-Y,1-Z

Tabla S4. Tablas cristalográficas para la estructura de la sal de sodio del compuesto **1.d**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
Na1	Na1 ¹	3.4779(2)	Na1 ¹	Na1	Na1 ²	174.25(6)
Na1	Na1 ²	3.4779(2)	O4	Na1	Na1 ¹	103.86(5)
Na1	O4	2.4103(19)	O4	Na1	Na1 ²	80.93(5)
Na1	O6	2.5212(19)	O6	Na1	O6	169.56(6)
Na1	O7 ²	2.3613(17)	O6	Na1	Na1 ¹	85.14(5)
Na1	O7	2.3401(17)	O6	Na1	Na1 ²	89.81(5)
Na1	O5 ¹	2.3650(16)	O7	Na1	Na1 ²	42.53(4)
Na1	O5	2.3217(16)	O7 ¹	Na1	Na1 ¹	42.05(4)
O1	C8	1.264(2)	O7 ¹	Na1	Na1 ²	135.80(5)
O3	C8	1.255(2)	O7	Na1	Na1 ¹	139.06(6)
N1	C6	1.480(2)	O7 ¹	Na1	O4	90.65(6)
N1	C18	1.482(2)	O7	Na1	O4	92.72(6)
C1	C5	1.422(2)	O7 ¹	Na1	O6	92.68(6)
C1	C11	1.374(3)	O7	Na1	O6	83.56(6)
C4	C10	1.391(3)	O7	Na1	O7 ¹	175.74(5)
C4	C7	1.393(3)	O7 ¹	Na1	O5 ²	94.77(6)
C6	C11	1.511(3)	O7	Na1	O5 ²	82.91(5)
C8	C18	1.539(2)	O5	Na1	Na1 ²	140.65(6)
C10	C12	1.395(3)	O5	Na1	Na1 ¹	42.57(4)
C12	C20	1.397(3)	O5 ²	Na1	Na1 ¹	134.75(5)
C12	C13	1.515(3)	O5 ²	Na1	Na1 ²	41.61(4)
C14	C5	1.420(3)	O5 ²	Na1	O4	85.58(6)
C14	C9	1.373(3)	O5	Na1	O4	98.21(6)
C16	C5	1.425(3)	O5	Na1	O6	92.00(6)
C16	C3	1.422(3)	O5 ²	Na1	O6	84.28(6)
C16	C17	1.421(3)	O5	Na1	O7	98.69(6)
C18	C13	1.546(2)	O5	Na1	O7 ¹	83.38(5)
C20	C19	1.392(3)	O5	Na1	O5 ²	175.78(5)
C11	C15	1.423(3)	Na1	O7	Na1 ²	95.42(5)
C3	C15	1.370(3)	Na1	O5	Na1 ¹	95.81(5)
C7	C19	1.392(3)	C6	N1	C18	114.52(15)
C2	C17	1.374(3)	C11	C1	C5	121.52(17)
C2	C9	1.413(3)	C10	C4	C7	120.23(19)
			N1	C6	C11	113.31(15)
¹ 2-X,-1/2+Y,1-Z; ² 2-X,1/2+Y,1-Z			O1	C8	C18	117.81(15)
			O3	C8	O1	124.03(17)
			O3	C8	C18	118.12(16)
			C4	C10	C12	120.68(18)
			C10	C12	C20	118.62(19)

C10	C12	C13	119.81(17)
C20	C12	C13	121.51(18)
C9	C14	C5	120.67(18)
C3	C16	C5	118.47(17)
C17	C16	C5	118.84(18)
C17	C16	C3	122.69(18)
N1	C18	C8	104.79(14)
N1	C18	C13	114.51(15)
C8	C18	C13	111.23(14)
C19	C20	C12	120.94(19)
C1	C5	C16	119.00(17)
C14	C5	C1	121.84(17)
C14	C5	C16	119.16(17)
C1	C11	C6	120.12(16)
C1	C11	C15	119.14(17)
C15	C11	C6	120.70(16)
C15	C3	C16	121.11(17)
C12	C13	C18	115.68(15)
C19	C7	C4	119.6(2)
C3	C15	C11	120.74(18)
C17	C2	C9	120.62(19)
C2	C17	C16	120.53(18)
C14	C9	C2	120.2(2)
C20	C19	C7	119.87(19)

¹2-X,1/2+Y,1-Z; ²2-X,-1/2+Y,1-Z

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
O7	H7A	O3	0.65(5)	2.20(5)	2.840(2)	169(5)
O4	H4A	O3 ¹	0.85	2.01	2.828(2)	161.2
O4	H4B	N1 ²	0.85	2.2	3.021(2)	163.1
O6	H6C	O3	0.85	2.04	2.874(2)	167.2
O6	H6D	O1 ³	0.85	2.07	2.879(2)	157.6
O7	H7B	O2 ⁴	0.92(4)	1.86(4)	2.774(2)	171(3)
O5	H5A	O2	0.78(4)	1.95(4)	2.719(2)	167(4)
O5	H5B	O1 ²	0.87(4)	1.93(4)	2.792(2)	172(3)
N1	H1	O4 ⁴	0.92(2)	2.15(2)	3.021(2)	158(2)
O2	H2A	N1 ⁵	0.85	1.97	2.794(2)	163.9
O2	H2B	O1	0.85	1.91	2.7545(19)	172

¹2-X,1/2+Y,1-Z; ²1-X,1/2+Y,1-Z; ³1+X,+Y,+Z; ⁴1-X,-1/2+Y,1-Z; ⁵+X,1+Y,+Z

Tabla S5. Tablas cristalográficas para la estructura de la sal de cloruro del compuesto **1.e**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C4	1.313(4)	C1	N1	C10	114.8(2)
O4	C4	1.213(4)	N1	C1	C4	107.6(2)
N1	C1	1.491(4)	N1	C1	C8	109.9(2)
N1	C10	1.508(4)	C4	C1	C8	112.7(3)
C1	C4	1.522(4)	O1	C4	C1	111.2(3)
C1	C8	1.530(4)	O4	C4	O1	125.6(3)

C6	C8	1.501(4)	O4	C4	C1	123.2(3)
C6	C14	1.376(6)	C14	C6	C8	121.8(4)
C6	C9	1.381(6)	C14	C6	C9	118.2(4)
C10	C12	1.490(5)	C9	C6	C8	120.0(4)
O2	C17	1.412(7)	C6	C8	C1	113.5(3)
O2	C3	1.369(10)	C12	C10	N1	111.0(3)
C12	C16	1.393(7)	C3	O2	C17	103.9(5)
C12	C11	1.387(6)	C16	C12	C10	119.8(4)
C14	C13	1.374(8)	C11	C12	C10	119.5(4)
C16	C5	1.377(6)	C11	C12	C16	120.7(4)
C17	C5	1.387(8)	C13	C14	C6	120.7(6)
C17	C15	1.329(10)	C5	C16	C12	115.7(5)
O3	C5	1.348(7)	C5	C17	O2	108.4(6)
O3	C3	1.452(8)	C15	C17	O2	126.7(6)
C9	C2	1.359(8)	C15	C17	C5	124.7(5)
C11	C15	1.384(8)	C5	O3	C3	102.6(6)
C13	C7	1.395(12)	C2	C9	C6	121.3(6)
C7	C2	1.335(12)	C16	C5	C17	121.0(5)
			O3	C5	C16	127.0(6)
			O3	C5	C17	112.0(5)
			C15	C11	C12	123.1(6)
			O2	C3	O3	112.1(5)
			C14	C13	C7	119.0(6)
			C2	C7	C13	120.4(5)
			C17	C15	C11	114.7(6)
			C7	C2	C9	120.4(7)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O1	H1	C11	0.82	2.22	3.003(2)	160.0
N1	H1A	C11 ¹	0.89	2.23	3.118(2)	174.7

¹+X,1+Y,+Z

Tabla S6. Tablas cristalográficas para la estructura del switerón del compuesto **1.f**

Tabla de distancias de enlace

Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C1	1.241(15)	C12	O2	C2	114.4(9)
O2	C2	1.448(16)	C16	N1	C17	116.0(9)
O2	C12	1.368(15)	O1	C1	O4	127.1(12)
O3	C5	1.360(13)	O1	C1	C16	119.0(12)
O4	C1	1.273(15)	O4	C1	C16	113.9(11)
N1	C16	1.501(15)	C8	C3	C7	118.2(12)
N1	C17	1.513(17)	C12	C4	C14	122.9(12)
C1	C16	1.548(16)	O3	C5	C12	122.2(11)
C3	C7	1.392(19)	O3	C5	C15	119.4(12)
C3	C8	1.376(16)	C15	C5	C12	118.4(10)
C4	C12	1.358(16)	C8	C6	C10	116.7(11)
C4	C14	1.385(18)	C8	C6	C13	121.2(12)
C5	C12	1.422(18)	C10	C6	C13	122.0(11)
C5	C15	1.386(19)	C9	C7	C3	121.5(12)
C6	C8	1.395(16)	C3	C8	C6	122.4(13)
C6	C10	1.397(18)	C10	C9	C7	118.4(14)

Tabla de ángulos de enlace

C6	C13	1.501(15)	C9	C10	C6	122.7(13)
C7	C9	1.384(19)	C15	C11	C14	120.2(13)
C9	C10	1.369(18)	O2	C12	C5	113.4(10)
C11	C14	1.412(18)	C4	C12	O2	127.1(12)
C11	C15	1.381(16)	C4	C12	C5	119.5(12)
C13	C16	1.543(19)	C6	C13	C16	115.1(11)
C14	C17	1.486(15)	C4	C14	C11	117.6(10)
			C4	C14	C17	119.5(12)
			C11	C14	C17	122.9(12)
			C11	C15	C5	121.2(12)
			N1	C16	C1	111.1(10)
			N1	C16	C13	110.0(10)
			C13	C16	C1	110.1(10)
			C14	C17	N1	116.6(11)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O3	H3	O4 ¹	0.84	1.99	2.644(12)	133.9
N1	H1A	O4 ²	0.91	1.82	2.726(13)	173.3
N1	H1B	O1 ³	0.91	1.94	2.761(12)	148.8

¹1—X,1/2+Y,1/2—Z; ²1+X,+Y,+Z; ³1/2+X,3/2—Y,1—Z

Tabla S7. Tablas cristalográficas para la estructura del switerión del compuesto **2.a**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C4	1.361(4)	C16	N1	C14	116.3(3)
O2	C9	1.249(4)	C7	C1	C14	119.5(3)
O3	C9	1.253(4)	C8	C1	C7	118.0(3)
N1	C14	1.506(5)	C8	C1	C14	122.3(3)
N1	C16	1.495(5)	C5	C2	C6	121.4(3)
C1	C7	1.400(5)	C8	C3	C15	120.0(3)
C1	C8	1.395(5)	O1	C4	C5	118.0(3)
C1	C14	1.506(5)	O1	C4	C12	122.3(3)
C2	C5	1.387(5)	C5	C4	C12	119.7(3)
C2	C6	1.399(5)	C2	C5	C4	119.8(4)
C3	C8	1.385(5)	C2	C6	C11	120.1(3)
C3	C15	1.388(6)	C10	C6	C2	117.7(3)
C4	C5	1.392(5)	C10	C6	C11	122.2(3)
C4	C12	1.395(5)	C13	C7	C1	120.6(4)
C6	C10	1.394(5)	C3	C8	C1	121.2(4)
C6	C11	1.515(5)	O2	C9	O3	127.4(3)
C7	C13	1.380(6)	O2	C9	C16	117.0(3)
C9	C16	1.545(5)	O3	C9	C16	115.6(3)
C10	C12	1.386(5)	C12	C10	C6	121.7(4)
C11	C16	1.522(6)	C6	C11	C16	114.7(3)
C13	C15	1.383(6)	C10	C12	C4	119.7(3)
			C7	C13	C15	120.8(4)
			N1	C14	C1	113.0(3)
			C13	C15	C3	119.4(4)
			N1	C16	C9	110.0(3)
			N1	C16	C11	110.5(3)
			C11	C16	C9	111.0(3)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O1	H1	O2 ¹	0.84	1.77	2.612(4)	177.6
N1	H1A	O3 ²	0.91	1.83	2.737(4)	176.1
N1	H1B	O1 ¹	0.91	2.18	2.854(4)	130.1

¹—1/2+X,3/2—Y,1—Z; ²—1+X,+Y,+Z

Tabla S8. Tablas cristalográficas para la estructura de la sal de cloruro del compuesto **2.a****Tabla de distancias de enlace**

Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C1	1.373(3)	C6	N1	C14	112.94(17)
O2	C8	1.297(3)	O1	C1	C3	122.1(2)
O3	C8	1.214(3)	O1	C1	C16	117.6(2)
N1	C6	1.498(3)	C16	C1	C3	120.3(2)
N1	C14	1.506(3)	C4	C2	C6	113.47(18)
C1	C3	1.390(4)	C1	C3	C9	119.5(2)
C1	C16	1.382(3)	C9	C4	C2	121.9(2)
C2	C4	1.514(3)	C9	C4	C10	118.0(2)
C2	C6	1.540(3)	C10	C4	C2	120.1(2)
C3	C9	1.398(3)	C7	C5	C12	119.8(3)
C4	C9	1.391(3)	N1	C6	C2	108.32(17)
C4	C10	1.391(3)	N1	C6	C8	106.22(17)
C5	C7	1.388(4)	C8	C6	C2	111.65(18)
C5	C12	1.393(3)	C11	C7	C5	119.7(3)
C6	C8	1.532(3)	O2	C8	C6	112.7(2)
C7	C11	1.388(5)	O3	C8	O2	125.9(2)
C10	C16	1.397(3)	O3	C8	C6	121.4(2)
C11	C15	1.369(5)	C4	C9	C3	121.2(2)
C12	C13	1.376(4)	C4	C10	C16	121.6(2)
C12	C14	1.505(3)	C15	C11	C7	120.3(3)
C13	C15	1.395(4)	C5	C12	C14	119.1(2)
			C13	C12	C5	120.1(2)
			C13	C12	C14	120.8(2)
			C12	C13	C15	119.8(3)
			C12	C14	N1	110.93(18)
			C11	C15	C13	120.2(3)
			C1	C16	C10	119.4(2)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O1	H1	Cl1	0.84	2.32	3.128(3)	160.4
N1	H1A	Cl1 ¹	0.91	2.30	3.127(3)	151.3
O4	H4A	O2	0.85	1.72	2.540(3)	160.1
O4	H4B	O1 ²	0.85	1.99	2.796(3)	158.0

¹—1+X,—1+Y,1+Z; ²1+X,—1+Y,+Z

Tabla S9. Tablas cristalográficas para la estructura del switerión del compuesto **1.e**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C1	1.374(5)	C14	O4	C17	105.2(4)
O2	C9	1.260(6)	C15	O5	C17	105.7(5)
O3	C9	1.252(7)	C8	N1	C10	115.3(4)
O4	C14	1.366(6)	O2	C9	C8	118.2(5)
O4	C17	1.434(9)	O3	C9	O2	126.2(5)
O5	C15	1.373(7)	O3	C9	C8	115.6(4)
O5	C17	1.442(8)	O1	C1	C6	117.7(5)
N1	C8	1.495(7)	O1	C1	C2	122.8(4)
N1	C10	1.509(6)	C2	C1	C6	119.5(4)
C9	C8	1.517(8)	C5	C6	C1	120.1(5)
C1	C6	1.387(7)	C6	C5	C4	121.3(5)
C1	C2	1.385(8)	C5	C4	C3	117.7(4)
C6	C5	1.382(7)	C5	C4	C7	120.6(4)
C5	C4	1.388(8)	C3	C4	C7	121.7(5)
C4	C3	1.398(7)	N1	C8	C9	110.1(4)
C4	C7	1.516(6)	N1	C8	C7	109.9(4)
C8	C7	1.540(7)	C9	C8	C7	110.4(4)
C3	C2	1.376(7)	C2	C3	C4	121.4(5)
C13	C14	1.364(8)	C14	C13	C12	117.7(5)
C13	C12	1.381(8)	C3	C2	C1	119.9(5)
C16	C11	1.388(8)	C15	C16	C11	117.8(5)
C16	C15	1.362(8)	C4	C7	C8	113.9(4)
C11	C10	1.508(7)	C16	C11	C10	119.5(5)
C11	C12	1.407(8)	C16	C11	C12	119.6(5)
C15	C14	1.397(9)	C12	C11	C10	120.8(5)
			O5	C15	C14	108.5(5)
			C16	C15	O5	129.1(5)
			C16	C15	C14	122.3(5)
			O4	C14	C15	110.3(5)
			C13	C14	O4	129.0(5)
			C13	C14	C15	120.7(5)
			C11	C10	N1	114.6(4)
			C13	C12	C11	121.8(5)
			O4	C17	O5	106.7(4)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O1	H1	O2 ¹	0.84	1.79	2.630(6)	175.8
N1	H1A	O3 ²	0.91	1.79	2.701(8)	175.2
N1	H1B	O1 ¹	0.91	2.20	2.879(6)	131.0
C10	H10B	O5 ³	1.03(8)	2.36(7)	3.182(7)	137(5)

¹1—X,—1/2+Y,—Z; ²+X,—1+Y,+Z; ³1—X,—1/2+Y,1—Z

Tabla S10. Tablas cristalográficas para la estructura del switerón del compuesto **1.f**

Tabla de distancias de enlace			Tabla de ángulos de enlace			
Átomo	Átomo	Distancia (Å)	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo (°)
O1	C1	1.249(2)	C3	O5	C15	115.88(15)
O4	C1	1.265(2)	C10	N1	C13	115.28(13)
O5	C3	1.373(2)	O1	C1	O4	126.66(16)
O5	C15	1.433(2)	O1	C1	C10	119.04(14)
O3	C12	1.356(2)	O4	C1	C10	114.30(14)
O2	C8	1.368(2)	C6	C4	C9	120.33(15)
N1	C10	1.499(2)	C5	C4	C6	118.02(16)
N1	C13	1.538(2)	C5	C4	C9	121.64(16)
C1	C10	1.543(2)	C17	C6	C4	121.21(16)
C4	C6	1.399(3)	O2	C8	C16	122.49(16)
C4	C9	1.510(2)	O2	C8	C17	117.81(16)
C4	C5	1.395(2)	C16	C8	C17	119.68(16)
C6	C17	1.387(3)	N1	C10	C1	111.25(13)
C8	C16	1.386(3)	N1	C10	C9	111.06(13)
C8	C17	1.398(3)	C9	C10	C1	111.57(13)
C10	C9	1.542(2)	O3	C12	C11	123.68(16)
C12	C11	1.384(3)	O3	C12	C3	116.70(15)
C12	C3	1.407(2)	C11	C12	C3	119.62(16)
C14	C13	1.503(3)	C7	C14	C13	120.74(16)
C14	C7	1.389(3)	C7	C14	C2	119.27(17)
C14	C2	1.406(2)	C2	C14	C13	119.99(17)
C16	C5	1.395(3)	C8	C16	C5	119.90(16)
C11	C7	1.399(3)	C6	C17	C8	119.94(16)
C3	C2	1.389(3)	C4	C9	C10	114.66(14)
			C16	C5	C4	121.25(17)
			C12	C11	C7	120.73(17)
			O5	C3	C12	115.31(15)
			O5	C3	C2	125.11(16)
			C2	C3	C12	119.57(15)
			C14	C13	N1	113.40(14)
			C14	C7	C11	120.01(17)
			C3	C2	C14	120.69(16)

Tabla de puentes de hidrógeno

D	H	A	d(D—H)/Å	d(H—A)/Å	d(D—A)/Å	D—H—A/°
O3	H3	O4 ¹	0.84	1.79	2.622(2)	168.8
O2	H2	O4 ²	0.84	1.90	2.683(2)	154.5
N1	H1A	O1 ³	0.91	2.00	2.907(2)	172.7
N1	H1B	O5 ²	0.91	2.19	3.057(3)	160.1

¹2—X,1/2+Y,1/2—Z; ²—1+X,+Y,+Z; ³1—X,1/2+Y,1/2—Z

Tabla S11. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los compuestos en DMSO a temperatura ambiente y a su temperatura de ebullición. Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo de 0 (verde). Todos los datos están informados en kJ/mol

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 25°C

	ΔG_{Desp}^m	ΔG_{Desp}^s	ΔG_{Sup}^P	ΔG_{Sup}^D
1.a	22.8	40.5	-175.1	-180.2
1.d	8.0	45.7	10.3	32.1
1.e	33.0	11.1	-218.2	-273.2
1.f	-6.4	32.6	-265.4	-227.9
2.a	24.9	34.6	19.7	-207.3
2.d	28.9	-2.6	-167.9	-249.4
2.e	35.9	81.4	18.6	7.2
2.f	30.3	69.4	-224.8	-250.0

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 189°C

	ΔG_{Desp}^m	ΔG_{Desp}^s	ΔG_{Sup}^P	ΔG_{Sup}^D
1.a	26.0	36.3	-156.4	-172.2
1.d	7.3	41.1	44.0	62.5
1.e	37.2	10.3	-208.8	-272.9
1.f	-9.2	30.6	-253.0	-212.1
2.a	23.0	27.7	56.6	-196.9
2.d	27.8	-3.1	-156.9	-236.7
2.e	37.1	76.1	51.4	32.2
2.f	31.1	59.2	-206.1	-243.1

Tabla S12. Diferencia entre los parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los compuestos en DMSO a temperatura ambiente y a su temperatura de ebullición. Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo de 0 (verde). Todos los datos están informados en kJ/mol

Diferencia entre los valores calculados a 189°C y 25°C

1.a	3.2	-4.2	18.7	8.1
1.d	-0.6	-4.7	33.7	30.3
1.e	4.2	-0.8	9.5	0.3
1.f	-2.7	-2.0	12.4	15.8
2.a	-1.9	-6.8	36.9	10.4
2.d	-1.1	-0.6	11.0	12.6
2.e	1.3	-5.3	32.8	25.0
2.f	0.8	-10.2	18.7	6.9

Tabla S13. Tabla de los parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los compuestos en agua en medio básico a temperatura ambiente y a su temperatura de ebullición. Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo de 0 (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 25°C

	ΔG_{Desp}^m	ΔG_{Desp}^s	ΔG_{Sup}^P	ΔG_{Sup}^D
1.a	16.4	24.4	13.0	14.3
1.d	18.7	111.8	-10.3	14.2
1.e	22.8	93.3	42.1	99.5
1.f	29.6	108.0	1.7	10.2
2.a	4.6	-19.0	6.7	-31.2
2.d	24.0	145.0	-96.6	31.2
2.e	2.8	17.8	30.2	32.7
2.f	5.2	95.1	-29.0	-5.6

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 100°C

	ΔG_{Desp}^m	ΔG_{Desp}^s	ΔG_{Sup}^P	ΔG_{Sup}^D
1.a	15.5	24.4	28.9	96.0
1.d	17.8	109.6	6.4	98.8
1.e	21.7	91.6	57.9	187.6
1.f	29.0	107.7	17.0	99.3
2.a	5.0	-19.0	24.0	59.7
2.d	21.8	142.5	-81.7	126.8
2.e	2.9	17.9	44.8	119.5
2.f	6.2	93.5	-13.4	81.1

Tabla S14. Diferencia entre los parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los compuestos en agua en medio básico a temperatura ambiente y a su temperatura de ebullición. Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo de 0 (verde). Todos los datos están informados en kJ/mol

Diferencia entre los valores calculados a 100°C y 25°C

1.a	-0.9	-0.1	15.9	81.7
1.d	-0.9	-2.2	16.7	84.6
1.e	-1.1	-1.8	15.8	88.1
1.f	-0.5	-0.3	15.3	89.1
2.a	0.3	0.0	17.3	90.9
2.d	-2.2	-2.5	14.9	95.6
2.e	0.1	0.1	14.6	86.8
2.f	1.1	-1.6	15.6	86.6

Cálculos computacionales de los espectros electrónicos

Para estudiar la factibilidad de la existencia de dímeros en solución (modelo propuesto) y su posible desensamblado en confórmeros distinguibles, se empleó el cálculo del espectro de absorción UV-Vis utilizando la teoría del funcional de la densidad mediante

TD-DFT (*time-dependent DFT*) sobre los dímeros plegados (Figura 16) y los monómeros plegados y desplegados. La decisión de emplear entidades diméricas como la representación de la arquitectura supramolecular en solución no está inspirada únicamente en lo reportado previamente para la L-Tirosina sino también en la necesidad de encontrar una entidad capaz de ser modelada computacionalmente de manera accesible, aunque es posible pensar en varias entidades extendidas o con distinto grado de agregación que podrían estar coexistiendo en estos sistemas. La simulación se realizó empleando un modelo de dieléctrico continuo para modelar el solvente y alineando el pico de máxima absorción experimental con la transición de mayor intensidad calculada. Este análisis se llevó a cabo con los derivados cuyos resultados experimentales sugieren la formación de estos aductos supramoleculares: **2** (L-Tirosina), **2.a**, **2.d**, **2.e**, **2.f** y **1.f** en agua básica.

Luego del análisis comparativo de los espectros experimentales determinados a temperatura ambiente con aquellos calculados para las estructuras de los dímeros optimizados vemos que, en la mayoría de los casos, el aspecto general del espectro, dado por el número de bandas en la región estudiada y la relación de intensidades entre ellas, muestran un buen grado de acuerdo (Figura S 1).

De todos los compuestos estudiados, los derivados **2.d** y **1.f** (derivados naftaldehído y vainillina, respectivamente) merecen un análisis especial debido a la diferencia de comportamiento que presentaron en comparación con sus aminoácidos precursores. Consistentemente con lo observado experimentalmente, mientras que el primero no muestra prácticamente similitud entre el espectro determinado experimentalmente y el calculado para el ensamble dimérico (modelo propuesto a temperatura ambiente), el segundo sí parece tener un grado aceptable de concordancia también considerando el aducto.

Por un lado, como se discutió previamente, para el caso de **2.d** se esperaba que la formación de la estructura dimérica estuviera fuertemente inhibida por el impedimento estérico asociado al residuo naftalénico. La presencia de un residuo de mayor tamaño y apolar como el grupo naftaleno no solamente implica una dificultad a la hora de optimizar el empaquetado que caracteriza al dímero si no que, además, brinda un gran aporte dispersivo y de apilamiento aromático a las interacciones que pueden desarrollarse entre monómeros. A medida que la temperatura aumenta y el efecto entrópico se agrava, el solvente segregá aún más este tipo de grupos apolares y voluminosos, dando lugar a la formación de agregados inespecíficos no estructurados.

Por otro lado, el hecho de que el espectro obtenido a temperatura ambiente para **1.f** presente coincidencias con el espectro calculado para el dímero, es otro claro indicio del carácter divergente de esta especie en solución. Efectivamente, este hecho concuerda con lo predicho al estudiar el impacto que podría tener la presencia de un hidroxilo en posición *para* en este tipo de estructuras. Adicionar un grupo donor/aceptor de puentes de hidrógeno en esa posición puede resultar en un comportamiento semejante al observado para la L-Tirosina debido a la presencia de su grupo fenol, propiciando la formación de agregados supramoleculares. En el Capítulo V se discutirá en detalle cómo este efecto podría impactar en la formación o inhibición de estructuras del tipo amiloide.

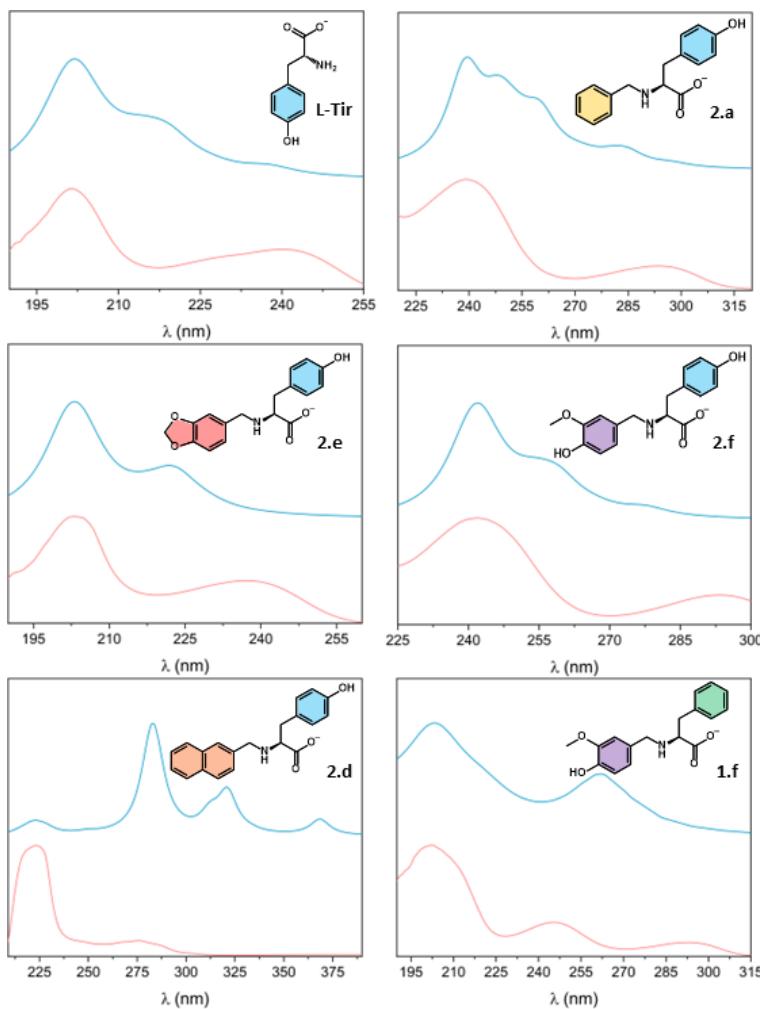


Figura S 1. Espectros de absorción UV-Vis de L-Tirosina y sus derivados, y de **1.f**, en agua básica a temperatura ambiente (rosa) y el espectro simulado por TD-DFT para el correspondiente dímero optimizado (modelo propuesto como la estructura predominante en solución a temperatura ambiente).

Considerando la hipótesis de la posible ruptura, total o parcial, de los dímeros supramoleculares propuestos como las estructuras supramoleculares más estables en solución y la obtención de monómeros al elevar la temperatura, es posible que los cambios espectrales observados puedan ser asignados a la desaparición de las entidades supramoleculares con la consiguiente aparición de los monómeros.

Para estudiar el comportamiento a alta temperatura, y poder discernir entre los distintos estados conformacionales presentes, se realizó la simulación de los espectros electrónicos de los confórmeros plegados y desplegados y se llevó a cabo la comparación con los datos experimentales (Figura S 2). En todos los casos, salvo para la L-Tirosina, los espectros obtenidos experimentalmente no son fácilmente asignables a través de una comparación directa con ninguno de los espectros calculados. Esto podría estar indicando que los resultados experimentales no reflejan el fenómeno de absorción de luz de un único estado conformacional sino, más bien, que provienen de una población de estados conformacionales heterogéneamente distribuida.

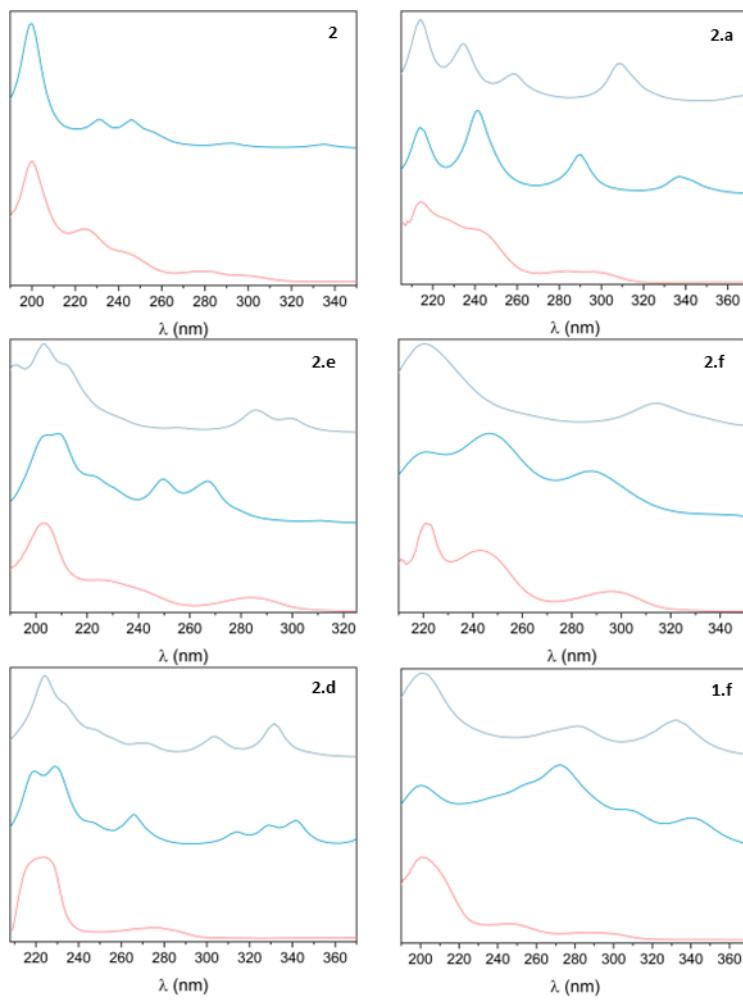


Figura S 2. Espectros UV-Vis obtenidos a 75°C para la L-Tirosina y sus derivados, y el compuesto **1.f** (rosa). En celeste se muestran los espectros calculados para cada compuesto en su conformación plegada y en gris para la conformación desplegada para los correspondientes monómeros (modelo propuesto como la estructura predominante en solución a alta temperatura).

Si realizamos el mismo análisis sobre los derivados de L-Fenilalanina a 75°C (Figura S 3) podemos observar que estos tampoco arrojan un resultado concluyente respecto a la asignación del estado conformacional.

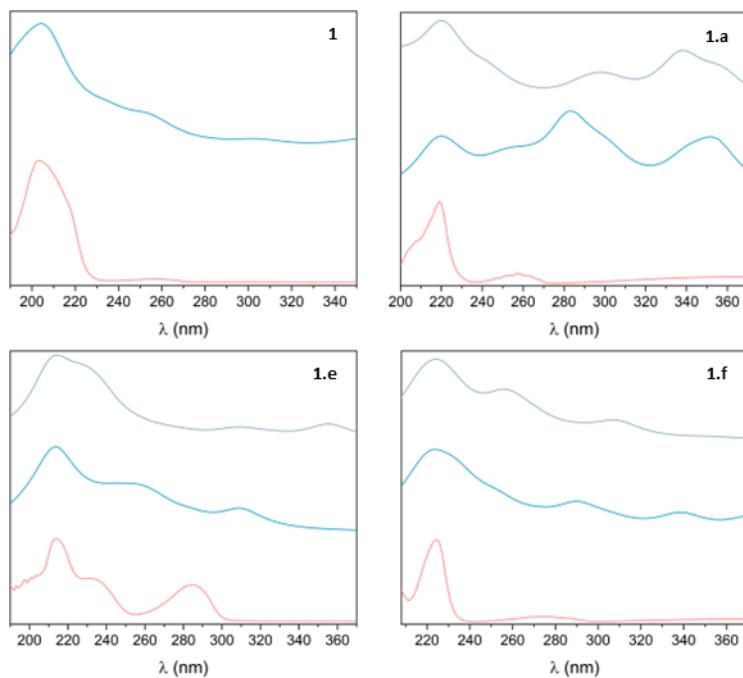


Figura S 3. Espectros UV-Vis obtenidos para la L-Fenilalanina y sus derivados a 75°C (rosa), y los espectros calculados para cada confórmero plegado (celeste) y desplegado (gris) para los correspondientes monómeros (modelo propuesto como la estructura predominante en solución a alta temperatura).

En conclusión, aunque los cálculos de simulación del espectro electrónico realizados sobre entidades diméricas fueron consistentes con la propuesta de la existencia de dímeros supramoleculares en solución a temperatura ambiente, estos no fueron concluyentes respecto a los resultados del análisis conformacional a altas temperaturas. Sin embargo, la implementación de estas simulaciones permitió confirmar la propuesta de que el compuesto **1.f** presentaba un comportamiento supramolecularmente divergente, análogo al observado para la L-Tirosina y sus derivados. Al mismo tiempo, fue posible corroborar la inhibición que se había propuesto para el desarrollo de entidades supramoleculares del compuesto **2.d**.

Apéndice

Sobre la relación entre estructura molecular, mecanismo de separación de fases y las propiedades del material resultante

La teoría de fluctuaciones de Cahn y Hilliard nos permite delimitar un marco termodinámico para el proceso de descomposición de una solución de dos componentes en términos de las fluctuaciones espontáneas en la concentración.^{81,82} Para poder visualizar esto, imaginemos una solución homogénea constituida por un conjunto de esferas rígidas de dos colores distintos. Debido a su naturaleza homogénea, si la miramos desde lejos veremos únicamente un color. Este color estará dado por el color de sus componentes y la cantidad que haya de cada uno en el sistema.

Pero, si pudiéramos observar el sistema a una escala atómico—molecular seríamos capaces de distinguir cada uno de los componentes por separado, y notaríamos que ninguno de los dos tiene el color que habíamos apreciado macroscópicamente. Además, debido al movimiento aleatorio de las partículas, se generarían regiones con mayor o menor contenido de alguno de los componentes. Si utilizamos nuevamente la metáfora de los colores podemos imaginarnos la solución representada con una paleta de tonos que va desde los colores puros de los componentes individuales, hasta la mezcla proporcional de ambos (Figura 52).

Esta representación pictórica del comportamiento colectivo de un sistema en términos del aporte de cada una de sus partes nos permite dar un soporte visual para visualizar el fenómeno de las fluctuaciones en la concentración local de un sistema que se aprecia macroscópicamente homogéneo.

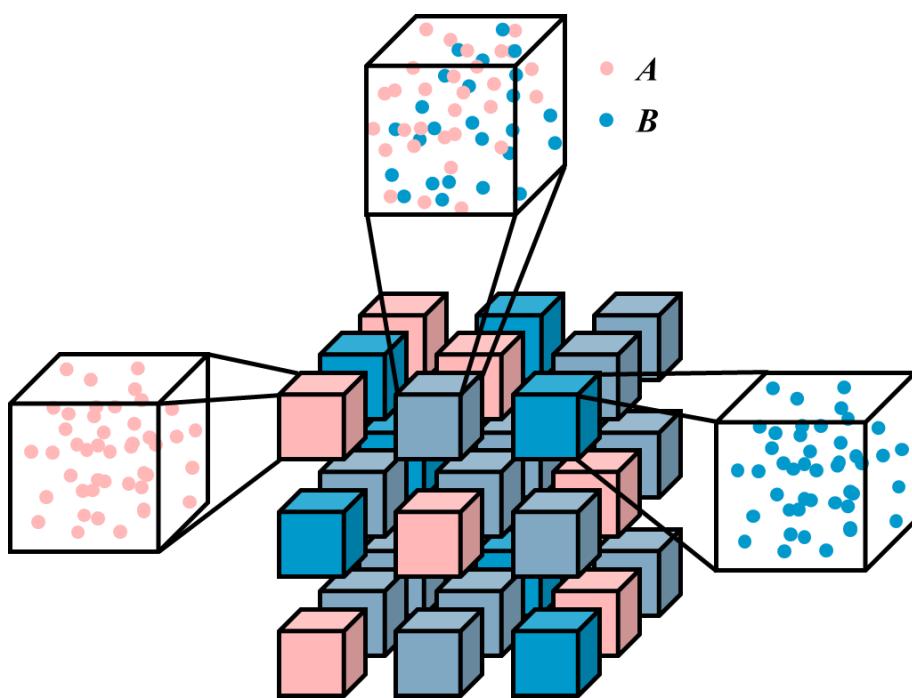


Figura 52. Representación esquemática de la escala atómico-molecular de un sistema homogéneo.

Cahn y Hilliard proponen un modelo matemático para describir el fenómeno de la fluctuación en las concentraciones en términos de una onda sinusoidal con una amplitud a y un vector de onda \vec{q} .⁸¹ Si consideramos una fluctuación en la concentración como un cambio infinitesimal de esta respecto al valor medio de la contracción, podemos modelar este diferencial como se indica en la Ecuación 8:

Ecuación 8. Definición del cambio infinitesimal en el valor de la concentración local en el modelo de Cahn y Hilliard

$$\delta c = a \sin(\vec{q} \cdot \vec{r})$$

El vector de onda puede relacionarse con el periodo espacial (λ) como se indica en la Ecuación 9. Para las ecuaciones desarrolladas de ahora en más evitaremos el uso de la notación vectorial en tanto solo vamos a realizar el análisis para la versión monodimensional de las expresiones. Esta reducción en la dimensionalidad del modelo no le quitará rigurosidad ya que las tres dimensiones espaciales pueden tratarse independientemente en los mismos términos:

Ecuación 9. Relación entre el vector de onda y el periodo espacial.

$$q = \frac{2\pi}{\lambda}$$

El diferencial sinusoidal definido en la Ecuación 8 podemos utilizarlo para realizar una expansión en polinomio de Taylor del cambio en la energía libre del sistema asociado a los cambios en la concentración. Para esto, Cahn y Hilliard acuñaron una expresión de la energía libre del sistema considerando una expansión de segundo orden que permite expresar la energía libre en términos del gradiente que se produce en la concentración (∇c), la energía libre de la solución macroscópica homogénea por unidad de volumen (f_b) y un

parámetro escalar (κ) que pondera el costo de alterar la energía libre al alterar la concentración (Ecuación 10).

Ecuación 10. Ecuación de Cahn y Hilliard para la energía libre de un sistema en términos de los cambios en su concentración.

$$F = \int_V [f_b + \kappa(\nabla c)^2] dV$$

Podemos expandir la energía libre del sistema macroscópico homogéneo alrededor del valor medio de la concentración como:

Ecuación 11

$$f_b(c) = f_b(c_0) + (c - c_0) \left(\frac{\partial f}{\partial c} \right)_{c=c_0} + \frac{1}{2} (c - c_0)^2 \left(\frac{\partial^2 f}{\partial c^2} \right)_{c=c_0} + \dots$$

Si consideramos únicamente hasta el término de segundo orden de la expansión y reemplazamos $(c - c_0)$ por δc obtenemos:

Ecuación 12

$$\begin{aligned} f_b + \kappa(\nabla c)^2 &= f_b(c_0) + a * \sin(\vec{q} * \vec{r}) \left(\frac{\partial f}{\partial c} \right)_{c=c_0} + \frac{1}{2} a^2 * \sin(\vec{q} * \vec{r})^2 \left(\frac{\partial^2 f}{\partial c^2} \right)_{c=c_0} \\ &\quad + a^2 \kappa q^2 \cos(\vec{q} \cdot \vec{r})^2 \end{aligned}$$

Integrando esta expresión respecto al volumen total del sistema, como indica la Ecuación 10, podemos utilizar las propiedades trigonométricas para mostrar que la integral en todo el volumen del seno dará 0, mientras que el seno y el coseno cuadrado darán un valor de $V/2$.

Esto nos permite reescribir la Ecuación 10 como:

Ecuación 13

$$\frac{\delta F}{V} = \left(\frac{a^2}{4} \right) \left[\left(\frac{\partial^2 f}{\partial c^2} \right)_{c=c_0} + 2\kappa q^2 \right]$$

Notemos que, para que el fenómeno de la descomposición sea favorable, necesitamos que el cambio en la energía libre del sistema frente a una fluctuación de concentración (el término a la izquierda de la igualdad en la Ecuación 13) sea negativo. Si este fuera positivo estaría indicando que el sistema aumenta su energía a medida que la fluctuación se desarrolla, lo cual implica que es más favorable quedarse en la condición de homogeneidad en la que se está antes que separarse.

Dado que el término de amplitud en la Ecuación 13 es siempre positivo, nos resta analizar qué sucede con la expresión entre corchetes. El término correspondiente al vector de onda es, también, siempre positivo dado que el parámetro escalar (κ) es positivo por definición. Por lo tanto, es la segunda derivada de la energía libre respecto a la concentración la responsable de brindar el signo negativo que disparará la descomposición del sistema. Esto permite reescribir el periodo espacial en términos de la segunda derivada de la energía libre del sistema respecto a la concentración (Ecuación 14).

Ecuación 14. Relación entre el periodo espacial de las fluctuaciones y la segunda derivada del sistema respecto a los cambios en la concentración.

$$\lambda_{Max} = \sqrt{\frac{-8\pi^2\kappa}{\left(\frac{\partial^2 f}{\partial c^2}\right)_{c=c_0}}}$$

Esta expresión permite determinar cuál es el valor máximo tolerado de tamaño medio de una fluctuación en la concentración. Todas aquellas fluctuaciones que se encuentren por debajo de este tamaño no darán lugar a una alteración apreciable de la segunda derivada del sistema respecto a los cambios en la concentración.

Veamos cuál es la relación entre esta frecuencia espacial de la fluctuación y la amplitud de esta. Para esto debemos integrar la Ecuación 8 en el espacio.

Ecuación 15

$$\int \delta c \delta V = \int a \sin(qr) \delta V$$

Ecuación 16

$$\delta c \cdot V = \frac{a}{q} \cdot -\cos(qr) + K$$

Notemos que, si hubiéramos integrado en todo el volumen del sistema, la parte izquierda de la igual debería haber dado 0 ya que todas las fluctuaciones tienen que verse compensadas y no pueden dar lugar la generación de un cambio neto en la concentración total. Por lo tanto, para que la igualdad se cumpla, el lado derecho de la igualdad también debería de haber dado 0. Considerando que el seno es una función impar, su integral en un volumen cerrado da 0. Entonces el valor de la constante de integración K también debe ser 0.

Por otro lado, si tomamos ahora un volumen de integración de cualquier tamaño menor al de la totalidad del sistema, del lado izquierdo de la igualdad obtendremos el número de partículas contenidas en ese volumen por culpa de la fluctuación de concentración. Esto implica que, del lado derecho, el parámetro de amplitud por vector de onda debe tener unidades de número de partícula para que la ecuación respete la coherencia.

Ecuación 17. Relación entre la amplitud de una fluctuación de concentración y su periodo espacial.

$$\delta c \cdot V = \delta n_V \therefore \left[\frac{a}{q} \right] = [a \cdot \lambda] = \text{número de partículas}$$

Esta demostración no solamente corrobora que la amplitud de la fluctuación de concentración tiene unidades de concentración, hecho que se desprendía trivialmente de la definición de una fluctuación, si no que esta es directamente proporcional al periodo de las fluctuaciones.

Habiendo encontrado una relación analítica entre la amplitud de una fluctuación de concentración y su periodo, consideremos ahora un espacio tridimensional subdividido en pequeñas porciones cúbicas cuyas aristas tienen un tamaño de media frecuencia

espacial $\lambda/2$. Estos cubos contendrán distinta cantidad de partículas de soluto en su interior. A ese cúmulo de partículas separadas periódicamente a una distancia $\lambda/2$ los denominaremos **nodos de concentración**. Debido a que estos nodos son productos de las propias fluctuaciones (en específico, son una representación alternativa de la misma), estos se adaptarán tanto en cantidad de soluto contenido como en tamaño para respetar la relación deducida en la Ecuación 17. Esta doble dependencia impone restricciones en la distribución de partículas en un sistema y da lugar a dos regímenes distintos.

Por un lado, podemos tener todas las partículas de soluto confinadas en pequeñas porciones del espacio. Esto dará lugar a la formación de nodos de alta concentración y pequeño volumen distribuidos espacialmente en una frecuencia elevada. Por otro lado, podemos tener las partículas del soluto dispersas en grandes volúmenes del espacio. Esto dará lugar a la formación de nodos de concentración de gran tamaño, pero baja concentración (Figura 53).

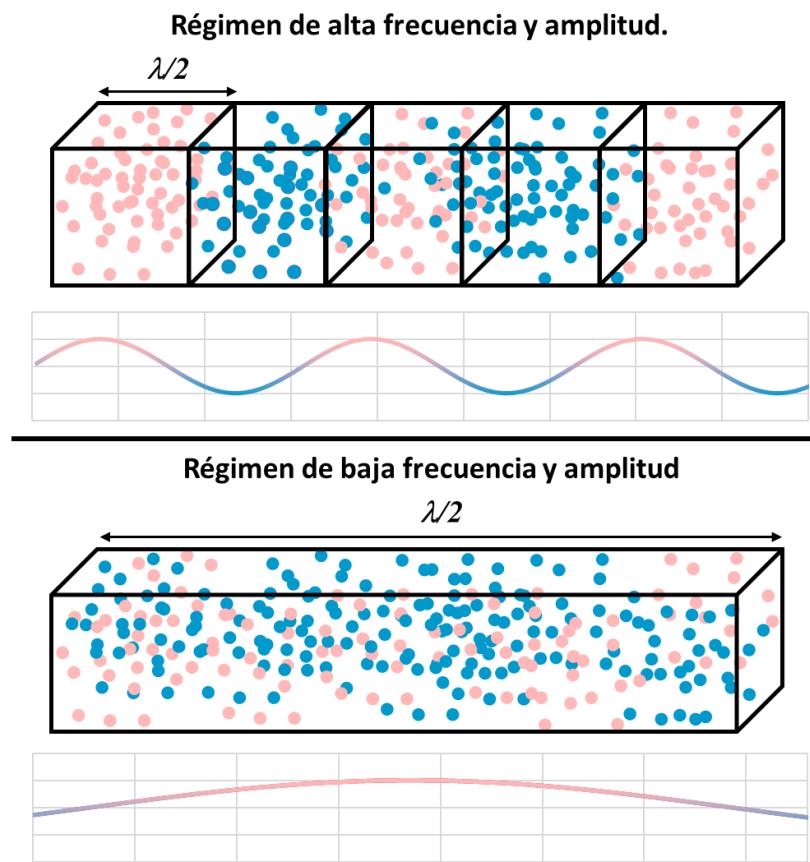


Figura 53. Representación esquemática de los regímenes de alta y baja frecuencia espacial en el modelo de fluctuaciones de la concentración.

Considerando que la migración molecular será la encargada de llenar o vaciar los nodos de concentración con partículas de soluto podemos preguntarnos qué rol cumple en este modelo la capacidad difusiva de una sustancia (Figura 54). Para estudiar esto podemos enfocarnos en el número de partículas que migren hacia el interior de un nodo o escapen de él. Este número de partículas estará definido por el flujo de partículas del soluto que atraviesen la superficie del nodo.

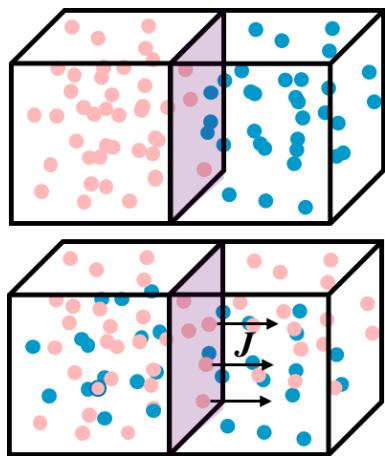


Figura 54. Esquema del fenómeno de migración molecular por difusión entre nodos de concentración

Si consideramos al nodo como un diferencial cúbico de volumen que tiene superficie δS y longitud $\lambda/2$, podemos expresar el diferencial de partículas que difunden entre nodos como:

Ecuación 18

$$\delta n = J \cdot \delta S$$

Utilizando la primera ley de Fick para el cálculo del flujo de partículas obtenemos:

Ecuación 19

$$\delta n = -D \cdot \frac{\delta C}{\delta x} \cdot \delta S$$

Considerando que el nodo de concentración puede aproximarse como un cubo regular cuyas aristas valen todas $\lambda/2$ y que la diferencia de concentración que actúa como fuerza impulsora de la difusión se estudia entre los centros de ambos cubos, podemos reescribir la Ecuación 19 como:

Ecuación 20

$$\delta n = -D \cdot \delta C \cdot \delta \lambda \cdot 2 = -D \cdot a \cdot \operatorname{sen}(x/\lambda) \cdot 2 \cdot \delta \lambda$$

Podemos integrar ambas partes de esta expresión sobre el volumen de un único nodo y luego sumarla sobre todos los nodos del sistema. Esto nos devolverá una relación entre todas las partículas de soluto presentes en la solución (n_{Total}), el coeficiente de difusión, el periodo espacial de la fluctuación, la amplitud, el conjunto de partículas contenidas en un nodo (n_N) y el número de nodos en el sistema (N).

Ecuación 21

$$\sum_1^N \int_0^{\lambda/2} \delta n = \sum_1^N \int_0^{\lambda/2} -D \cdot a \cdot \operatorname{sen}(x/\lambda) \delta \lambda$$

Ecuación 22

$$n_{Total} = D \cdot \frac{2a}{\lambda} \cdot N$$

Ecuación 23

$$n_N = D \cdot \frac{2a}{\lambda}$$

Por último, debemos establecer cual es valor máximo de partículas que puede contener un nodo. Para hacer esto podríamos pensar que, en cada nodo, si la concentración es suficiente, podría darse la génesis de una nueva fase. Más allá de que ya se discutió previamente que esto puede darse a través de diversas rutas termodinámicas el modelo de fluctuaciones debería de poder describir todas ellas sin distinción, en tanto la fluctuación en la concentración sucede para todo sistema homogéneo. En específico, podemos estudiar qué cantidad de partículas son necesarias para formar una nueva fase sólida cristalina. Este valor está establecido por la termodinámica y proviene de la relación que existe entre el costo energético de formar una nueva fase en el seno de un medio homogéneo y el beneficio que se produce al incrementar el volumen de un sólido. Para el caso puntual de los sólidos cristalinos, este valor puede pensarse como el número de moléculas para el cual el tamaño del cristal que se forma logra que la energía reticular venza al exceso superficial. Nodos con un número de partículas mayor a este darán lugar a la formación espontánea de centros de nucleación lo cual implica, de manera explícita, la formación de una nueva fase.

Definimos a la energía de formación de un núcleo cristalino como:

Ecuación 24

$$\Delta = G_{Nuc} = -\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot \Delta G_V + 4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \gamma$$

Donde r refiere al radio de la partícula que se está generando, $\Delta = G_V$ es la energía volumétrica asociada al incremento en el volumen de una fase y γ es la energía superficial (también conocido como exceso o tensión superficial).⁸³

Si queremos determinar cuál es el radio en el que ambos aportes energéticos se compensan debemos asumir que el evento de nucleación se encontrará en equilibrio y, por lo tanto, la energía libre asociada será nula. Igualando a 0 la ecuación 18 y despejando el valor del radio se obtiene la siguiente expresión:

Ecuación 25

$$r_{eq} = \frac{3\gamma}{\Delta G_V}$$

Por otro lado, sería ideal contar con una relación entre este radio y el número de partículas que se empaquetan para formar un aglomerado supramolecular. En una primera aproximación podríamos pensar que el radio de un cúmulo de moléculas puede calcularse como la suma directa de los radios de cada una de ellas. El problema es que esto no tiene en consideración el factor de forma de la partícula y su capacidad de empaquetarse. Por lo tanto, es preferible utilizar una expresión que emplee el volumen de la molécula y el factor de forma, como se muestra en la Ecuación 26. Esta ecuación proviene de aproximar el

volumen de un nodo como el volumen de una esfera para la cual el radio estará determinado tanto por el número de moléculas que contiene y el volumen de cada una de ellas, como por su factor de forma. Una expresión similar es utilizada para calcular el radio de giro de agregados moleculares con distintas dimensiones fractales durante un evento de percolación cinética.⁸⁴

Ecuación 26

$$r = \sqrt[3]{\frac{n_N \cdot v_{mol} \cdot 3}{4 \cdot F_f \cdot \pi}}$$

Donde v_{mol} es el volumen molecular.

Notemos que, si el factor de forma vale 1 (el caso de una molécula con una morfología tridimensional isotrópica) el radio calculado es equivalente al que se hubiera obtenido si se aproximaba el volumen del nodo por una esfera. Por el contrario, a medida que las partículas que componen el nodo presentan una mayor anisotropía se facilita su empaquetamiento, disminuyendo el radio aparente y aumentando el factor de forma molecular. El factor de forma en la Ecuación 26 cumple un rol equivalente al factor de empaquetamiento en los sólidos tridimensionales constituidos por esferas rígidas..⁸⁵

Si queremos comparar, por ejemplo, cilindros, discos y esferas, todos de igual volumen, los cilindros y los discos darán lugar a ensambles mucho más densos que los esperados para un conjunto de esferas. Esto se debe a que la misma carece de complementariedad morfológica consigo misma y deja mucho espacio libre al querer ser empaquetada (Figura 55).

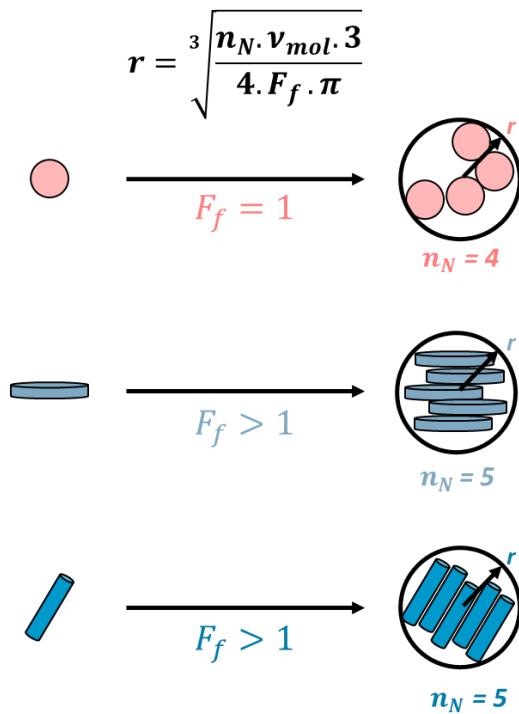


Figura 55. Esquema de representación del rol del factor de forma en el empaquetamiento de un ensamble de partículas y su impacto en el radio aparente.

Empleando la Ecuación 25 y la Ecuación 26 podemos encontrar una expresión para el número máximo de moléculas que pueden ser admitidas en un nodo de concentración antes de que este ya no pueda relajarse más y de lugar a la formación de una nueva fase.

Ecuación 27

$$n_N^{Max} = \frac{\gamma^3 \cdot F_f \cdot \pi \cdot 36}{\nu_{mol} \cdot \Delta G_V^3}$$

Notemos que hemos encontrado una expresión que depende únicamente de parámetros estructurales y termodinámicos, y que delimita el número máximo de partículas que pueden encontrarse interactuando en una dada región del espacio antes de formar una fase. Al mismo tiempo, utilizando la teoría de Cahn y Hilliard quedó determinada también la frecuencia espacial máxima que puede haber entre nodos de concentración antes de que el sistema se descomponga. Y ambas ecuaciones se relacionan a través de la Ecuación 23 en donde el coeficiente de difusión está actuando como intermediario. Considerando que tanto el número máximo de partículas en un nodo de concentración como el volumen máximo de este están determinados termodinámicamente para un dado sistema en un conjunto de condiciones experimentales, termina siendo la difusión molecular la única encargada de discernir entre los múltiples regímenes de fluctuación posibles.

Publicaciones y presentaciones en eventos científicos de los resultados de este capítulo

Publicaciones:

1. *Phenylalanine-Based Co²⁺ and Cd²⁺ 1D Coordination Polymers: Structural Properties and Catalytic Application for Solvent-Free Aerobic Oxidation of Cycloalkene.* Federico Movilla, Juan M Rey, Martín E Saleta, Marco González-Carvajal, Evgenia Spodine, Patricio Cancino, Florencia Di Salvo. *Inorg. Chem.* **2023**, 62, 42, 17136–17149
2. *Synthesis, Structural and Electrochemical Properties of a New Family of Amino Acid-Based Coordination Complexes* Juan Manuel Rey, Federico Movilla, Sebastian Angel Suarez, Florencia Di Salvo. *Acta Cryst. B.* **2022**, B78, 520-536
3. *Amine-Derivatized L-Phenylalanine and L-Tyrosine as Versatile Self-Assembled Platforms of Diverse Supramolecular Architectures: From Mesocrystals to Organogels.* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo. *Crystal Growth & Design*, **2021**, 21 (6), 3487-3499
4. *Nickel(II) complexes based on L-amino-acid-derived ligands: synthesis, characterization and study of the role of the supramolecular structure in carbon dioxide capture.* Andrea Rivas Marquina, Federico Movilla, Olga Carolina Sánchez Montilva, Eva Rentschler, Luca Carrella, Pablo Albores and Florencia Di Salvo. *Acta Cryst. B.* **2020**, B76, 825–838

Presentaciones a congresos:

1. ACS Spring 2021 National Meeting & Exposition. Abril de **2021**. *Synthesis and structural characterization of phenylalanine-based Co(II) and Cd(II) 1D coordination polymers and their use as efficient catalysts for aerobic oxidation of cycloalkenes”* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Luis Santibáñez, Evgenia Spodine, Patricio Cancino, Florencia Di Salvo.
2. 30th edition of LNLS Annual Users' Meeting. 09-12 Noviembre de **2020**. “*Unraveling the genesis of large supramolecular structures obtained from single aryl amino acid-based molecules*”. Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
3. Virtual Conference "2nd International Conference on 'Crystal Engineering: From Molecule to Crystal-2020 (CEFMC-2020)". 19-20 Junio de **2020**. *Synthesis and Growth of Versatile Systems based on Amino Acid Derivatives: from Supramolecular Organogels to Hierarchical Superstructures and Single Crystals.* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
4. Virtual Conference "2nd International Conference on 'Crystal Engineering: From Molecule to Crystal-2020 (CEFMC-2020)". 19-20 Junio de **2020**. *Nickel(II) complexes*

based on L-amino acids derived ligands: synthesis, characterization and study of the role of the supramolecular structure in the carbon dioxide capture. A. Rivas Marquina, F. Movilla, O. Sánchez Montilva, F. Di Salvo.

5. XV Reunión Anual de la AACr, Bariloche, Argentina, 13-15 de Noviembre de **2019**. *SISTEMAS BASADOS EN PEQUEÑAS MOLÉCULAS QUIRALES. MORFOLOGÍA, ORIENTACIÓN Y VERSATILIDAD CONFORMACIONAL.* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
6. XV Reunión Anual de la AACr, Bariloche, Argentina, 13-15 de Noviembre de **2019**. *ESTUDIO ESTRUCTURAL DE UNA NUEVA FAMILIA DE SISTEMAS DE COORDINACIÓN BASADOS EN LIGANDOS DERIVADOS DE LA L-FENILALANINA.* Juan Manuel Rey, Federico Movilla, Andrea Rivas, Florencia Di Salvo.
7. XV Reunión Anual de la AACr, Bariloche, Argentina, 13-15 de Noviembre de **2019**. *A NEW NI(II) COMPLEXES BASED ON L-AMINO ACIDS DERIVED LIGANDS: STUDYING THE ROLE OF THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE IN THE CARBON DIOXIDE CAPTURE.* A. Rivas Marquina, F. Movilla, O. Sánchez Montilva, F. Di Salvo.
8. “Exploring the Frontiers of Chemistry: Challenges for the 21st Century”, Buenos Aires, Argentina, 9-10 de Septiembre de **2019**. *SISTEMAS MATERIALES BASADOS EN PEQUEÑAS MOLÉCULAS QUIRALES DERIVADAS DE AMINOACIDOS.* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
9. “Exploring the Frontiers of Chemistry: Challenges for the 21st Century”, Buenos Aires, Argentina, 9-10 de Septiembre de **2019**. *A NEW NI (II) COMPLEXES BASED ON L-AMINO ACIDS DERIVED LIGANDS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND STUDY OF THE ROLE OF THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE IN THE CARBON DIOXIDE CAPTURE.* A. Rivas Marquina, F. Movilla, O. Sánchez Montilva, F. Di Salvo.
10. “International School on Fundamental Crystallography. Sixth MaThCryst school in Latin America and the Workshop on the Applications of Group Theory in the Study of Phase Transitions”, Bogota, Colombia, 28-30 Noviembre de **2018**. *Morfología y orientación en sistemas mesoestructurados basados en pequeñas moléculas quirales* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
11. III Reunión de la Asociación Latinoamericana de Cristalografía, Valparaíso, Chile, 10-12 octubre de **2018**. *MOLÉCULAS QUIRALES DE BAJO PESO MOLECULAR DERIVADAS DE AMINOÁCIDOS. DE LOS ORGANOGELES A LOS MESOCRISTALES.* Federico Movilla, Juan Manuel Rey, Cristián Huck Iriart, Florencia Di Salvo.
12. XIII Reunión Anual de la AACr, Bahía Blanca, Argentina, 1-3 de noviembre de **2017**. *Mesoestructuras nanoporosas y geles supramoleculares basados en derivados de aminoácidos.* Federico Movilla; Juan Manuel Rey; Florencia Di Salvo.
13. 24th Congress and General Assembly of the International Union of crystallography. Hyderabad, India, 21-28 Aug **2017**. *Low-molecular-weight amino-acid-based derivatives: from organogels to single crystals and mesocrystals.* Florencia Di Salvo; Federico Movilla; Juan Manuel Rey; Olga C. Sánchez M.

Bibliografía

- (1) Wang, L.; Gong, C.; Yuan, X.; Wei, G. Controlling the Self-Assembly of Biomolecules into Functional Nanomaterials through Internal Interactions and External Stimulations: A Review. *Nanomaterials* **2019**, *9* (2), 285. <https://doi.org/10.3390/nano9020285>.
- (2) Wang, J.; Liu, K.; Xing, R.; Yan, X. Peptide Self-Assembly: Thermodynamics and Kinetics. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (20), 5589–5604. <https://doi.org/10.1039/c6cs00176a>.
- (3) Hendricks, M. P.; Sato, K.; Palmer, L. C.; Stupp, S. I. Supramolecular Assembly of Peptide Amphiphiles. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (10), 2440–2448. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00297>.
- (4) Ulamec, S. M.; Radford, S. E. Spot the Difference: Function versus Toxicity in Amyloid Fibrils. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45* (8), 635–636. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.04.007>.
- (5) Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. The Amyloid State and Its Association with Protein Misfolding Diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>.
- (6) Eisenberg, D.; Jucker, M. The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **2012**, *148* (6), 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>.
- (7) Adler-Abramovich, L.; Vaks, L.; Carny, O.; Trudler, D.; Magno, A.; Caflisch, A.; Frenkel, D.; Gazit, E. Phenylalanine Assembly into Toxic Fibrils Suggests Amyloid Etiology in Phenylketonuria. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (8), 701–706. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1002>.
- (8) Shaham-Niv, S.; Adler-Abramovich, L.; Schnaider, L.; Gazit, E. Extension of the Generic Amyloid Hypothesis to Nonproteinaceous Metabolite Assemblies. *Sci. Adv.* **2015**, *1* (7), e1500137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500137>.
- (9) Ménard-Moyon, C.; Venkatesh, V.; Krishna, K. V.; Bonachera, F.; Verma, S.; Bianco, A. Self-Assembly of Tyrosine into Controlled Supramolecular Nanostructures. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (33), 11681–11686. <https://doi.org/10.1002/chem.201502076>.
- (10) Tao, K.; Levin, A.; Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. Fmoc-Modified Amino Acids and Short Peptides: Simple Bio-Inspired Building Blocks for the Fabrication of Functional Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (14), 3935–3953. <https://doi.org/10.1039/c5cs00889a>.
- (11) Cui, H.; Webber, M. J.; Stupp, S. I. Self-Assembly of Peptide Amphiphiles: From Molecules to Nanostructures to Biomaterials. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/bip.21328>.
- (12) Chen, L.; Revel, S.; Morris, K.; Serpell, L. C.; Adams, D. J. Effect of Molecular Structure on the Properties of Naphthalene-Dipeptide Hydrogelators. *Langmuir* **2010**, *26* (16), 13466–13471. <https://doi.org/10.1021/la102059x>.
- (13) Zhang, Y.; Kuang, Y.; Gao, Y.; Xu, B. Versatile Small-Molecule Motifs for Self-Assembly in Water and the Formation of Biofunctional Supramolecular Hydrogels. *Langmuir* **2011**, *27* (2), 529–537. <https://doi.org/10.1021/la1020324>.
- (14) Cohen-Gerassi, D.; Arnon, Z. A.; Guterman, T.; Levin, A.; Ghosh, M.; Aviv, M.; Levy, D.; Knowles, T. P. J.; Shacham-Diamand, Y.; Adler-Abramovich, L. Phase Transition and Crystallization Kinetics of a Supramolecular System in a Microfluidic Platform. *Chem. Mater.* **2020**, *32* (19), 8342–8349. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c02187>.

- (15) Banik, D.; Kundu, S.; Banerjee, P.; Dutta, R.; Sarkar, N. Investigation of Fibril Forming Mechanisms of L-Phenylalanine and I-Tyrosine: Microscopic Insight toward Phenylketonuria and Tyrosinemia Type II. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (7), 1533–1543. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b12220>.
- (16) Ji, W.; Xue, B.; Arnon, Z. A.; Yuan, H.; Bera, S.; Li, Q.; Zaguri, D.; Reynolds, N. P.; Li, H.; Chen, Y.; Gilead, S.; Rencus-Lazar, S.; Li, J.; Yang, R.; Cao, Y.; Gazit, E. Rigid Tightly Packed Amino Acid Crystals as Functional Supramolecular Materials. *ACS Nano* **2019**, *13* (12), 14477–14485. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08217>.
- (17) Braga, D.; Bazzi, C.; Grepioni, F.; Novoa, J. J. Electrostatic Compression on Non-Covalent Interactions: The Case of \$\uppi\$ Stacks Involving Ions. *New J. Chem.* **1999**, *23* (6), 577–579. <https://doi.org/10.1039/a901691k>.
- (18) Moggach, S. A.; Marshall, W. G.; Rogers, D. M.; Parsons, S. How Focussing on Hydrogen Bonding Interactions in Amino Acids Can Miss the Bigger Picture: A High-Pressure Neutron Powder Diffraction Study of \$\epsilon\$-Glycine. *CrystEngComm* **2015**, *17* (28), 5315–5328. <https://doi.org/10.1039/c5ce00327j>.
- (19) Dunitz, J. D. Intermolecular Atom–Atom Bonds in Crystals? *IUCrJ* **2015**, *2* (2), 157–158. <https://doi.org/10.1107/s2052252515002006>.
- (20) Song, R.-Q.; Cölfen, H. Mesocrystals-Ordered Nanoparticle Superstructures. *Adv. Mater.* **2009**, *22* (12), 1301–1330. <https://doi.org/10.1002/adma.200901365>.
- (21) Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. The Physical Properties of Supramolecular Peptide Assemblies: From Building Block Association to Technological Applications. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (20), 6881–6893. <https://doi.org/10.1039/c4cs00164h>.
- (22) Coelfen, H.; Antonietti, M. *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization*; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2008.
- (23) Liu, Y.; Zhang, Y.; Wang, J. Mesocrystals as a Class of Multifunctional Materials. *CrystEngComm* **2014**, *16* (27), 5948–5967. <https://doi.org/10.1039/c4ce00256c>.
- (24) Rosseeva), E. V. S. (née; Cölfen, H. Mesocrystals: Structural and Morphogenetic Aspects. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (21), 5821–5833. <https://doi.org/10.1039/c6cs00208k>.
- (25) Zhou, L.; O'Brien, P. Mesocrystals — Properties and Applications. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (5), 620–628. <https://doi.org/10.1021/jz2015742>.
- (26) Draper, E. R.; Adams, D. J. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art. *Chem* **2017**, *3* (3), 390–410. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.07.012>.
- (27) Christoff-Tempesta, T.; Lew, A.; Ortony, J. Beyond Covalent Crosslinks: Applications of Supramolecular Gels. *Gels* **2018**, *4* (2), 40. <https://doi.org/10.3390/gels4020040>.
- (28) Chivers, P. R. A.; Smith, D. K. Shaping and Structuring Supramolecular Gels. *Nat. Rev. Mater.* **2019**, *4* (7), 463–478. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0111-6>.
- (29) Feng, X.; Liu, C.; Wang, X.; Jiang, Y.; Yang, G.; Wang, R.; Zheng, K.; Zhang, W.; Wang, T.; Jiang, J. Functional Supramolecular Gels Based on the Hierarchical Assembly of Porphyrins and Phthalocyanines. *Front. Chem.* **2019**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00336>.
- (30) Okesola, B. O.; Smith, D. K. Applying Low-Molecular Weight Supramolecular Gelators in an Environmental Setting – Self-Assembled Gels as Smart Materials for Pollutant Removal. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (15), 4226–4251. <https://doi.org/10.1039/c6cs00124f>.
- (31) Edwards, W.; Smith, D. K. Enantioselective Component Selection in Multicomponent Supramolecular Gels. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (3), 1116–1124. <https://doi.org/10.1021/ja411724r>.

- (32) Shen, Z.; Jiang, Y.; Wang, T.; Liu, M. Symmetry Breaking in the Supramolecular Gels of an Achiral Gelator Exclusively Driven by π -Stacking. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (51), 16109–16115. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10496>.
- (33) Kaufmann, L.; Kennedy, S. R.; Jones, C. D.; Steed, J. W. Cavity-Containing Supramolecular Gels as a Crystallization Tool for Hydrophobic Pharmaceuticals. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (66), 10113–10116. <https://doi.org/10.1039/c6cc04037c>.
- (34) Das, T.; Häring, M.; Haldar, D.; Díaz, D. D. Phenylalanine and Derivatives as Versatile Low-Molecular-Weight Gelators: Design, Structure and Tailored Function. *Biomater. Sci.* **2018**, 6 (1), 38–59. <https://doi.org/10.1039/c7bm00882a>.
- (35) Reja, A.; Biswas, A.; Yadav, J.; Dev, D.; Das, A. K. Induction of Supramolecular Helical Handedness in a Chemical Reaction Directed Self-Healable Soft Material. *ChemistrySelect* **2017**, 2 (34), 10984–10989. <https://doi.org/10.1002/slct.201702212>.
- (36) Aykent, G.; Zeytun, C.; Marion, A.; Özçubukçu, S. Simple Tyrosine Derivatives Act as Low Molecular Weight Organogelators. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41142-z>.
- (37) Viedma, C.; Coquerel, G.; Cintas, P. 22 - Crystallization of Chiral Molecules. In *Handbook of Crystal Growth (Second Edition)*; Nishinaga, T., Ed.; Elsevier: Boston, 2015; pp 951–1002. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56369-9.00022-8>.
- (38) Sohncke groups - *Online Dictionary of Crystallography*. https://dictionary.iucr.org/Sohncke_groups (accessed 2023-08-02).
- (39) Flack, H. D. Chiral and Achiral Crystal Structures. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86 (4), 905–921. <https://doi.org/10.1002/hlca.200390109>.
- (40) Bada, J. L. Racemization of Amino Acids. In *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Barrett, G. C., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1985; pp 399–414. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4832-7_13.
- (41) Sajewicz, M.; Gontarska, M.; Wojtal, Ł.; Kronenbach, D.; Leda, M.; Epstein, I. R.; Kowalska, T. Experimental and Model Investigation of the Oscillatory Transenantiomerization of *L*- α -Phenylalanine. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, 31 (13), 1986–2005. <https://doi.org/10.1080/10826070802197578>.
- (42) Godziek, A.; Łagiewka, A.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. The Influence of Heavy Water as a Solvent on the Spontaneous Oscillatory Reactions of α -Amino Acids. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2018**, 123 (1), 141–153. <https://doi.org/10.1007/s11144-017-1221-z>.
- (43) Rey, J. M.; Movilla, F.; Suárez, S. A.; Di Salvo, F. Synthesis, Structural and Electrochemical Properties of a New Family of Amino-Acid-Based Coordination Complexes. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2022**, 78 (3), 520–536. <https://doi.org/10.1107/S2052520622003912>.
- (44) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, 7 (1), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6).
- (45) Mannige, R. V. An Exhaustive Survey of Regular Peptide Conformations Using a New Metric for Backbone Handedness (h). *PeerJ* **2017**, 5, e3327. <https://doi.org/10.7717/peerj.3327>.
- (46) Movilla, F.; Rey, J. M.; Saleta, M. E.; González-Carvajal, M.; Spodine, E.; Cancino, P.; Di Salvo, F. Phenylalanine-Based Co^{2+} and Cd^{2+} 1D Coordination Polymers: Structural Properties and Catalytic Application for Solvent-Free Aerobic Oxidation of Cycloalkene. *Inorg. Chem.* **2023**, 62 (42), 17136–17149. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c02053>.
- (47) Rivas Marquina, A.; Movilla, F.; Sánchez Montilva, O. C.; Rentschler, E.; Carrella, L.; Albores, P.; Di Salvo, F. Nickel(II) Com-plexes Based on L-Amino-Acid-Derived

- Ligands: Synthesis, Characterization and Study of the Role of the Supramolecular Structure in Carbon Dioxide Capture. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2020**, *76* (5), 825–838. <https://doi.org/10.1107/S2052520620010008>.
- (48) Binder, K. Theory of First-Order Phase Transitions. *Rep. Prog. Phys.* **1987**, *50* (7), 783. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/50/7/001>.
- (49) Wagner, C. Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen (Ostwald-Reifung). *Z. Für Elektrochem. Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **1961**, *65* (7–8), 581–591. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19610650704>.
- (50) Vetter, T.; Igglund, M.; Ochsenbein, D. R.; Hänseler, F. S.; Mazzotti, M. *Modeling Nucleation, Growth, and Ostwald Ripening in Crystallization Processes: A Comparison between Population Balance and Kinetic Rate Equation*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/cg4010714>.
- (51) Beran, G. J. O.; Nanda, K. *Predicting Organic Crystal Lattice Energies with Chemical Accuracy*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/jz101383z>.
- (52) Guell Izard, A.; Bauer, J.; Crook, C.; Turlo, V.; Valdevit, L. Ultrahigh Energy Absorption Multifunctional Spinodal Nanoarchitectures. *Small* **2019**, *15* (45), 1903834. <https://doi.org/10.1002/smll.201903834>.
- (53) Portela, C. M.; Vidyasagar, A.; Krödel, S.; Weissenbach, T.; Yee, D. W.; Greer, J. R.; Kochmann, D. M. Extreme Mechanical Resilience of Self-Assembled Nanolabyrinthine Materials. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (11), 5686–5693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916817117>.
- (54) Senhora, F. V.; Sanders, E. D.; Paulino, G. H. Optimally-Tailored Spinodal Architected Materials for Multiscale Design and Manufacturing. *Adv. Mater.* **2022**, *34* (26), 2109304. <https://doi.org/10.1002/adma.202109304>.
- (55) Ohzono, T.; Katoh, K.; Wang, C.; Fukazawa, A.; Yamaguchi, S.; Fukuda, J. Uncovering Different States of Topological Defects in Schlieren Textures of a Nematic Liquid Crystal. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 16814. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16967-1>.
- (56) Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochemistry*, 4th ed.; Brooks/Cole, Cengage Learning: Belmont, CA, 2010.
- (57) Freifelder, D.; Davison, P. F. Hyperchromicity and Strand Separation in Bacterial DNA. *Biophys. J.* **1962**, *2* (3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(62\)86853-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(62)86853-2).
- (58) Huggins, M. T.; Kesharwani, T.; Buttrick, J.; Nicholson, C. Variable Temperature NMR Experiment Studying Restricted Bond Rotation. *J. Chem. Educ.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00057>.
- (59) Lesot, P.; Lafon, O.; Kagan, H. B.; Fan, C.-A. Study of Molecular Rotational Isomerism Using Deuterium NMR in Chiral Oriented Solvents. *Chem. Commun.* **2006**, No. 4, 389–391. <https://doi.org/10.1039/B514694A>.
- (60) Yeargers, E.; Augenstein, L. UV Spectral Properties of Phenylalanine Powder. *Biophys. J.* **1965**, *5* (5), 687–696.
- (61) Horwitz, J.; Strickland, E. H.; Billups, C. Analysis of Vibrational Structure in the Near-Ultraviolet Circular Dichroism and Absorption Spectra of Phenylalanine and Its Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (1), 184–190. <https://doi.org/10.1021/ja01029a034>.
- (62) Del Galdo, S.; Mancini, G.; Daidone, I.; Zanetti Polzi, L.; Amadei, A.; Barone, V. Tyrosine Absorption Spectroscopy: Backbone Protonation Effects on the Side Chain Electronic Properties. *J. Comput. Chem.* **2018**, *39* (22), 1747–1756. <https://doi.org/10.1002/jcc.25351>.

- (63) Grinspan, H.; Birnbaum, J.; Feitelson, J. Environmental Effects on the Ultraviolet Absorption Spectrum of Tyrosine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biophys. Photosynth.* **1966**, 126 (1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/0926-6585\(66\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90031-8).
- (64) Nartowski, K. P.; Ramalhete, S. M.; Martin, P. C.; Foster, J. S.; Heinrich, M.; Eddleston, M. D.; Green, H. R.; Day, G. M.; Khimyak, Y. Z.; Lloyd, G. O. The Plot Thickens: Gelation by Phenylalanine in Water and Dimethyl Sulfoxide. *Cryst. Growth Des.* **2017**, 17 (8), 4100–4109. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00213>.
- (65) Zaguri, D.; Shaham-Niv, S.; Chakraborty, P.; Arnon, Z.; Makam, P.; Bera, S.; Rencus-Lazar, S.; Stoddart, P. R.; Gazit, E.; Reynolds, N. P. Nanomechanical Properties and Phase Behavior of Phenylalanine Amyloid Ribbon Assemblies and Amorphous Self-Healing Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12 (19), 21992–22001. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c01574>.
- (66) Hsu, W.-P.; Koo, K.-K.; Myerson, A. S. The Gel-Crystallization of 1-Phenylalanine and Aspartame from Aqueous Solutions. *Chem. Eng. Commun.* **2002**, 189 (8), 1079–1090. <https://doi.org/10.1080/00986440213473>.
- (67) Basak, S.; Nanda, J.; Banerjee, A. A New Aromatic Amino Acid Based Organogel for Oil Spill Recovery. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (23), 11658–11664. <https://doi.org/10.1039/C2JM30711A>.
- (68) Wu, Y.; Zhang, T.; Xu, Z.; Guo, Q. High Internal Phase Emulsion (HIPE) Xerogels for Enhanced Oil Spill Recovery. *J. Mater. Chem. A* **2015**, 3 (5), 1906–1909. <https://doi.org/10.1039/C4TA05761A>.
- (69) Mondal, S.; Bairi, P.; Das, S.; K. Nandi, A. Phase Selective Organogel from an Imine Based Gelator for Use in Oil Spill Recovery. *J. Mater. Chem. A* **2019**, 7 (1), 381–392. <https://doi.org/10.1039/C8TA09732A>.
- (70) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, 9 (7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- (71) Agilent. CrysAlis PRO, 2014.
- (72) Farrugia, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: An Update. *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, 45 (4), 849–854. <https://doi.org/10.1107/S0021889812029111>.
- (73) Brockhauser, S.; Ravelli, R. B. G.; McCarthy, A. A. The Use of a Mini- κ Goniometer Head in Macromolecular Crystallography Diffraction Experiments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, 69 (7), 1241–1251. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003880>.
- (74) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66 (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- (75) Nascimento, A.; Araujo, E.; Hagio, C.; Almeida, S.; Rodrigues, A. C.; Barreto Barbosa Trivella, D.; Bruder, M.; Rustiguel, J. K.; Dislich Ropke, C.; Ravanelli Pessa, L.; Azevedo, H.; Cardoso, M.; Zeri, A. C. Launch of the Manacá Beamline at Sirius: First Protein Crystallography Structures and New Opportunities for Pharmaceutical Development Using Synchrotrons. *Synchrotron Radiat. News* **2021**, 34 (5), 3–10. <https://doi.org/10.1080/08940886.2021.1994310>.
- (76) Gabadinho, J.; Beteva, A.; Guijarro, M.; Rey-Bakaikoa, V.; Spruce, D.; Bowler, M. W.; Brockhauser, S.; Flot, D.; Gordon, E. J.; Hall, D. R.; Lavault, B.; McCarthy, A. A.; McCarthy, J.; Mitchell, E.; Monaco, S.; Mueller-Dieckmann, C.; Nurizzo, D.; Ravelli, R. B. G.; Thibault, X.; Walsh, M. A.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M. MxCuBE: A Synchrotron Beamline Control Environment Customized for Macromolecular Crystallography Experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **2010**, 17 (5), 700–707. <https://doi.org/10.1107/S0909049510020005>.

- (77) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *OLEX2*: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (78) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, *71* (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- (79) Neese, F.; Wennmohs, F.; Becker, U.; Ripplinger, C. The ORCA Quantum Chemistry Program Package. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152* (22), 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
- (80) Singh, R.; Devi, P. R.; Jana, S. S.; Devkar, R. V.; Chakraborty, D. Aminoacid-Derivatized Cu (II) Complexes: Synthesis, DNA Interactions and in Vitro Cytotoxicity. *J. Organomet. Chem.* **2017**, *849–850*, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.04.017>.
- (81) Cahn, J. W.; Hilliard, J. E. Free Energy of a Nonuniform System. I. Interfacial Free Energy. *J. Chem. Phys.* **1958**, *28* (2), 258–267. <https://doi.org/10.1063/1.1744102>.
- (82) Bates, P. W.; Fife, P. C. The Dynamics of Nucleation for the Cahn-Hilliard Equation. *SIAM J. Appl. Math.* **1993**, *53* (4), 990–1008.
- (83) Coelfen, H.; Antonietti, M. *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization*; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2008.
- (84) Heinson, W. R.; Chakrabarti, A.; Sorensen, C. M. Kinetic Percolation. *Phys. Rev. E* **2017**, *95* (5), 052109. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.95.052109>.
- (85) Li, S.; Zhao, J.; Lu, P.; Xie, Y. Maximum Packing Densities of Basic 3D Objects. *Chin. Sci. Bull.* **2010**, *55* (2), 114–119. <https://doi.org/10.1007/s11434-009-0650-0>.

"Recuérdanme como a un héroe"

G. A.

Capítulo IV

Estudio estructural y
supramolecular de las propiedades
de autoensamblado de
plataformas poliderivatizadas con
aminoácidos

ÍNDICE DEL CAPÍTULO IV

Introducción	231
Resultados y discusiones.....	236
Estructuras poliderivatizadas con L-Fenilalanina.....	236
Estructuras propuestas, análisis conformacional y de factor de forma.....	237
Química en solución	239
Dímeros, confórmeros y agregados.....	239
Caracterización espectroscópica en solución.....	241
Cálculos de estructura electrónica de parámetros termoquímicos	245
Mecanismo de precipitación y propiedades del material resultante	249
Materiales supramoleculares.....	255
Materiales mesoestructurados.....	255
Geles supramoleculares	259
Conclusiones y Perspectivas	262
Experimental.....	263
Instrumental.....	263
Síntesis y caracterización espectroscópica	265

Introducción

Tanto los péptidos compuestos por secuencias menores a cinco aminoácidos como los aminoácidos individuales han atraído mucho interés en la última década debido a su bajo costo en términos de síntesis y purificación, y su capacidad de ser modificados con relativa facilidad para modular sus propiedades, en comparación con el uso de macromoléculas.^{1,2} Gracias a que es posible conjugar distintos fragmentos moleculares en una misma estructura, la química supramolecular, la morfología y la naturaleza del autoensamblado de estos productos modificados puede ser tan diversa y adaptable como lo permitan los bloques de construcción empleados para su diseño. Esto nos provee de una herramienta muy poderosa para el desarrollo y la fabricación de nuevos materiales blandos bioinspirados.

Aunque actualmente existe en la bibliografía un consenso general sobre cómo es el mecanismo a través del cual la L-Fenilalanina,³ la L-Tirosina,⁴ y otros metabolitos de interés biológico interactúan en solución para dar lugar a la formación de agregados supramoleculares,⁵ no es fácil encontrar un estudio similar sobre derivados de L-Fenilalanina. Casi toda la bibliografía actualizada está centrada alrededor del fenómeno de autoensamblado de este aminoácido,^{6,7} o sus derivados más frecuentes en la síntesis orgánica, los cuales corresponden a moléculas obtenidas a partir de la modificación vía enlace amida.^{8,9} Como ya se presentó, son muy pocos los trabajos reportados de derivados amino secundarios de L-Fenilalanina.

Podemos pensar a la L-Fenilalanina como un fragmento molecular capaz de introducir propiedades específicas en sistemas complejos. Debido a la anfifilicidad, dada por la presencia de un anillo y un grupo aminoacídico en la misma estructura, esta molécula es capaz de promover la formación tanto de interacciones electroestáticas como de apilamiento aromático. Por este motivo es que tanto la L-Fenilalanina como muchos de sus derivados son capaces de llevar a cabo un autoensamblado eficiente, cuyas propiedades tanto fisicoquímicas como reológicas son relevantes para su aplicación en reparación de tejidos,¹ desarrollo de dispositivos para la entrega controlada de drogas en el organismo (fenómeno conocido como *drug delivery*),¹⁰ así como para el estudio de múltiples enfermedades relacionadas con el fenómeno de autoensamblado en condiciones fisiológicas.^{11,12}

Todos estos antecedentes, en conjunto con los resultados obtenidos en el grupo presentados en el capítulo anterior, y la enorme cantidad de posibilidades que permite el diseño estructural de nuevos derivados de aminoácidos, en especial para L-Fenilalanina, nos inspiran a seguir con nuestras investigaciones en este campo. Sin embargo, esta vez será empleando sistemas obtenidos a partir de la incorporación de más de una biomolécula en una plataforma aromática conveniente. Es interesante entender, además, los efectos en las propiedades supramoleculares resultantes a medida que aumenta el contenido de L-Fenilalanina en la estructura, así como la dependencia con respecto a la orientación y la conformación que estos residuos pueden adquirir. Poder comprender hasta qué punto el agregado de este aminoácido puede conferir propiedades específicas a una estructura

resulta esencial a la hora de diseñar nuevas moléculas bioinspiradas con potenciales aplicaciones.

El plegamiento de las macromoléculas presentes en sistemas biológicos está considerado actualmente como uno de los problemas principales de la biología molecular y la biofísica. Las moléculas de proteínas, por ejemplo, cuentan con un número enorme de conformaciones accesibles. Sin embargo, esto no les impide encontrar una única estructura tridimensional estable en un breve periodo de tiempo. Periodo que, es necesario aclarar, es mucho menor del que hubiera requerido explorar exhaustivamente todos y cada uno de los confórmeros posibles. A esta relación, aparentemente contradictoria, entre el gran número de estados accesibles y la unicidad del estado natural de plegamiento proteico se la conoce como Paradoja de Levinthal (Figura 1).¹³

Desde que fue enunciada por primera vez en 1968, resolver esta paradoja ha sido una de las grandes metas de la biología molecular. Una de las primeras conclusiones que se extrae de la propuesta de Levinthal es que el proceso de autoensamblado no parece seguir una metodología estocástica de exploración si no, más bien, resulta necesario que existan rutas particulares a través de las cuales se desarrolla el fenómeno de plegamiento en términos de que confórmeros en específico son alcanzados durante este proceso.

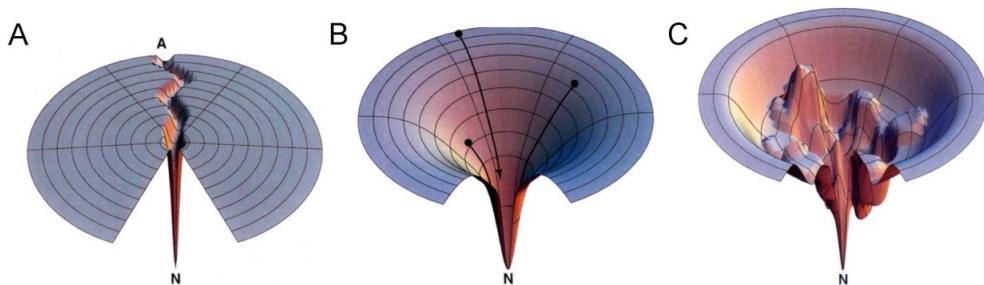


Figura 1. Representación tridimensional de los posibles paisajes energéticos que se generan al representar la energía libre interna de un polímero. Un punto en la superficie representa una dada conformación. La letra N representa el punto donde se alcanza la conformación de menor energía.

Para el caso de una proteína, esta sería la conformación nativa. (A) Paisaje energético plano, excepto por el estado de menor energía. Este es el estado asumido en la paradoja de Levinthal, que implica una búsqueda al azar entre conformaciones equiprobables. La grieta observada en la superficie representa un camino preferencial de plegamiento que facilitaría la búsqueda. (B) Un paisaje en forma de embudo que considera conjuntos estadísticos de conformaciones energéticamente más favorables. De este modo el polímero puede acceder al mínimo de energía, pero siguen existiendo múltiples caminos. (C) Contorno que considera la existencia de mínimos locales en la energía que generan frustraciones y trampas termodinámicas. Figura adaptada del trabajo de Dill y Chan.¹⁴

Entre las múltiples propuestas que se han hecho para intentar comprender cuáles son los factores que permiten seleccionar esta ruta de plegamiento, en los últimos años ha tomado impulso la idea de no concebir el plegamiento como un fenómeno dado por un conjunto de interacciones cuya complementariedad es suficiente como para explicar por sí misma la morfología supramolecular adquirida. Esto se basa, fundamentalmente, en la propuesta de que el aporte entálpico a la energía libre de Gibbs de todo el proceso se ve compensado al pasar de formar interacciones puentes de hidrógeno con el solvente a formar las mismas interacciones, pero intramolecularmente.¹⁵ Por lo tanto, parece ser el término entrópico el encargado de asistir en la selección del estado de plegamiento final

de una proteína. A esta selección de un estado conformacional en particular debido principalmente a la búsqueda del sistema de aumentar su entropía total se lo suele denominar “aparición de una fuerza entrópica”.¹⁶ Aunque esta fuerza no es tal, en términos de que no es un vector aplicado sobre una partícula por acción de un estímulo, sino que se trata de un fenómeno emergente de la acción colectiva de todos los componentes del sistema con el fin de estabilizarlo.¹⁷

Considerando al rol que parecen cumplir estas “fuerzas entrópicas” en los fenómenos de plegamiento de macromoléculas podemos entender cómo es su dependencia con respecto a ciertas condiciones experimentales, como son la temperatura, la libertad conformacional o la identidad del solvente. Por ejemplo, introducir una modificación estructural que altere la rigidez de la molécula tendrá un impacto directo en la cantidad de conformaciones accesibles, lo cual impactará de manera directa en la entropía total del fenómeno de plegamiento.

En los sistemas poliméricos tanto el solvente empleado como el estado de carga de la estructura estudiada impactan en la red de interacciones inter e intramoleculares desarrolladas y en la conformación adquirida (Figura 2). Esto tiene consecuencias directas tanto en la contribución entálpica como entrópica de todo el fenómeno. Adquirir un estado de carga neta, o emplear un solvente con una constante dieléctrica elevada, disminuirá la capacidad de interacción de los grupos funcionales presentes en las estructuras, tanto sea por repulsión electroestática como por efecto del apantallamiento. Esto podría dar como resultado un mayor número de estados conformacionales accesibles, debido a que la estructura cuenta con menos cantidad de puntos de anclaje entre grupos funcionales. Sin embargo, el universo de posibles estados conformacionales también se ve mermado al no poder acceder a todos aquellos estados que sí requieren la mediación de la interacción entre grupos funcionales para subsistir.

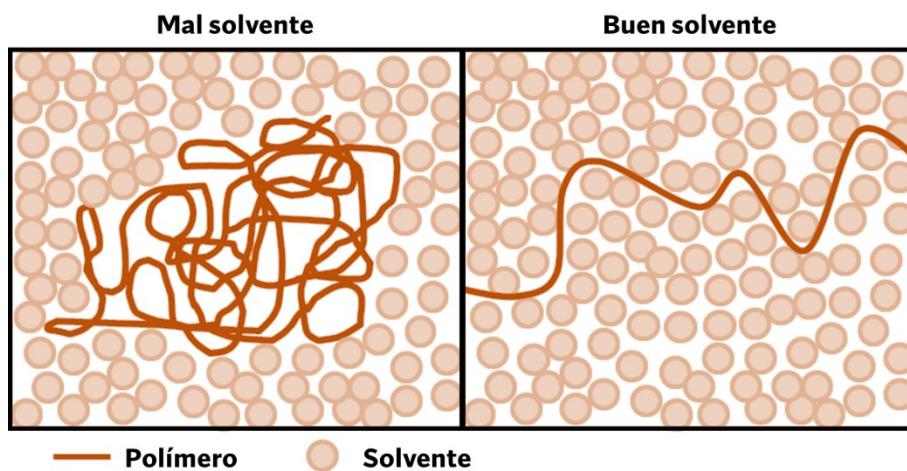


Figura 2. Efecto de un “buen” y un “mal” solvente sobre la conformación adquirida por un polímero.

El ejemplo que se ilustra en la Figura 2 muestra de manera clara lo difícil que puede llegar a ser predecir el impacto que tendrá una modificación, experimental o estructural, en el fenómeno de plegamiento de un sistema dado. Es por este motivo que, a lo largo de este capítulo, se pretende presentar una extensión a la utilización de las herramientas

previamente introducidas en el capítulo anterior (el factor de forma y la divergencia supramolecular) para el análisis y la predicción del comportamiento en compuestos que presentan dos o tres residuos de L-Fenilalanina.

Para estudiar en qué medida la incorporación de unidades de L-Fenilalanina a una estructura puede conferir propiedades específicas, para este capítulo se han sintetizado tres compuestos nuevos basados en plataformas aromáticas policarbonílicas utilizando L-Fenilalanina como aminoácido y empleando la misma ruta sintética presentada anteriormente para los monoderivados. En todos los casos se realizó una caracterización exhaustiva de su química en solución empleando técnicas espectroscópicas a temperatura variable en complementación con cálculos de estructura electrónica a nivel del funcional de la densidad.

Las caracterizaciones en solución han permitido observar el papel fundamental que cumplen tanto el solvente como el estado de carga en el autoensamblado de estos compuestos, y el delicado equilibrio que existe entre la agregación intermolecular y el plegamiento intramolecular. Por otro lado, la diversidad estructural permitió poner de manifiesto el rol que cumple la entropía en todos los fenómenos estudiados. Finalmente, se estudió la capacidad de formar materiales supramoleculares, poniendo especial atención en la formación de organogeles y diferentes tipos de agregados sólidos.

Para terminar con la introducción, incluimos ciertas definiciones y enfoques que se emplean a lo largo de este capítulo. A pesar de que los polímeros, tanto artificiales como naturales, son materiales que han sabido formar parte de grandes desarrollos tecnológicos y que han sido ampliamente estudiados desde hace tiempo, actualmente sigue siendo un gran motivo de debate definir de manera precisa a partir de qué extensión una estructura puede ser considerada un polímero.¹⁸ Esta limitación en la definición quedó aún más clara en las últimas décadas debido al surgimiento de polímeros enlazados con distintos tipos de uniones más allá de la covalente, como la de coordinación o las interacciones intermoleculares,^{19,20} los cuales abrieron el abanico de propiedades, masas, longitudes y tamaños que podían ser adquiridos por entidades consideradas poliméricas. Tampoco es posible establecer una definición clara en términos de la identidad de los bloques de construcción, debido a que la variedad de polímeros presentes en los sistemas biológicos muestra una enorme diversidad no solo de estos, sino también de los motivos y los patrones con los que estos se repiten en una cadena o red.²¹ Al parecer, la única propiedad claramente conservada entre todos estos sistemas es el rol fundamental que cumple tanto la entropía propia de la estructura, manifestada en la libertad conformacional, como las fuerzas entrópicas provenientes del entorno, en seleccionar el estado conformacional y, consecuentemente, modular varias de sus propiedades.^{22,23}

Por este motivo, resulta interesante contar con una definición versátil, que pueda ser adaptada a todos los tipos de polímeros y bloques de construcción que existen en la actualidad. Si pensamos en el “carácter polimérico” de una estructura como un parámetro, continuo y cuantificable, que se intensifica a medida que la estructura aumenta en extensión, y que impacta de manera directa en varias de las propiedades físicas y químicas relacionadas con el tamaño y la forma, como el coeficiente de difusión, la solubilidad, la reactividad o la propia morfología, entonces podemos emplear este concepto para clasificar todas las posibles sustancias. Simplemente basta con asignarle un “carácter

polimérico nulo” a todas aquellas especies que estén actuando como bloque de construcción y, de ahí en más, incrementar este valor de manera arbitraria a medida que la extensión altera alguna característica particular del sistema. Esta definición circunvala la necesidad de definir a un polímero como una entidad que tiene una propiedad específica, sino como una entidad cuyo “carácter polimérico”, propiedad intrínseca a toda sustancia, supera un dado valor. Gracias a esta definición podemos, por ejemplo, entender a los polímeros supramoleculares desarrollados a partir de péptidos anfifílicos²⁴ como entidades con un gran carácter polimérico (los péptidos supramoleculares) constituidas a partir de estructuras de menor carácter polimérico (los péptidos anfifilos) ensamblados a partir de la unión covalente de bloques con carácter polimérico nulo (los aminoácidos). De esta misma manera, empleando esta definición podemos clasificar a los compuestos poliderivados presentados durante este capítulo como entidades de “mayor carácter polimérico” que los presentados durante el Capítulo III, específicamente respecto al compuesto **1.a**, el monoderivado de la L-Fenilalanina obtenido a partir de la reacción con benzaldehído.

A lo largo de todo el capítulo se analizan varios resultados experimentales donde las moléculas presentan comportamientos usualmente esperados para materiales poliméricos, como la adquisición de estados conformacionales de menor volumen y factor de forma a medida que aumenta la temperatura.²⁵ Una de las principales hipótesis de este capítulo es la posibilidad de extender esta definición del “carácter polimérico” a moléculas usualmente consideradas como “pequeñas”, con el fin de poder emplear toda la maquinaria de conceptos y herramientas de análisis y predicción de la química conformacional y supramolecular, que ya están ampliamente establecidas para los materiales poliméricos. Con este fin, se propuso una manera de cuantificar este carácter polimérico a través del cálculo de la entropía del sistema al adquirir un estado conformacional y supramolecular dado, y se ilustró cómo esta cambia a medida que se modifica la cantidad de aminoácidos derivatizados en una estructura, permitiendo evaluar la relación entre la entropía y el estado conformacional más estable.

Resultados y discusiones

Estructuras poliderivatizadas con L-Fenilalanina

Para este capítulo se sintetizaron compuestos derivados de L-Fenilalanina y moléculas aromáticas que presentaran más de un grupo aldehído reactivo, como el tereftaldehído (compuesto **1.b**), el 1,3,5-triformilbenceno (compuesto **1.c**) y la divainillina (compuesto **1.g**).

Como se discutió en el Capítulo III, debido a la presencia de los grupos amino y ácido carboxílico en los compuestos resultantes, se estima que estos derivados presenten un comportamiento ácido-base anfótero, con un punto isoeléctrico muy cercano al correspondiente a su aminoácido precursor. Aunque este punto isoeléctrico no es simple de caracterizar debido a la baja solubilidad en agua de estos compuestos en estado switeriónico y la multiplicidad de estados de carga disponibles, se ha estimado que la región de pH en la que se observa una mayor concentración de la especie switeriónica es alrededor de pH=5. Debido a que el último paso de la síntesis empleada para la obtención de estos compuestos es, nuevamente, la precipitación en un medio moderadamente ácido ($\text{pH} \approx 4-5$) se estima que los mismos se obtienen como la especie switeriónica.

Así como se explicó en el capítulo anterior, para facilitar la representación, el estado de carga explícito (switeriónico o aniónico) será explicitado en las imágenes únicamente en los casos en que este sea esencial para la discusión de los resultados. En el resto de los casos, cuando la estructura molecular sea presentada únicamente a modo de etiqueta de una figura, esta será esquematizada sin cargas para facilitar la lectura.

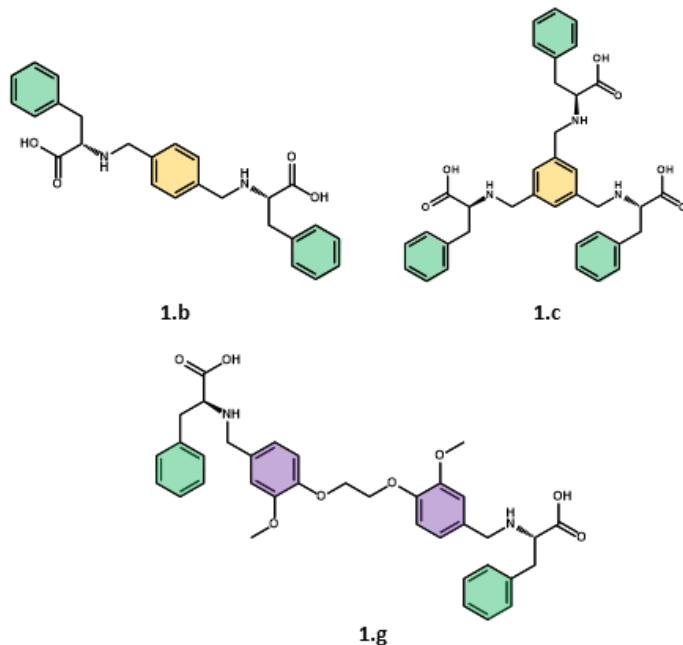


Figura 3. Compuestos sintetizados y que se discutirán en este capítulo del trabajo de tesis.

Aunque la ruta de síntesis empleada para la obtención de estos compuestos es análoga a la utilizada para los compuestos del Capítulo III, fue necesario poner a punto cada procedimiento particular para optimizar los tiempos de reacción, relación entre reactantes, y cantidades de base y agente reductor a emplear. Debido a que estos compuestos presentan un número mayor de aminoácidos por molécula, en algunos casos fue necesario introducir más de un paso de derivatización sobre el mismo compuesto con el fin de garantizar una transformación completa al compuesto deseado. Adicionalmente, para el caso puntual del compuesto **1.g**, fue necesario sintetizar también el precursor dialdehídico en base a métodos reportados previamente en bibliografía.²⁶ En la sección experimental se discute en detalle las cantidades empleadas y las consideraciones experimentales realizadas para cada compuesto.

Debido al parentesco estructural entre estos compuestos y **1.a**, introducido en el capítulo anterior, y considerando que la finalidad mayor de todo este trabajo de tesis consiste en encontrar relaciones entre estructuras moleculares y diversas propiedades, en algunas discusiones se incluirán también resultados obtenidos para este “monoderivado” con el fin de extender el análisis y la extracción de alguna dada tendencia.

Estructuras propuestas, análisis conformacional y de factor de forma

Para el estudio de las moléculas de este capítulo también se realizaron los cálculos de factor de forma de los monómeros y de diferentes agregados supramoleculares, siguiendo las estrategias ya descritas. Para modelar los agregados supramoleculares se realizaron los cálculos empleando tanto dímeros como trímeros. Además, para la construcción de estas entidades se ha tenido en cuenta las diferentes opciones de conformaciones que se describirán a continuación. Debido a la gran diversidad de confórmeros que pueden desarrollarse para las estructuras poliderivatizadas, se vuelve muy desafiante poder encontrar un único factor de forma que logre representar de manera estadística la distribución de tamaños y las relaciones de aspecto. No obstante, es posible pensar en, al menos, dos conformaciones extremas: aquella que maximiza el factor de forma y aquella que lo minimiza. A cada una de estas dos conformaciones las denominaremos conformación desplegada y conformación plegada, según corresponda. Desde la química supramolecular podemos notar que el confórmero de mayor factor de forma será aquel en el cual se encuentren inhibidas las interacciones intramoleculares y consecuentemente, la química supramolecular se encuentre disponible para interactuar eficazmente con el entorno. Al contrario, aquel confórmero que presente el menor factor de forma será el que contará con los grupos funcionales dispuestos a menor distancia entre sí, permitiendo que las interacciones intramoleculares se maximicen, inhibiendo así la interacción con los alrededores.

Al realizar los cálculos de optimización estructural sobre monómeros tomando como geometría de partida ambos tipos de confórmeros, se observa que los de mayor factor de forma no pueden ser optimizados sin sufrir fuertes alteraciones estructurales. Este resultado estaría indicando una pobre estabilidad de los monómeros en esa conformación. A diferencia de los compuestos monoderivados sintetizados en el Capítulo III, para los di- y triderivados la adquisición de estados conformacionales completamente desplegados no corresponde a un mínimo de energía, salvo que las mismas se encuentren

como parte de agregados supramoleculares densamente apilados (ver discusión más adelante). Por otro lado, los resultados obtenidos partiendo de los monómeros, que corresponden al menor factor de forma, permiten observar cómo este casi no se altera a lo largo de la optimización. Estos confórmeros casi no sufren alteraciones durante la optimización, tanto sea al estar aislados o conformando un agregado supramolecular.

A modo de ejemplo, en la Figura 4 se representa cómo varía el factor de forma de cada confórmero a medida que avanza la optimización geométrica para un monómero del compuesto **1.b** que parte del estado más y menos plegado (panel a, verde y celeste), y para un monómero que conforma un trímero supramolecular constituidos de tres confórmeros desplegados y plegados (panel b, verde y celeste). En los cuatro casos se puede observar cómo el factor de forma sufre leves variaciones durante la optimización salvo para el caso del monómero desplegado (panel a, verde), para el cual este parámetro sufre una disminución abrupta durante los primeros pasos de optimización hasta alcanzar una conformación semi-plegada, que luego se conserva sin mayores cambios hasta que es alcanzado el mínimo de energía.

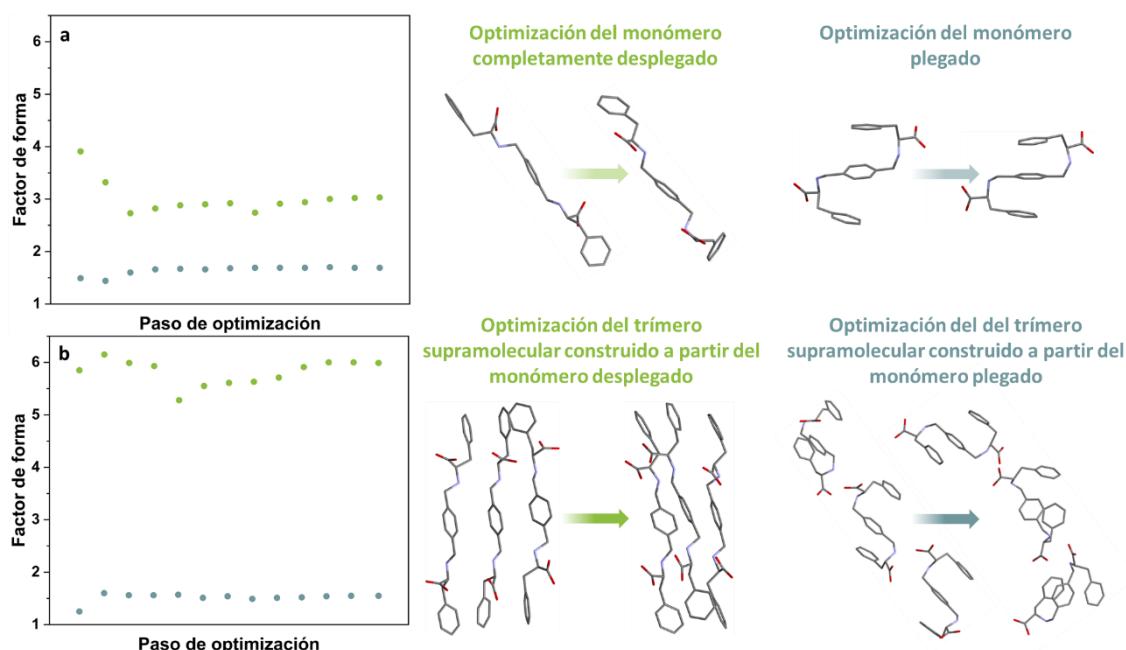


Figura 4. Factores de forma en función del paso de optimización para la estructura del compuesto **1.b** partiendo de (a) un monómero completamente desplegado (verde) y un monómero plegado, (celeste) y (b) un trímero supramolecular considerando como unidad un monómero desplegado (verde) y un trímero supramolecular considerando como unidad un monómero plegado (celeste). En este caso se muestran los resultados para las moléculas en estado switeriónico. Los hidrógenos fueron omitidos por claridad. El número de pasos de optimización fue normalizado en todos los casos empleando una escala arbitraria para facilitar la representación.

Este fenómeno de estabilización del estado conformacional desplegado a través del desarrollo de agregados supramoleculares no es exclusivo del compuesto **1.b**. Por el contrario, este efecto se manifiesta de forma mucho más clara al realizar la estabilización geométrica de los diversos confórmeros de los compuestos **1.c** y **1.g**.

A medida que el número de ramificaciones aumenta, o el aldehído central se vuelve más flexible, el efecto de la entropía en el favorecimiento de la conformación plegada es mucho más apreciable. Esto implica que para el compuesto **1.g** se debería ver más favorecido su estado plegado respecto a los compuestos **1.c** y **1.b**, los cuales presentan anillos centrales rígidos y planos.

Estos resultados podrían estar dando un indicio del papel seleccionador que cumple el “carácter polimérico” en el estado conformacional de estas estructuras, según se definió en la introducción. El hecho de que parece ser únicamente a través de la química supramolecular que se produzca la estabilización de estados conformacionales que, de otra forma, serían inestables individualmente, pone de manifiesto una vez más el delicado equilibrio que existe entre la libertad conformacional y el desarrollo de una red de interacciones intermoleculares.

Química en solución

Dímeros, confórmeros y agregados

Nuevamente, y de manera análoga a los discutido durante el Capítulo III, en las soluciones de estos compuestos se espera que puedan coexistir diversos tipos de estructuras, que van desde los monómeros hasta los agregados supramoleculares de orden superior, todos ellos con un estado conformacional específico. Pero, a diferencia de los monoderivados presentados anteriormente, por las características estructurales, mayor número de grupos funcionales y mayor flexibilidad, se espera que en la química en solución de todas estas moléculas se vea exacerbado el rol de las fuerzas entrópicas y crezca la tendencia al establecimiento de interacciones intramoleculares, en contraposición con la capacidad de desarrollar agregados supramoleculares. Para estudiar la diferencia entre estos dos fenómenos se debe realizar un análisis global de los resultados obtenidos a partir de las técnicas espectroscópicas en solución a temperatura variable de manera equivalente a lo realizado durante el Capítulo III. Adicionalmente, para complementar la discusión se utilizarán los resultados obtenidos mediante cálculos de estructura electrónica.

Debido a la enorme variedad de estados conformacionales y posibles ensambles que pueden presentar estas moléculas no es simple proponer un modelo sencillo que describa de manera rigurosa lo que podría estar sucediendo en solución sin recaer en una conceptualización reduccionista. Sin embargo, haciendo uso del conjunto de herramientas experimentales y computacionales presentadas en el Capítulo III podemos proponer un abordaje similar, considerando cuatro posibles entidades en solución que representen hasta cierto punto, la totalidad de las especies potencialmente presentes en el sistema (Figura 5, representada para el compuesto **1.b** a modo ilustrativo).

Las cuatro entidades definidas para el análisis consisten en los dos monómeros (*m*) en los estados conformacionales plegado (*P*) y desplegado (*D*) (**1.b_m^P** y **1.b_m^D**, respectivamente) y cada uno de los dímeros (*s*) obtenidos a partir de ellos (**1.b_s^P** y **1.b_s^D**, respectivamente). La elección de dímeros como modelos representativos de la totalidad de posibles arquitecturas supramoleculares presentes es meramente debido a la restricción computacional que impone la optimización geométrica y el cálculo de parámetros termoquímicos de sistemas tan grandes, pero debe quedar claro que no se

asume que estos agregados sean las únicas que podrían desarrollarse. El ΔG asociado a un proceso de ensamblado se representa como ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D en la Figura 5. El ΔG asociado a un proceso de desplegamiento de un confórmero se representa como ΔG_{Desp}^m y ΔG_{Desp}^s .

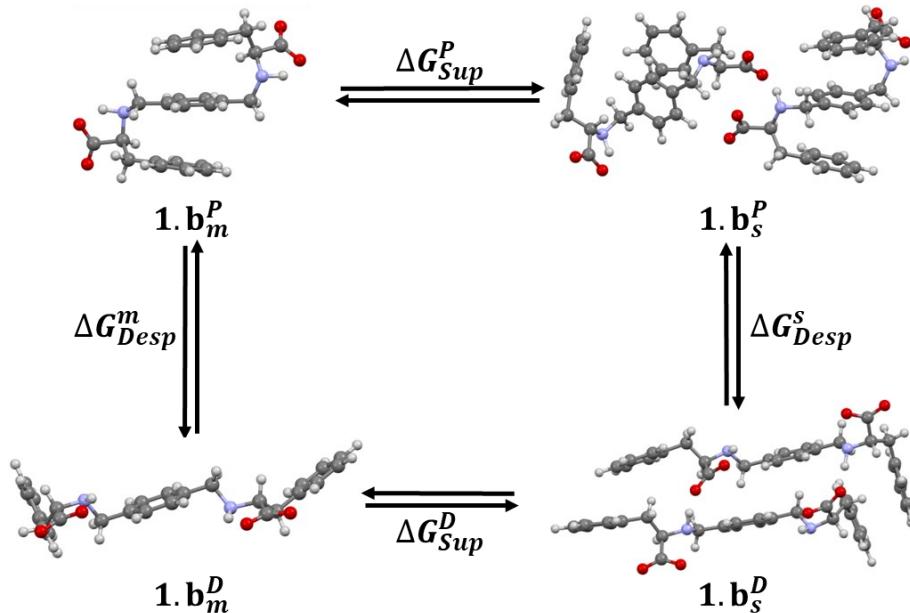


Figura 5. Esquema de las cuatro posibles entidades estructurales propuestas en los sistemas estudiados con su respectiva nomenclatura y los procesos de intercambios esperados, eligiendo ejemplo el compuesto **1.b** en estado aniónico. Los superíndices indican el estado conformacional adquirido por los bloques monoméricos (*D* o *P*) y los subíndices distinguen las entidades supramoleculares (*s*) de los monómeros (*m*). Para los cambios de energía se emplea ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D para representar al proceso de formación de los agregados supramoleculares empleando los monómeros en un dado estado conformacional, y ΔG_{Desp}^m y ΔG_{Desp}^s para representar el fenómeno de desplegamiento de los monómeros o los agregados supramoleculares.

Para estudiar el fenómeno de autoensamblado y alteración conformacional en solución se realizaron experimentos de espectroscopías de RMN-H¹ y de emisión de luz sobre soluciones acuosas básicas en un rango de temperaturas entre 25 y 45 °C, y espectroscopías de absorción de luz UV-Vis sobre las mismas muestras, pero empleando un rango de temperaturas de 25 a 75 °C (Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Tabla 4).

A causa de la enorme libertad configuracional que le brinda la poliderivatización a estos compuestos, resulta muy enriquecedor contar con información directa de los cambios locales sufridos por las distintas regiones de la molécula. Como se discutió en los capítulos anteriores, la resonancia magnética nuclear de núcleos de hidrógeno permite extraer información sobre alteraciones conformacionales debido al cambio en el entorno local (ver apartado correspondiente en el Capítulo III). En particular, para los tres compuestos estudiados a lo largo de este capítulo se enfocará el estudio en las alteraciones sufridas por la señal del grupo metileno proveniente del residuo aminoacídico a medida que cambia la temperatura. Esta señal es particularmente susceptible a cambios en la conformación de la estructura y será utilizada como diagnóstico de la presencia de cambios conformacionales, y de la naturaleza de estos. Se espera que la existencia de conformaciones desplegadas favorecerá la libre rotación de los enlaces involucrados en el

grupo metilénico y dará como resultado la coalescencia de las señales correspondientes a esos protones.

Por otro lado, de las espectroscopías de absorción UV-Vis a temperatura variable se puede extraer información sobre la alteración en la nube electrónica de las regiones aromáticas analizando la presencia o ausencia de hipocromismo en las bandas de absorción de la región ultravioleta. Esto permite obtener información sobre el autoensamblado y el papel que cumplen los anillos aromáticos y los puentes de hidrógeno durante este proceso. A medida que se rompen las interacciones no covalentes en una entidad supramolecular se redistribuye la densidad electrónica que había sido implicada en la conformación de estos enlaces, alterando la capacidad de los grupos cromóforos de absorber luz. Esto alterará el espectro aumentando la absorbancia en todas aquellas bandas en las que estos grupos estuviesen implicados.

Por último, debido a que la capacidad de emitir luz a través de un decaimiento energético está directamente relacionada con la libertad conformacional, la rigidez estructural y la posibilidad de intercambiar energía con el entorno, estudiar las alteraciones que se producen en la fluorescencia de estos compuestos en solución al aumentar la temperatura fue también de gran utilidad. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos pudieron correlacionarse con la formación de agregados, el grado de rigidez y las características del empaquetamiento de las moléculas estudiadas. Una disminución en la intensidad de emisión a medida que aumenta la temperatura puede generarse por, al menos, dos motivos. Por un lado, por un aumento en el número de colisiones con el solvente, lo cual favorece la disipación de energía desde la molécula excitada hacia el entorno y, por otro lado, también como consecuencia de la adquisición de un estado conformacional desplegado con mayor libertad rotacional, el cual actuaría como una vía de decaimiento no radiativa. Sin embargo, la información que se puede extraer respecto a la química supramolecular no es inequívoca, debido a que existen reportes en la literatura de efectos tanto inhibidores como estimulantes de la emisión producto de la agregación, los cuales son muy dependientes del sistema de estudio.^{27,28}

Caracterización espectroscópica en solución

Debido a que el abordaje necesario para caracterizar la química en solución de estas moléculas debe darse de manera integral considerando los resultados de las tres espectroscopías en concomitancia, se presentarán los datos obtenidos para las espectroscopías de resonancia magnética nuclear, electrónica y de emisión de luz al mismo tiempo para cada una de ellas. De la misma manera que se procedió para los estudios de los monoderivados, estos experimentos se realizaron disolviendo los di y triderivados en agua básica. Por ese motivo, las especies presentes corresponden a los respectivos aniones. Todas las figuras son construidas utilizando el mismo código de colores para reflejar el aumento de la temperatura (azul para temperatura ambiente y anaranjado para la temperatura máxima) y cada espectroscopía es informada en la ventana espectral de mayor relevancia.

Todos los compuestos presentan un espectro de resonancia magnética bien resuelto para el cual pudo asignarse cada una de las señales considerando su multiplicidad,

corrimiento e integración (ver apartado de caracterización de los compuestos en la sección experimental). En los tres casos, para los experimentos de espectroscopía electrónica se observaron bandas angostas de absorción alrededor de los 214 nm acompañadas de una banda pequeña a 257 nm para los compuestos **1.b** y **1.c** y a 277 nm para **1.g**. Este último presenta, además, un hombro apreciable a ~230 nm. Las bandas de menor energía (214 y 257 nm) se corresponden a lo observado para el aminoácido precursor mientras que las otras dos bandas, para el caso del compuesto **1.g**, podrían estar asociadas a la vainillina, aunque muestran grandes corrimientos respecto a lo observado para el monoderivado. Los espectros de emisión también presentan claras similitudes entre los compuestos con una única banda ancha alrededor de 455 nm para los tres. Los cambios de temperatura durante las espectroscopías de absorción y emisión no dan lugar a la formación de puntos isosbásticos ni alteran la morfología de las bandas, viéndose solo alterada la intensidad de estas.

Compuesto **1.b**

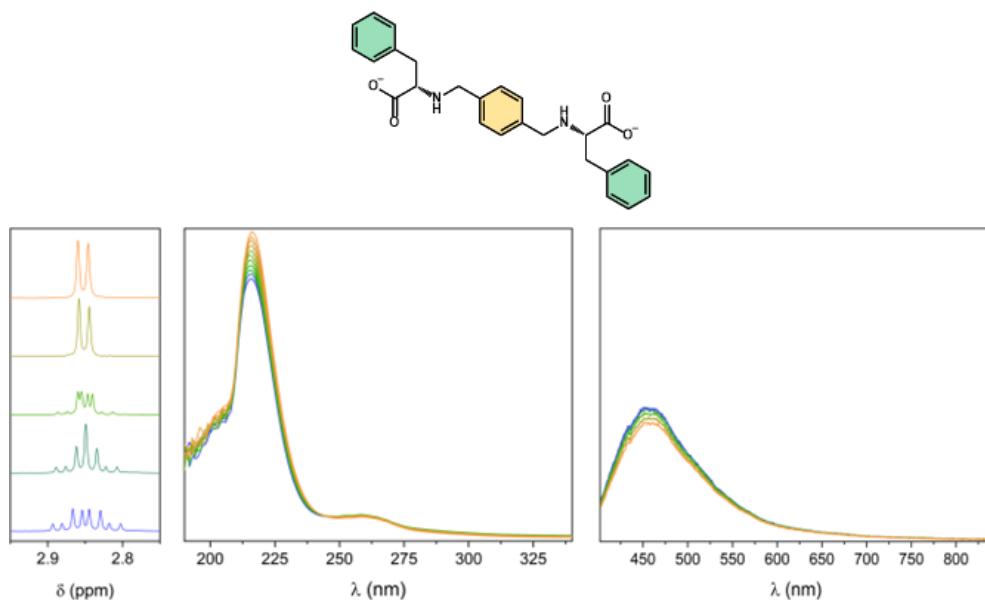


Figura 6. Experimentos de RMN ^1H (izquierda), UV-Vis (medio) y Emisión de luz (derecha) a temperatura variable realizados para soluciones acuosas básicas de **1.b**.

Al estudiar el espectro de RMN- H^1 del anión resultante de **1.b** se observa coalescencia de la señal asignada al metileno a medida que aumenta la temperatura (Figura 6, izquierda). Este fenómeno se ve acompañado de un marcado hipercromismo en la región ultravioleta en su espectro de absorción UV-Vis, y un leve decaimiento en la intensidad de su espectro de emisión de luz por fluorescencia (Figura 6, centro y derecha).

El hecho de que la señal metilénica en el espectro RMN- H^1 se altere y que se evidencie hipercromismo en el espectro de absorción UV-Vis parece estar indicando un cambio conformacional que expone los anillos aromáticos y elimina cualquier posible apilamiento que se pudiera haber producido intramolecularmente a menores temperaturas. De la misma forma que se discutió para los monoderivados, la coalescencia podría asociarse a una mayor flexibilidad del sistema, en la cual la libre rotación de los enlaces vinculados al metileno se encuentra menos impedida. Al mismo tiempo, que estos cambios se vean acompañados por una disminución en la intensidad en el espectro de

emisión puede ser evidencia de que se están produciendo una disminución de la rigidez estructural, en concordancia con lo observado por RMN. En vista de estos resultados pareciera que, en solución acuosa básica, durante el calentamiento sólo se desarrolla un cambio configuracional hacia un estado más desplegado de la molécula. No hay evidencias para proponer la existencia en solución de agregados supramoleculares.

Compuesto 1.c

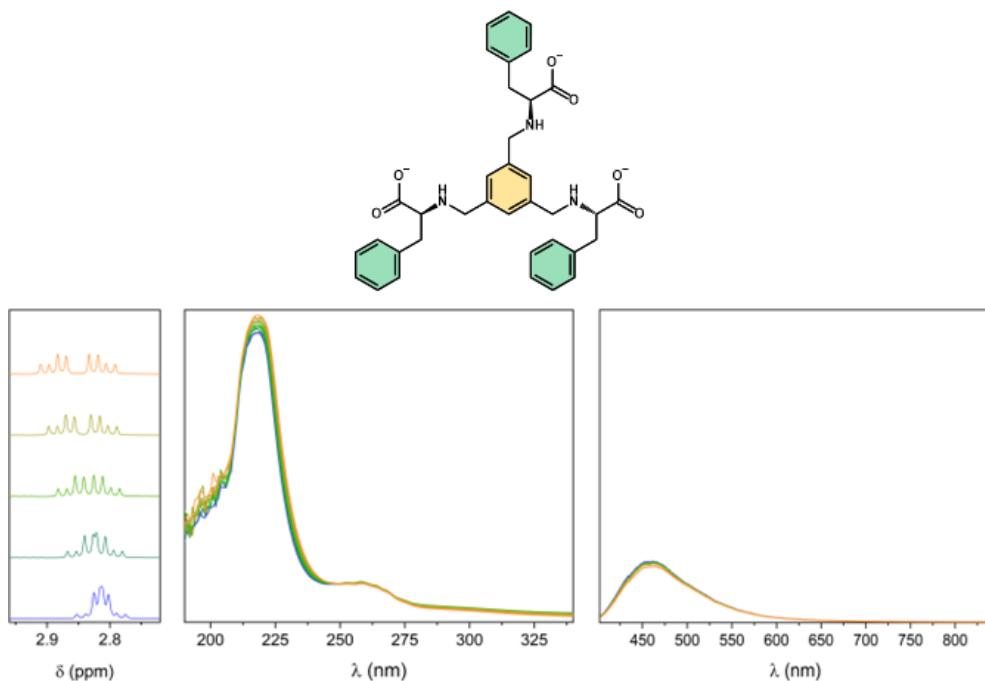


Figura 7. Experimentos de RMN ¹H (izquierda), UV-Vis (medio) y Emisión de luz (derecha) a temperatura variable realizados para soluciones acuosas básicas de **1.c**.

Para el caso de la molécula **1.c** se observa el desdoblamiento de la señal metilénica en el espectro RMN-H¹ a medida que aumenta la temperatura (Figura 7, izquierda). Este cambio se ve acompañado por un leve aumento de la absorbancia en el espectro de absorción UV-Vis, pero sin alteraciones en la intensidad de emisión de luz por fluorescencia (Figura 7, centro y derecha).

El leve aumento en la capacidad de absorber luz, que no se ve acompañado de alteraciones en el espectro de emisión, podría estar indicando que se producen cambios de conformación, pero sin modificar sustancialmente la rigidez de la especie. Esto es consistente, además, con la existencia de varios estados conformacionales distintos, accesibles a la misma energía, los cuales podrían presentar grados de libertad rotacional similares, pero con distinta orientación de sus grupos aromáticos. Esta adquisición de una libertad conformacional que permite la coexistencia de múltiples conformaciones posibles es consistente también con que existan entornos químicos distintos para los hidrógenos diastereotópicos, lo que podría explicar el multiplete poco definido que se observa a temperatura ambiente. A medida que la molécula se despliega conforme aumenta la temperatura, la observación de una única señal para los metilenos que presenta el patrón de desdoblamiento esperado por el acoplamiento con el protón del centro quiral, podría asociarse a una conformación que mantiene cierta rigidez y que fuerza a que se establezcan entornos equivalentes para la región alifática de cada uno de los fragmentos.

de los aminoácidos. Este escenario podría ser consistente con un monómero desplegado solvatado, o bien podría existir también la formación de agregados supramoleculares entre los derivados. Sin embargo, el hecho de que no se produzcan cambios apreciables en el espectro de emisión es un punto en contra de esta última hipótesis.

Compuesto 1.g

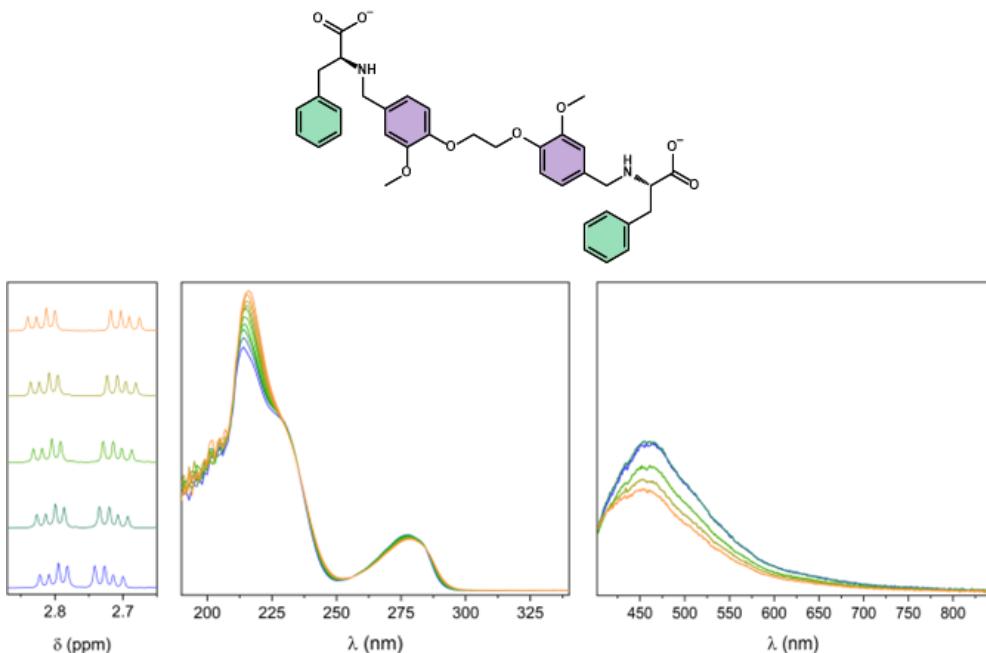


Figura 8. Experimentos de RMN ^1H (izquierda), UV-Vis (medio) y Emisión de luz (derecha) a temperatura variable realizados para soluciones acuosas básicas de **1.g**.

El comportamiento del compuesto **1.g** durante el calentamiento en solución acuosa básica muestra un distanciamiento entre las dos señales de los hidrógenos diastereotópicos en el espectro de resonancia magnética nuclear (Figura 8, izquierda), acompañada de un aumento en la absorción y una disminución en la intensidad de emisión de luz (Figura 8, centro y derecha).

La alteración observada en el espectro RMN- ^1H podría estar indicando que el entorno químico alrededor de cada uno de esos hidrógenos se va modificando, pero sin que esto implique una libre rotación de los grupos aledaños. Por otro lado, el hecho de que, a medida que la absorción de luz aumenta, la intensidad de emisión disminuya es, *a priori*, contrario a lo esperado, si entendemos que una absorción más eficaz permitirá aumentar la población de moléculas excitadas y, por lo tanto, debería aumentar también de manera proporcional, la cantidad de luz emitida. Sin embargo, este comportamiento inverso entre absorción y emisión puede entenderse en el marco de un fenómeno de despliegamiento molecular que permite exponer los anillos aromáticos y disminuir la rigidez estructural al mismo tiempo. Es importante notar que la disminución de la rigidez no implica exclusivamente un aumento en la libertad rotacional, lo cual conllevaría a la coalescencia de las señales de RMN que no se ve en este compuesto, sino que implica la adquisición de una multiplicidad de estados conformacionales degenerados en energía con una libre interconversión entre ellos.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para cada espectroscopía y para cada compuesto. Representar los resultados de las caracterizaciones espectroscópicas términos ternarios (aumenta, disminuye o no cambia, por ejemplo) facilita el análisis a la hora de poder discernir entre los fenómenos intramoleculares asociados al desdoblamiento y los eventos de agregación molecular.

Analizando la columna asignada a los resultados del cambio en la señal metilénica en el RMN-H¹ (columna **RMN** de la tabla) se observa que los derivados **1.c** y **1.g** presentan un comportamiento equivalente en donde, al calentar, se produce un cambio conformacional que da como resultado una molécula con una estructura desplegada y con entornos químicos equivalentes para los fragmentos de los aminoácidos. Por el patrón de desdoblamiento se concluye que el sistema mantiene cierta rigidez, a pesar de haber aumentado la temperatura. Este escenario podría ser compatible con un monómero estabilizado por interacciones con el solvente o bien, mediante la formación de agregados supramoleculares de orden superior. En el caso de **1.b**, al calentar se observa la coalescencia de la señal, indicando un aumento de la flexibilidad del sistema. Esto sería consistente con la adquisición de una conformación desplegada, pero que no da lugar a agregados supramoleculares.

Por otro lado, al estudiar cómo se altera la banda asociada a la absorción de luz ultravioleta en el espectro de absorción UV-Vis (columna **UV-Vis** de la tabla) podemos extraer información sobre la formación de interacciones de apilamiento aromático y puentes de hidrógeno. Ninguna de estas dos columnas, ni aisladas ni en conjunto, son capaces de brindar información suficiente para discernir entre un fenómeno de desdoblamiento y uno de desagregación. Pero, si incluimos en el análisis los cambios observados en el espectro de emisión de luz por fluorescencia (columna **Emi** de la tabla), podemos tener información adicional de cómo se altera la rigidez molecular durante el calentamiento. Este último dato es fundamental para dar evidencia del desarrollo de fenómenos colectivos en el sistema, como la emisión por agregación.²⁹

Tabla 4. Resumen de los resultados de las espectroscopías a temperatura variable en solución acuosa básica para cada compuesto.

	RMN señal CH ₂	UV-Vis señal λ~ 214 nm	Emi señal λ~ 460 nm
1.b	Coalece	Aumenta	Disminuye
1.c	Desdobra	Aumenta	No cambia
1.g	Separá la señal desdoblada	Aumenta	Disminuye

Cálculos de estructura electrónica de parámetros termoquímicos

Con el objetivo de complementar las caracterizaciones espectroscópicas realizadas en solución se realizó el cálculo de los parámetros termoquímicos de los diferentes compuestos basándose en el modelo de coexistencia de 4 posibles especies propuestas: monómero plegado y desplegado, y los dos tipos de dímeros que se obtienen de la interacción de a pares de estos dos tipos de monómeros, todos en estado aniónico, considerando que serán las especies presentes en soluciones acuosas básicas (Figura 5).

De la misma manera que se procedió en el capítulo anterior, el solvente será considerado empleando el modelo de dieléctrico continuo. Para el análisis se emplearon los valores de entalpía y entropía que se obtienen como resultado de los cálculos de termoquímica para cada molécula/ion y sus respectivos dímeros, plegados y desplegados (Figura 9), calculando el valor de la energía libre asociada a cada especie a una dada temperatura. Las temperaturas utilizadas fueron elegidas para poder extender el análisis del proceso de formación de entidades supramoleculares a todo el rango que permite el solvente. Los dímeros fueron construidos buscando optimizar la conformación de una estructura estabilizada electroestáticamente donde todos los centros aminoacídicos maximicen tanto su cercanía como la complementariedad.

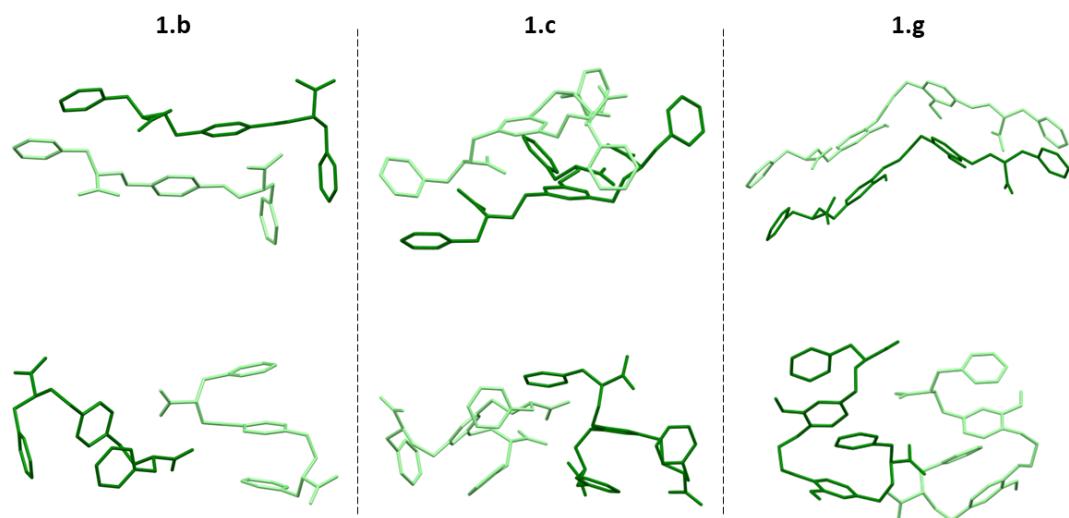


Figura 9. Estructuras optimizadas de los dímeros construidos a partir de monómeros desplegados (arriba) y plegados (abajo) para los compuestos **1.b** (izquierda), **1.c** (centro) y **1.g** (derecha). Los cálculos fueron realizados empleando los correspondientes aniones; los H no se incluyen por claridad.

Para calcular el valor de ΔG asociado a un proceso de ensamblado (ΔG_{Sup}^P y ΔG_{Sup}^D en la Figura 5) se restó el valor de la energía libre del dímero correspondiente, menos la energía libre de Gibbs de dos moléculas/iones independientes en el estado configuracional que se desea estudiar. Para calcular el valor de ΔG asociado a un proceso de despliegamiento de un confórmero (ΔG_{Desp}^m y ΔG_{Desp}^s en la Figura 5), tanto sea de un dímero como de un monómero, se restó el valor del confórmero desplegado menos el valor del confórmero plegado. En todos los casos se realizaron las correcciones necesarias para considerar la diferencia entre los puentes de hidrógenos generados en cada sistema.

Al realizar cálculos de termoquímica empleando la teoría del funcional de la densidad sobre los estados conformacionales plegados y desplegados de estos tres compuestos podemos obtener información de cómo es el cambio en la energía libre de Gibbs asociado al proceso de despliegado de los confórmeros, y el aporte que hace la entropía a este fenómeno. Para realizar este cálculo se emplea la misma metodología que se introdujo en el Capítulo III, para la cual se consideró el estado desplegado como el estado final, el estado plegado como el estado final y se calcula la diferencia aritmética entre ambos (Figura 10 y Tabla S1).

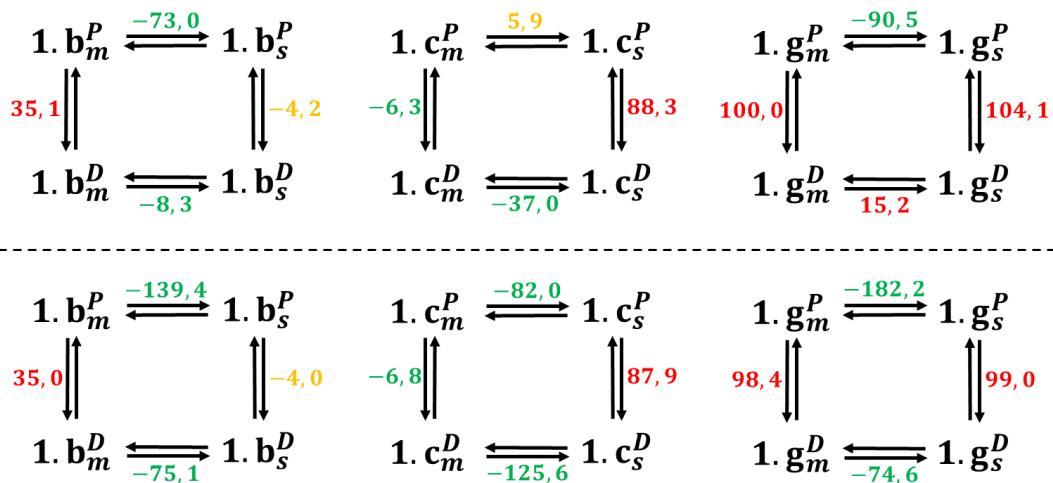


Figura 10. Parámetros termoquímicos calculados para los fenómenos de desplegamiento y dimerización de todos los compuestos en agua básica a temperatura ambiente (arriba) y a la temperatura de ebullición del solvente (abajo). Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo del valor de la energía térmica a esa temperatura (verde). En naranja se indican aquellos valores que se encuentran comprendidos dentro del rango de energía térmica a esa temperatura. Todos los datos están informados en kJ/mol.

En líneas generales podemos observar que, a temperatura ambiente, se verifica la hipótesis propuesta en relación con la preferencia de estos compuestos por adquirir la conformación plegada al estar como monómeros en solución acuosa básica. Según los cálculos, luego de haber aumentado la temperatura tampoco se verían favorecidos los estados conformacionales desplegados. No obstante, para el compuesto **1.c** se puede apreciar una leve tendencia al desdoblamiento, pero este valor está contenido dentro del rango esperado para la energía térmica a esta temperatura (6,3 vs 4,0 kJ/mol en valor absoluto). Este resultado pone de manifiesto que, si bien este modelo tan simplificado no replica los que se propone según los resultados experimentales en solución, sí permite inferir la estabilidad relativa de las posibles estructuras que podrían estar presentes en una solución para estos compuestos y ciertas tendencias.

Al estudiar qué sucede con las energías de dimerización, tanto a temperatura ambiente como a alta temperatura, es posible estimar el rol que cumple la entropía en los fenómenos de ensamblado. Mas allá de que, a temperatura ambiente, ya se observa la estabilización de al menos un estado dimérico en solución para los tres compuestos, al elevar la temperatura se produce mayor estabilización de todos los estados diméricos. Esto se evidencia por la gran diferencia observada al restar los valores de energía libre de Gibbs a cada temperatura (Tabla S1). Estas diferencias se encuentran todas por encima de los 66 k J/mol, valor casi 10 veces mayor que el correspondiente a la energía térmica a la temperatura más alta (4,0 kJ/mol).

Esta estabilización de los agregados supramoleculares con respecto a los monómeros permite inferir que, si la concentración es suficiente y la temperatura es propicia, todos estos compuestos presentarán una clara afinidad a ensamblarse espontáneamente. Sin embargo, la solubilidad de todos estos compuestos en agua, a pesar del medio básico y el estado de carga neta, hace que sea desafiante poder alcanzar una concentración tal que se pueda verificar esta hipótesis. Adicionalmente, aumentar la temperatura no parece ser una metodología viable para favorecer la solubilidad, en tanto

esta favorece la formación de entidades supramoleculares y no su dispersión. En el apartado de materiales supramoleculares, se presentarán ejemplos en los que se empleó un cambio de solvente para poder resolver este impedimento y se empleó el efecto de la temperatura para obtener distintos materiales.

Empleando los parámetros termoquímicos obtenidos podemos estudiar cómo se altera el factor entrópico durante los procesos en cuestión. Es fundamental entender que esta variable está directamente asociada a la libertad configuracional de la especie estudiada y es, en última instancia, un parámetro que nos permite cuantificar el carácter polimérico de cada una de estas estructuras, como ya se presentó en la introducción.

En la Tabla 5 se encuentran detallados los factores entrópicos asociados al proceso de desdoblamiento de los monómeros y los dímeros de cada compuesto. Estos se calculan a través de la resta entre la contribución entrópica de la estructura desplegada y la estructura plegada, ambas a la misma temperatura (notadas como ΔS_{Desp}^m y ΔS_{Desp}^s para los monómeros y los dímeros, respectivamente). Se puede observar cómo este factor aumenta abruptamente al pasar de **1.b** a **1.c** o **1.g** en los monómeros, pero no tanto así para sus dímeros. Este aumento podría considerarse como evidencia clara de cómo, al aumentar el número de derivatizaciones o bien, disminuir la rigidez del fragmento central, el aporte entrópico adquiere un papel preponderante a la hora de seleccionar el estado conformacional más poblado. Este análisis apoya la hipótesis de la presencia en solución de entidades mayormente plegadas para los compuestos **1.b** y **1.c** y de carácter conformacional mixto para el compuesto **1.c**.

Tabla 5. Factores entrópicos asociados al proceso de desdoblamiento de monómeros y dímeros supramoleculares

	ΔS_{Desp}^m (kJ/mol)	ΔS_{Desp}^s (kJ/mol)
1.b	-0.003	0.003
1.c	-0.027	-0.005
1.g	-0.078	-0.069

En base a los resultados expuestos, podemos proponer un panorama general de lo que podría estar ocurriendo en solución. Si bien se cuenta con los datos experimentales de las soluciones en medio básico, el análisis podría extenderse a las especies en estado switerónico, considerando que estas verán aumentada su afinidad a la agregación debido a la disminución en la repulsión electroestática.

Para los compuestos **1.b** y **1.g**, habrá una presencia mayoritaria de monómeros plegados, que se despliegan al aumentar la temperatura. En una situación donde la concentración es lo suficiente alta, este fenómeno competiría de manera directa con la formación de agregados supramoleculares, dando lugar a la coexistencia de monómeros desplegados y entidades supramoleculares ensambladas a partir de monómeros plegados y desplegados. Si la concentración es menor, al aumentar la temperatura se enriquece el número de monómeros desplegados en solución. Lamentablemente, debido al impedimento de la técnica y la baja solubilidad de los compuestos estudiados,

consideramos que en los experimentos llevados a cabo en solución no se cumplía la condición de mínima para la formación de agregados supramoleculares.

Para el compuesto **1.c**, el panorama a temperatura ambiente es levemente distinto, ya que la solución estará compuesta de una distribución heterogénea de distintos confórmeros, pero con un aporte mayoritario del plegado por sobre todos los demás. A diferencia de lo que sucede con los otros dos compuestos, aumentar la temperatura en este caso no favorecería tanto la formación de agregados, ya que es mucho menor la barrera hacia la formación de monómeros desplegados para este compuesto. Por lo tanto, aumentar la temperatura del sistema conllevará a enriquecer el número de monómeros desplegados en solución sin una competencia tan marcada por la agregación. Sin embargo, si la concentración fuera suficiente, eventualmente el sistema evolucionaría hacia la formación de entidades supramoleculares que, debido al enriquecimiento previo que sufrió el sistema, estarían compuestas principalmente de monómeros desplegados interactuando entre sí. De la misma forma que ocurrió para **1.b** y **1.g**, consideramos que en los experimentos realizados para **1.c** tampoco se alcanzó la concentración necesaria para garantizar la formación clara de agregados supramoleculares.

La distribución de entidades conformacionales y supramoleculares que podrían estar coexistiendo para cada compuesto en base a los resultados experimentales y los parámetros termoquímicos calculados se ilustra en la Figura 11.

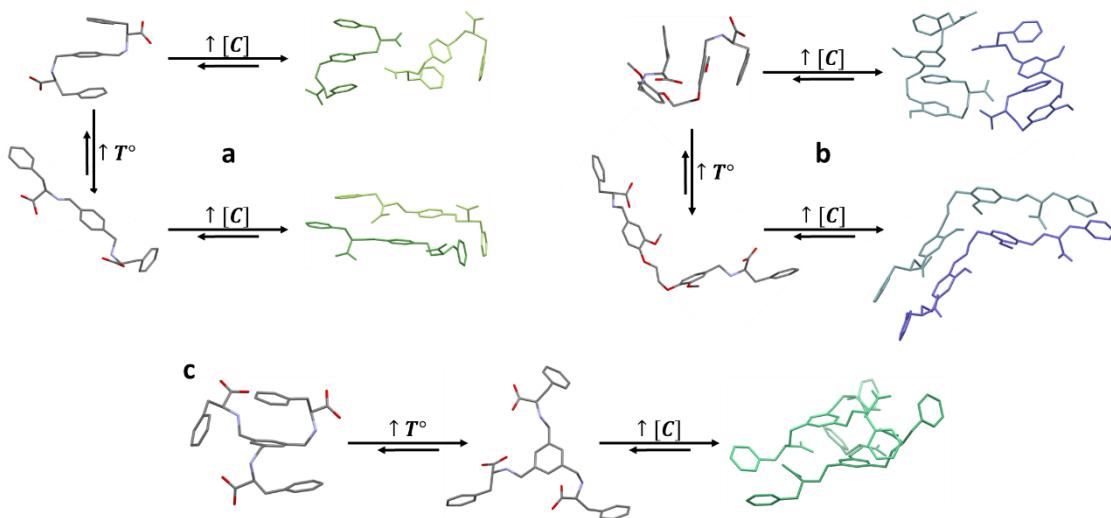


Figura 11. Esquema de las posibles entidades supramoleculares y conformacionales propuestas para cada compuesto y su dependencia con la temperatura y la concentración. (a): Compuesto **1.b**, (b): Compuesto **1.g**, (c): Compuesto **1.c**. Los cálculos fueron realizados empleando los correspondientes aniones; los H no se incluyen por claridad.

Mecanismo de precipitación y propiedades del material resultante

Considerando el rol esencial que cumple la difusión molecular en seleccionar el carácter espinodal o cristalino, de la vía de separación de fases que precede la formación de un sólido, es esencial tener una idea clara del estado conformacional y supramolecular

de estos en solución para poder aproximar el tamaño aparente de las entidades que difunden. Generar arquitecturas extendidas, o adquirir estados conformacionales desplegados, genera un radio aparente mayor al real del objeto, de manera análoga a lo que sucede para el radio hidrodinámico en las partículas en solución acuosa.³⁰

Para estudiar en detalle el proceso de autoensamblado durante la precipitación de estos compuestos se tomaron imágenes de microscopía confocal de tiempo de vida de fluorescencia durante la acidificación controlada utilizando (D)-Glucono-1,5-lactona partiendo de las soluciones acuosas básicas (Figura 12). Como se discutió previamente, se espera que el estado de carga de la especie en el sólido generado corresponda al ion dipolar o switerión.

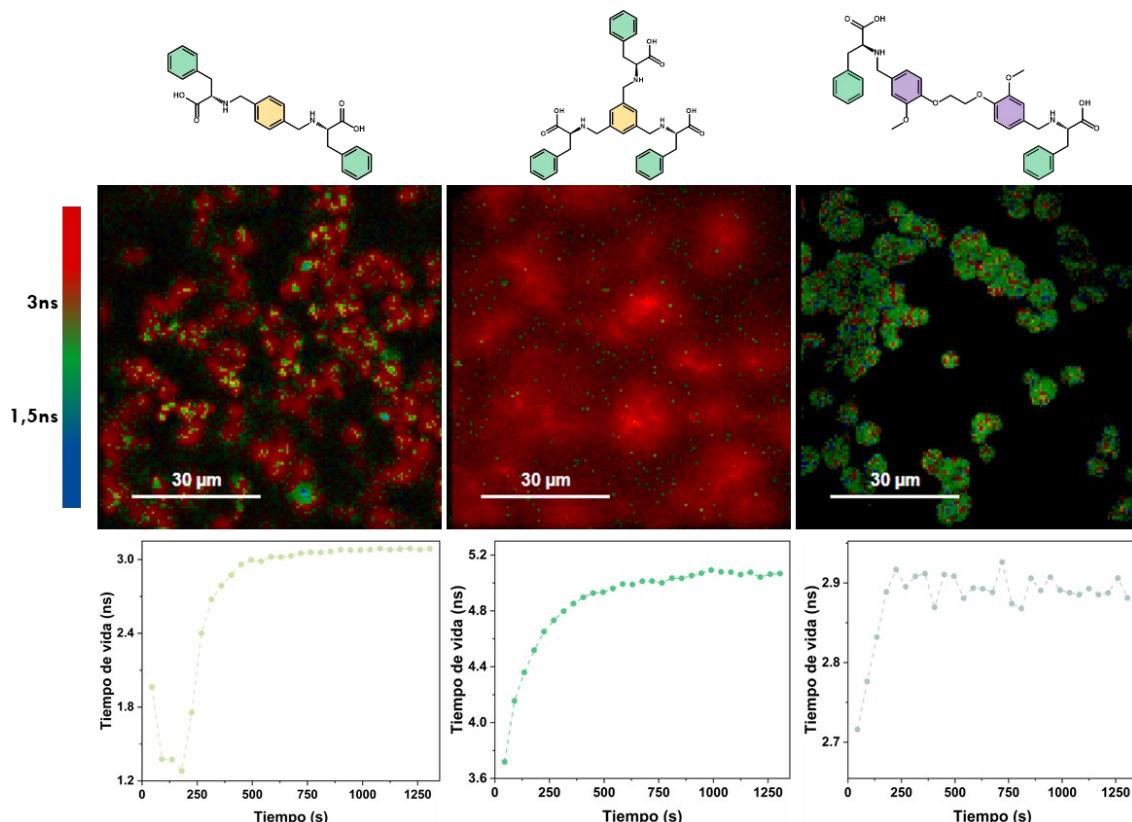


Figura 12. Imágenes de microscopía coloreadas empleando el tiempo de fluorescencia de los compuestos **1.b** (izquierda), **1.c** (centro) y **1.g** (derecha). Abajo se informa el cambio en el tiempo de vida de fluorescencia a medida que se produce la precipitación.

En las 3 imágenes de microscopía que se muestran en el panel superior de la Figura 11 se puede observar, en líneas generales, una morfología dispersa e inespecífica de los nodos de precipitación donde no se distinguen formas apreciables salvo por algún cúmulo de partículas esferiformes para el compuesto **1.g**. En todos los casos, los sólidos obtenidos presentan una topología extendida y mixta, sin que se pueda definir de forma clara la formación de una región assignable a material cristalino. En particular, el compuesto **1.c** desarrolla una microestructura que casi no presenta regiones discretas distinguibles (Figura 12, centro). Existe un gran entrecruzamiento entre las regiones asignadas al solvente (sin color en la microscopía) y las regiones donde hay presencia del compuesto (regiones rojizas en la imagen). Este tipo de microestructuras extendidas, sin regiones discretas claramente apreciables y con un gran entrecruzamiento entre sólido y líquido son

características de los materiales obtenidos a través de una descomposición espinodal.^{31,32} Por otro lado, los compuesto **1.b** y **1.g** presentan un aspecto un poco más discreto, menos extendido y con regiones de acumulación puntuales de morfología aproximadamente esférica, que contrastan con las regiones donde solo hay solvente (regiones negras en las imágenes). Este aspecto híbrido que no puede asignarse de manera clara a materiales cristalinos, pero que, sí presenta regiones puntuales de precipitación con un grado de entrecruzamiento menor al esperado para un material estrictamente espinodal, es un claro indicio de una vía de descomposición de carácter intermedio o dual, que no puede posicionarse de manera inequívoca en ninguno de los dos extremos del espectro Espinodal-Cristalino.

La existencia de este tipo de materiales híbridos es un punto a favor de la hipótesis de que pensar las vías de descomposición de fases como dos únicas ramas, antagónicas y mutuamente excluyentes, descarta todas las opciones que existen entre ambas, y no permite describir correctamente la totalidad de los procesos que pueden suceder. Por el contrario, si pensamos que existe un continuo de tamaños y grados de ordenamiento de las partículas que puede ir desde lo extremadamente ordenado a la carencia total de orden, aún a distancias intermoleculares, podemos desdibujar esta frontera entre ambas vías para tolerar la existencia de un espectro continuo de posibilidades entre ellas.

Estos ejemplos se suman a los ya presentados en el Capítulo III, donde se manifiesta de manera aún más clara la necesidad de describir al menos un estado intermedio entre el mecanismo clásico de nucleación y crecimiento y la descomposición espinodal (Figura 13). Al comparar las imágenes de microscopía de estos tres compuestos con las obtenidas bajo las mismas condiciones para **1.a** (derivado de benzaldehído) se puede apreciar cierto grado de similitud entre este último y **1.g**, en términos del tiempo de vida de fluorescencia del material generado. Sin embargo, la morfología de ambos es apreciablemente distinta, con filamentos longitudinales para el compuesto **1.a** y regiones puntuales y esferiformes para **1.g**. Más adelante se discutirá una posible justificación a estas similitudes y diferencias.

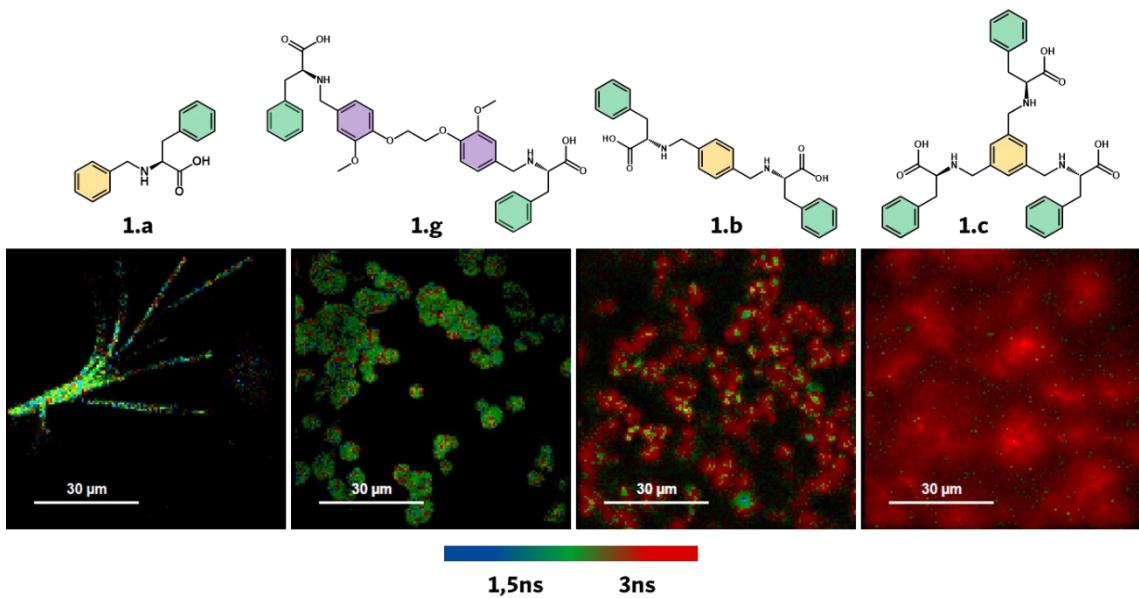


Figura 13. Imágenes de microscopía coloreadas empleando el tiempo de fluorescencia de los compuestos **1.a** (monoderivado), **1.g** y **1.b** (diderivados) y **1.c** (triderivado).

Al estudiar cómo varía el tiempo de vida de fluorescencia durante la precipitación de los compuestos **1.b**, **1.c** y **1.g**, podemos observar que, en todos los casos, este aumenta a medida que el sólido se genera. Sin embargo, se observa una estabilización del parámetro al cabo de un tiempo, que es propio y característico de cada sustancia. Para el compuesto **1.g** esto sucede alrededor de los 250 s mientras que para el compuesto **1.b** y **1.c** se aprecia recién al cabo de los 600 y 750 s, respectivamente.

Este tipo de emisión estimulada por la agregación ya se ha reportado en bibliografía antes, y se ha propuesto que se debe, principalmente, a las restricciones vibracionales y conformacionales que impone el confinamiento durante la agregación.^{27,29} El hecho de que el tiempo de vida de fluorescencia de los tres compuestos se altere apreciablemente en las primeras etapas del ensamblado es también un indicio claro de la naturaleza mayoritariamente espinodal de este fenómeno. Como se discutió en el capítulo anterior, para los fenómenos que se den a través de un mecanismo espinodal esperamos fuertes fluctuaciones en todos aquellos parámetros asociados a la interacción entre la molécula y su entorno. Esto es debido a que el entorno se vuelve particularmente susceptible a cambios y alteraciones durante este tipo de descomposiciones, a diferencia de lo que sucede a medida que se aumenta el tamaño de un cristal en un fenómeno de nucleación y crecimiento. No obstante, se destaca la diferencia en los tiempos de estabilización de este fenómeno. El hecho de que el compuesto **1.g** se estabilice tan anticipadamente respecto a los otros dos podría ser otro indicio de una naturaleza parcialmente más cristalina de su vía de descomposición. Este resultado es consistente también con la morfología observada para sus nodos de precipitación, donde los agregados podrían estar formados de nanocrstales o regiones extendidas con orden molecular de corto alcance, como las esferulitas, que no pueden ser claramente identificados por las limitaciones instrumentales.

Dados los resultados presentados previamente para los monoderivados resulta interesante detenernos a pensar si la naturaleza mayoritariamente espinodal observada

para estos compuestos no podría haber sido predicha en término de sus radios, factores de forma y naturaleza convergente de la química supramolecular. Para poder extender el análisis con el fin de encontrar una tendencia global se incluirá en la discusión los resultados obtenidos para el compuesto **1.a**, presentado en el capítulo anterior.

Al calcular los valores de diámetro de colisión de las estructuras optimizadas computacionalmente para el confórmero monomérico plegado en solución acuosa básica, podemos observar que el compuesto **1.g** presenta el mayor diámetro (Tabla 6, columna Diámetro). Este resultado podría sugerir una menor capacidad de difundir para este derivado y, por lo tanto, se vería favorecida la descomposición a través de un mecanismo principalmente espinodal. Sin embargo, las imágenes de microscopía confocal muestran que, de los cuatro compuestos estudiados, este es el único que desarrolló agregados fácilmente distinguibles con un aspecto apreciablemente esférico y con un tiempo de decaimiento de fluorescencia promedio similar al observado para el compuesto **1.a**. Como se discutió en el apéndice termodinámico del capítulo anterior, la formación de partículas discretas y de forma regular es un comportamiento usualmente asociado las primeras etapas del mecanismo de nucleación y crecimiento, y no a las descomposiciones por vía espinodal. Al mismo tiempo, alcanzar una rápida estabilización de su tiempo de decaimiento de fluorescencia es consistente con la formación de un entorno supramolecular conservado para todas las moléculas, lo cual se correlaciona también con la generación de entornos ordenados y periódicos. Por lo tanto, de este análisis se deriva que no es concluyente emplear este parámetro para predecir el mecanismo de descomposición.

Por otro lado, si calculamos los factores de forma de las mismas estructuras optimizadas obtenemos valores muy similares para el compuesto **1.b** y **1.c** (Tabla 6, columna *F_f*), pero levemente menores para **1.a** y más aún para **1.g**. Nuevamente, esta otra variable no resulta del todo satisfactoria para explicar los resultados experimentales, si tenemos en cuenta lo similares que parecen ser los sólidos obtenidos para **1.b** y **1.g** y lo particularmente distinto que parece ser el de **1.c** respecto a todos los demás. Da la sensación de que ninguno de los dos parámetros, por separado, alcanza para explicar la tendencia observada.

No obstante, si en vez de utilizar ambos parámetros de manera independiente los multiplicamos entre sí, obtenemos un nuevo valor, que podría definirse como el “diámetro corregido” por el factor de forma (D_{ff}), se puede extraer una tendencia clara. Este nuevo parámetro, que puede ser pensado como un diámetro aparente o un diámetro de giro, contiene la información de ambos componentes y permite distinguir al compuesto **1.c** de del resto. Podemos ver que ahora que **1.c** se encuentra claramente por encima de los otros tres compuestos, dando un panorama claro de su carácter espinodal. A medida que este valor aumenta, implica que o bien el factor de forma, o el diámetro, habrán aumentado, lo cual implicaría en ambos casos un detrimiento de la capacidad de difusión de la especie en solución.

Este resultado también es consistente con el carácter apreciablemente más cristalino que presentan los compuestos **1.a** y **1.g** durante su descomposición. Sin embargo, se puede apreciar un resultado inesperado al comparar los valores de diámetro corregido obtenido para ambos. El compuesto **1.a**, que dio lugar a la formación de

filamentos extendidos al precipitar, presenta un valor de diámetro corregido mayor que el de **1.g**, cuya morfología esferiforme parece más cercana a lo esperado para una descomposición espinodal. Este resultado podría estar indicando que el mecanismo de descomposición es solo uno de los factores que determina el aspecto del sólido generado, pero no es el único. A modo de ejemplo, más adelante se discutirá el rol fundamental que parece tener el factor de forma en seleccionar el modo de apilamiento de **1.c** en sólidos obtenidos a partir de una solución de DMSO y la relación que existe entre este apilamiento y el aspecto del sólido formado.

Para el caso particular de la comparación entre **1.a** y **1.g** se evidencia una tendencia similar. El primer compuesto presenta un factor de forma mucho mayor, lo cual podría generar una restricción en la libertad con la que estos pueden apilarse, imponiendo la necesidad de generar arreglos apilados de bloques, resultado que aumentaría la extensión en detrimento del espesor. Sin embargo, el segundo compuesto presenta un factor de forma casi isotrópico, lo cual podría resultar en que el apilamiento también sea más isotrópico, permitiendo que se desarrollen regiones más esferiformes y menos elongadas.

Tabla 6. Factor de forma, diámetro de colisión y diámetro corregido por el factor de forma calculados sobre estructuras optimizadas de los compuestos **1.a**, **1.b**, **1.c** y **1.g**

	F _f (u.a)	Diámetro (Å)	D _{ff} (Å)
1.a	1,61	8,62	13,9
1.b	1,67	10,72	17,9
1.c	1,68	11,77	19,8
1.g	1,13	12,02	13,6

Para todo este análisis es fundamental notar que el carácter convergente de todos estos compuestos fue asumido implícitamente a la hora de calcular el diámetro aparente, ya que este fue calculado sobre monómeros optimizados geométricamente. Si una molécula presenta un marcado carácter divergente será necesario corregir estos cálculos contemplando todas las arquitecturas que se espera que estén presentes en solución. Solo tiene sentido calcular el diámetro aparente sobre las especies que se sospecha que están presentes en la solución ya que serán estas las que estén difundiendo durante la descomposición del sistema.

Al estudiar los difractogramas de rayos X de polvos de los materiales sólidos obtenidos a partir de la precipitación por cambio de pH de soluciones básicas empleando ácido clorhídrico como agente acidificante (Figura 14), se observa una tendencia equivalente a la descripta anteriormente para la microscopía confocal. Tanto el compuesto **1.b** como el **1.c** dan lugar a la obtención de patrones con muy pocos picos detectables, anchos y de baja intensidad. Esto es característico de materiales amorfos o con dominios cristalinos de tamaño nanoscópico. Por el contrario, los compuestos **1.a** y **1.g** generan patrones de difracción con picos finos e intensos, los cuales son indicio de la presencia de material cristalino.

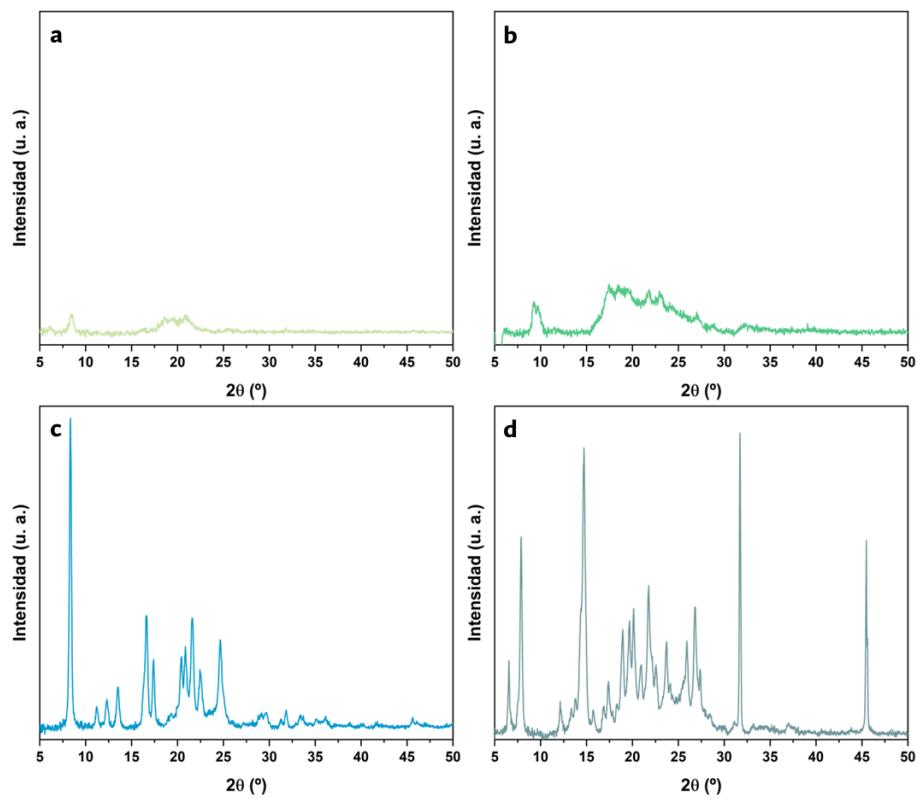


Figura 14. Difractogramas de rayos X de polvos de los sólidos obtenidos a partir de la precipitación por salto de pH del compuesto **1.b** (a), **1.c** (b), **1.a** (c), y **1.g** (d). La escala de intensidades empleada para graficar los patrones es la misma en los cuatro casos.

Este resultado ilustra nuevamente como dos compuestos estructuralmente tan poco emparentados dan lugar a un comportamiento similar, el cual puede ser predicho en base a su diámetro corregido.

Materiales supramoleculares

Materiales mesoestructurados

La diversidad de posibles estados conformacionales junto con la presencia de una gran cantidad de grupos funcionales capaces de adquirir diversas orientaciones son la combinación perfecta para una química supramolecular versátil y adaptativa. Esto motiva el estudio de la formación de nuevos materiales sólidos por el autoensamblado de estas moléculas bajo distintas condiciones experimentales, con el fin de explorar cómo estas pueden llegar a impactar en las propiedades del material resultante.

Debido a que la mayor eficacia de interacción entre moléculas de todos estos compuestos se da cuando estas disminuyen la repulsión electroestática y adquieren el estado switerónico, el análisis de la formación de fases sólidas se enfocó en la precipitación de estas especies en particular. Considerando que las moléculas presentan una muy baja solubilidad en agua, estos experimentos sólo pudieron llevarse a cabo empleando dimetilsulfóxido como solvente.

Para los tres compuestos se obtuvieron materiales sólidos a partir de la evaporación del solvente a temperatura ambiente de una solución 50 mM en DMSO. Estos sólidos fueron aislados y se caracterizaron por microscopía de barrido electrónico (Figura

15). Una caracterización exhaustiva de todos estos materiales no fue posible debido a las restricciones impuestas por el aislamiento social preventivo y obligatorio que se extendió durante la última etapa de este trabajo de tesis. No obstante, continuar con la caracterización de todos estos materiales es parte de las perspectivas proyectadas.

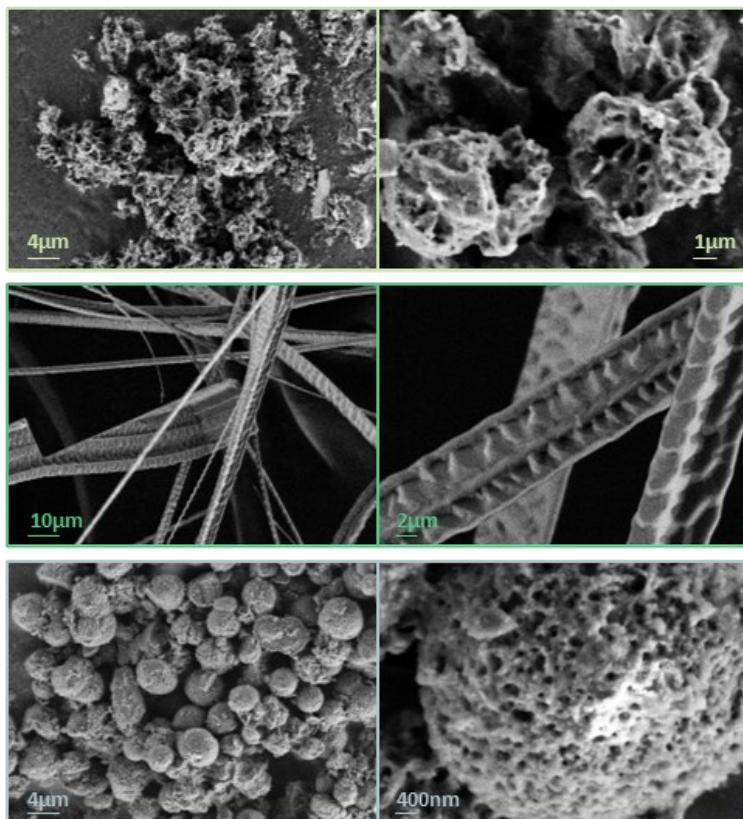


Figura 15. Imágenes de microscopía de barrido electrónico de los sólidos obtenidos a partir de soluciones 50mM en DMSO de **1.b** (arriba), **1.c** (medio), y **1.g** (abajo).

Tanto para el compuesto **1.b** como para el **1.g** se obtuvieron materiales sólidos porosos y parcialmente esferiformes. Sin embargo, el compuesto **1.c** dio lugar a la formación de fibras estriadas compactas y carentes de porosidad. Si bien es difícil realizar una correlación directa entre estas imágenes y las obtenidas para los experimentos de microscopía confocal (panel superior Figura 12), es posible identificar cierta similitud para los sólidos **1.b** y **1.g**. En ambos, esta morfología de agregados esferiformes pareciera estar presente en los dos experimentos. Sin embargo, para **1.c** la morfología del material está perfectamente definida por microscopía electrónica, pero no así en las imágenes de la técnica confocal. Podríamos asumir que estos microfilamentos desordenados identificados por SEM para **1.c** no pudieron ser diferenciados por limitaciones experimentales de la microscopía confocal. Adicionalmente, otro dato que puede obtenerse a partir de la comparación de estos resultados es que ambos sólidos, tanto los obtenidos a partir de soluciones de DMSO como los generados a partir de la acidificación de soluciones básicas, están formados por las moléculas en estado switeriónico.

Las partículas del compuesto **1.b** presentaron una morfología que se asemeja a un ovillo ligeramente compactado, con un diámetro de 4,07 μm . Debido a la heterogeneidad en formas y tamaños, no se pudo caracterizar con rigurosidad estadística sus poros. Por

otro lado, para las partículas del compuesto **1.g** se determinó un diámetro medio de $\sim 4,36\mu\text{m}$ con poros con un diámetro medio de 149 nm. Estas partículas presentaron una distribución mucho más homogénea tanto de forma como de aspecto de poro, aunque se puede seguir apreciando el aspecto de partícula ovillada con un gran entrecruzamiento.

Los filamentos del compuesto **1.c** tienen un ancho con un valor medio de alrededor de $6,8\mu\text{m}$, una distancia entre estrías de 2-3 μm y un ángulo diagonal de aproximadamente 23° . Si consideramos un tamaño medio de estría de $\sim 2,5\ \mu\text{m}$ se puede estimar que la relación entre el ancho y la periodicidad espacial es de $\sim 2,72$. Por último, podemos observar que el estriado no se encuentra orientado perpendicular respecto al borde del filamento si no que esta se encuentra formando un ángulo de $\sim 25^\circ$ con el eje transversal (detalle en la Figura 17).

El valor de 2,72 obtenido de la relación entre el espesor de la fibra y la longitud de la estría resulta extremadamente cercano al factor de forma calculado para un monómero de **1.c** que adquiere una configuración totalmente desplegada al confinarse entre otras dos moléculas en un trímero supramolecular optimizado geométricamente, que es de 2,64 (Figura 16). Se aclara que, para los cálculos de este modelo trimérico, se emplearon las moléculas en estado switeriónico.

Esta coincidencia entre ambos valores podría estar sugiriendo que el empaquetamiento de estas moléculas en el filamento tenga una naturaleza similar al apilamiento que se observa para cristales líquidos discóticos. El núcleo plano y rígido de esta molécula brinda la geometría adecuada para favorecer el apilamiento y, además, contribuye a su estabilización por el desarrollo de interacciones interaromáticas. Adicionalmente, gracias a que los residuos aminoacídicos se encuentran orientadas hacia el exterior de este núcleo central, la red de puentes de hidrógenos e interacciones electroestáticas que se desarrolla rodea este apilamiento columnar y se extiende a lo largo de todo el filamento. La estabilización de este tipo de apilamientos en condiciones de alta concentración es consistente con los resultados obtenidos en el cálculo de los parámetros termoquímicos. Aunque los cálculos fueron realizados sobre los aniones para modelar el ensamblaje en medio básico, podemos asumir que las especies switeriónicas, exentas de la repulsión electroestática, verán exacerbada la tendencia a la agregación.

La distribución heterogénea de estrías a lo largo de la fibra también es consistente con una organización desigual de factores de forma que proviene de la dificultad que implica acomodar eficazmente los anillos aromáticos alrededor del centro para minimizar la distancia de apilamiento sin aumentar la congestión estérica. A modo de ejemplo, en el trímero estabilizado por DFT se pueden obtener tres factores de forma apreciablemente distintos, 2,45 para el menor, 2,64 para el intermedio y 2,92 para el superior (Figura 16). Aunque sin lugar a dudas este modelo no alcanza para describir la complejidad de matices estructurales del ensamble, permite dar una primera descripción a la heterogeneidad estructural de estos arreglos, y cómo esta podría verse reflejada en el material resultante.

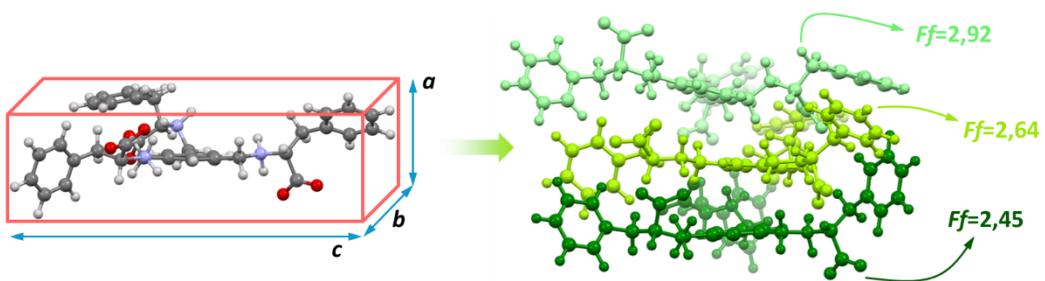


Figura 16. Factores de forma calculados para cada una de las moléculas que conforman el trímero supramolecular del compuesto **1.c** al apilarse columnarmente adquiriendo conformaciones desplegadas.

Para intentar obtener un modelo potencialmente más representativo del ensamblado de **1.c** en estos sistemas es necesario extender la construcción empleando un conjunto de distintos arreglos supramoleculares compatibles con la formación del filamento. Para esto es necesario utilizar tres conjuntos de trímeros moleculares apilados en conformación desplegada optimizados libremente empleando mecánica molecular con un campo de fuerzas universal (Figura 17).³³

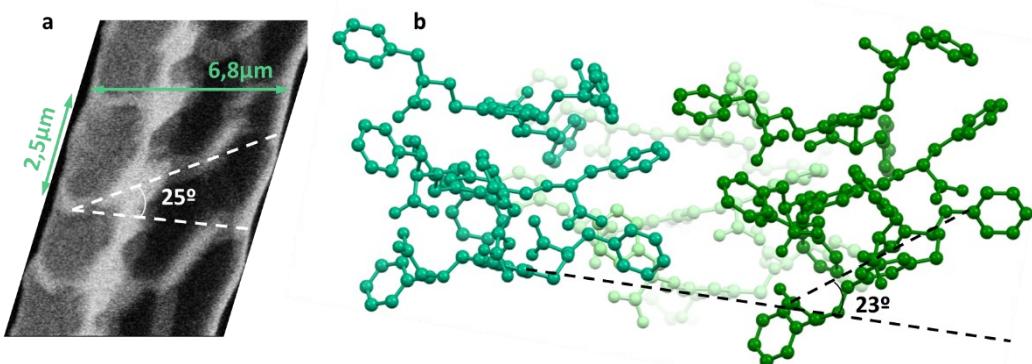


Figura 17. (a) Detalle de la estructura del filamento desarrollado por el compuesto **1.c** y su respectivo estriado. (b) Modelo de tres agregados triméricos construido a partir de switteriones de **1.c** empleado para describir la formación del filamento.

Al calcular la orientación relativa entre las moléculas de **1.c** entre cada conjunto se puede observar que, en todos los casos, la libre rotación da lugar a una orientación de los trímeros en un ángulo de 23°. Esta distorsión fuera del eje longitudinal se genera debido a la necesidad de optimizar la interacción entre trímeros, la cual se ve fuertemente restringida debido al impedimento estérico que implica la presencia de los anillos aromáticos en los alrededores de los grupos aminoacídicos.

Aunque hacen falta imágenes con mayor resolución espacial y experimentos de dinámica molecular de mayor sofisticación para poder dar un marco más riguroso a esta propuesta, el hecho de que el estriado tenga una frecuencia espacial y se orienten en un ángulo tan específico podría ser un indicio a favor de la existencia de arreglos supramoleculares discóticos columnares trenzados para dar lugar a la formación de los filamentos.

Curiosamente, no se ha podido observar una correlación directa entre el número de residuos L-Fenilalanina en la estructura y la capacidad gelante o formadora de agregados sólidos de filamentos de los compuestos.

Geles supramoleculares

Inspirados en la capacidad organogelante tanto de la L-Fenilalanina como de sus monoderivados presentados en el capítulo anterior, se estudió la capacidad de formar organogeles de estos compuestos. Notoriamente, únicamente el compuesto **1.c** dio lugar a la formación de geles supramoleculares, tanto en DMSO como en DMF, aún en proporciones tan pequeñas como 0,45 mg/mL (Figura 18, arriba y medio). El compuesto **1.g**, por el contrario, dio lugar a la formación de geles supramoleculares en DMSO, pero con el desarrollo de sinéresis, lo que impidió su caracterización a través del ensayo del tubo invertido.

Curiosamente, más allá de la sinéresis observada para los geles del compuesto **1.g** en DMSO, este fue capaz de gelificar distintos volúmenes de crudo a través de un proceso de calentamiento-disolución y enfriamiento (Figura 18, abajo). Estos geles también presentaron una sinéresis apreciable.



Figura 18. Geles supramoleculares obtenidos para **1.c** en DMSO en concentraciones de 0,45 a 10 mg/mL (arriba), y DMF (medio), y organogeles de **1.g** empleando petróleo crudo como solvente (abajo).

Finalmente, el compuesto **1.b** no dio lugar a la formación de organogeles en ninguno de los solventes testeados. Este comportamiento tan anormal para esta serie de compuestos puede estar relacionado con su baja solubilidad a temperatura ambiente en todos los solventes testeados.

Si tenemos en cuenta el modelo de dímeros supramoleculares propuestos por Ji y sus colaboradores para explicar la disminución en la solubilidad de la L-Tirosina respecto a la L-Fenilalanina,³⁴ podemos imaginar un modelo similar para el compuesto **1.b**, pero en lugar del desarrollo de dímeros, en este caso se tendría una estructura monomérica plegada muy estabilizada mediante la formación de interacciones intramoleculares.

Considerando los resultados obtenidos para la caracterización de la química en solución de este compuesto podemos proponer que el estado conformacional más poblado será, en la inmensa mayoría de los solventes, el estado plegado. Sin embargo, hemos podido mostrar que el estado más favorecido durante la agregación es aquel donde la molécula se encuentra completamente desplegada. Esto implica que la migración de moléculas del sólido a la solución está directamente relacionada con el desarrollo de un cambio conformacional. Esto explicaría, al menos parcialmente, la disminución tan marcada en la solubilidad.

Complementariamente, se utilizó la técnica de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) para estudiar la morfología de los ensambles supramoleculares formados por estos compuestos en las soluciones de DMSO. Para poder realizar esta caracterización se utilizaron las facilidades de luz sincrotrón del laboratorio ALBA, en Barcelona, en colaboración con el Dr. Cristián Huck-Iriart (Figura 16).

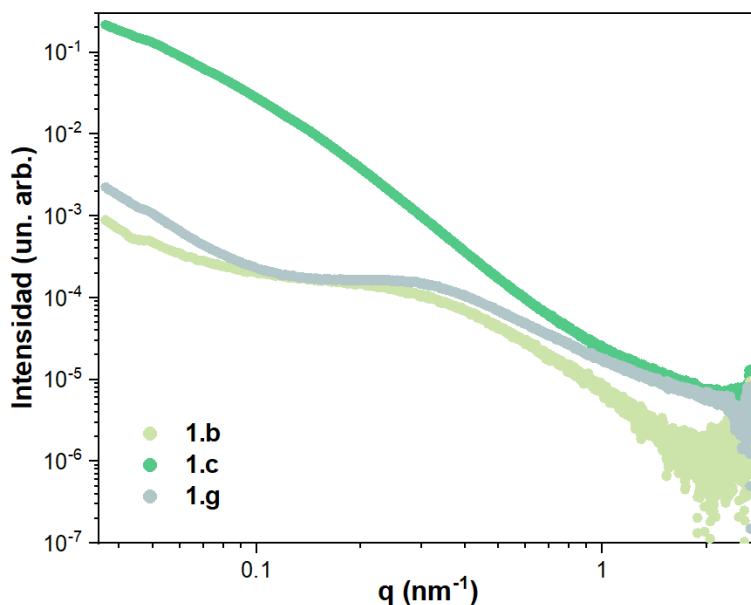


Figura 19. Patrones de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de geles de **1.b**, **1.c**, y **1.g** en DMSO.

El modelado de estos datos es particularmente desafiante debido a que la baja solubilidad de estos compuestos genera la presencia de partículas en suspensión que aumentan la dispersión inespecífica de luz y den lugar a artefactos espurios que son difíciles de separar y sustraer. Sin embargo, los perfiles observados para estos patrones son consistentes con la presencia de entidades esféricas para los compuestos **1.b** y **1.g**, y agregados cilíndricos para **1.c**. Resulta interesante notar la semejanza entre estos resultados y las morfologías de los sólidos obtenidos a partir de soluciones diluidas en DMSO observadas por SEM (Figura 15). Estos resultados podrían estar indicando que existe una correlación directa entre los agregados presentes en la solución y la red extendida desarrollada durante la formación del gel. De ser así, esto implicaría que el fenómeno de percolación es consecuencia de la congestión desarrollada como consecuencia de la cantidad de sólido que precipita durante el enfriamiento, y no por un cambio en el grado de entrecruzamiento de estos agregados.

Poder continuar con el modelado y la caracterización completa de estos datos para contar con un tamaño estimado de los agregados en solución sería muy enriquecedor para arrojar luz sobre la relación que existe entre el sistema homogéneo, los sólidos generados y el mecanismo de separación de fases, y es una de las principales perspectivas a futuro de este trabajo de tesis.

Conclusiones y Perspectivas

Las moléculas estudiadas durante este capítulo, sintetizadas a partir de tereftaldehído, 1,3,5-triformilbenceno y divainillina, y L-Fenilalanina, han demostrado ser muy buenas para ilustrar la capacidad que tiene este aminoácido de introducir propiedades de interés en el diseño de nuevos bloques de construcción supramoleculares al ser utilizada como un fragmento estructural. Fue posible poner a punto las metodologías de síntesis de los tres compuestos y uno de sus precursores, y realizar una caracterización completa de las tres moléculas en solución empleando diversas técnicas espectroscópicas.

Las distintas caracterizaciones presentadas durante este capítulo permitieron demostrar como estas moléculas tienden a agregarse o a plegarse sobre si mismas dando lugar a la formación de arreglos supramoleculares con distintos grados de anisotropía en la distribución de sus interacciones.

Cabe destacar que la presencia del fragmento aportado por la L-Fenilalanina en todas estas estructuras se vio reflejada principalmente en la naturaleza de las fases sólidas y materiales supramoleculares obtenidos. Tanto la capacidad de formar organogeles en mezclas complejas y solventes polares, como la de ensamblarse para dar lugar a la formación de filamentos supramoleculares, son comportamientos típicamente asignados a la L-Fenilalanina. Sin embargo, no fue posible encontrar una correlación clara entre el número de L-Fenilalaninas derivadas presentes en la estructura y las propiedades del material resultante. A modo de ejemplo, el compuesto **1.b** y **1.g**, ambos con la misma cantidad de residuos aminoacídicos, no presentaron la misma capacidad organogelante ni dieron mesoestructuras con la misma porosidad. Sin embargo, el compuesto **1.a**, que tiene un aminoácido derivatizado menos que ambos, presentó una capacidad organogelante similar a la del compuesto **1.g**. Además, **1.a** y **1.g** dieron lugar a sólidos con un grado de cristalinidad muy semejante, mientras que la de **1.b** y **1.c** fue notablemente menor, como se pudo apreciar en los experimentos de difracción de rayos X de polvos y las microscopías.

La imposibilidad de identificar una tendencia entre el número de residuos y las propiedades pone de manifiesto la existencia de un delicado balance entre la cantidad y la naturaleza del aminoácido empleado, como así también de la plataforma seleccionada para la derivatización y las condiciones experimentales a las que es sometido el sistema.

Sin embargo, sí fue posible proponer una relación potencial entre la rigidez del núcleo aromático empleado y el efecto de las fuerzas entrópicas sobre toda la estructura. Esto, a su vez, resulta determinante durante la selección del estado conformacional final de la estructura, lo cual tiene un efecto directo en la capacidad de agregación y en la capacidad del compuesto de difundir en solución.

Por último, quedan como perspectivas principales el estudio en detalles de las propiedades organogelantes, así como completar el análisis del modelo de autoensamblado empleando dinámica molecular y experimentos de dispersión de rayos X a bajo ángulo resueltos en el tiempo y a temperatura variable, con el fin de poder los cambios sufridos por estos compuestos a medida que se produce la agregación.

Experimental

Instrumentación

Los espectros UV-vis fueron medidos empleando un especlómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W). Las microscopías ópticas de luz polarizada se realizaron utilizando un microscopio triocular Nikon SMZ-745T con un sistema de iluminación Nikon Ni-150. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa MicrometricsTM SE Premium para las mediciones y el programa ImageJ³⁵ para el análisis.

Espectroscopía electrónica a temperatura variable

Los espectros UV-Vis fueron medidos empleando un especlómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W). Para los experimentos a temperatura variable se utilizó un termoestatizador Lauda RE 207 con una mezcla de etilenglicol:agua 70:30 como fluido de transferencia de calor.

Microscopía electrónica de barrido en alto vacío y en condiciones ambientales (SEM)

La obtención de imágenes de alta resolución por dispersión de un haz de electrones se realizó utilizando un microscopio Carl Zeiss NTS – SUPRA 40 en alto vacío, disponible en el centro de Microscopía Avanzada, DF, FCEN – UBA. Las muestras estudiadas a alto vacío fueron purificadas y secadas previamente y se las sembró sobre sobre cinta de carbón soportada en pines de aluminio aptos para SEM.

Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)

Los experimentos de microscopía confocal de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia fueron realizados con un equipo Abberior Expert Line empleando un láser pulsado de excitación de 375 nm para las moléculas en solución. Para la detección se emplearon fotomultiplicadores híbridos con filtros pasabajos de 405 nm. El tiempo de exposición por pixel fue seleccionado específicamente para cada muestra como una solución de compromiso entre tiempo de captura de imagen e intensidad de fluorescencia detectada. La electrónica empleada para la adquisición fue un módulo HydraHarp 400 de PicoQuant trabajando a una tasa de repetición de 20 MHz. Las imágenes de FLIM se construyeron considerando tiempos de vida de fluorescencia 1.5 a 3ns para los casos de moléculas sin sonda y 2 a 6ns para aquellas obtenidas en presencia de AQui. El análisis de las imágenes de FLIM se realizó empleando el software SympoTime 64 de PicoQuant y macros propias programadas en ImageJ. Los tiempos de vida de fluorescencia fueron modelados empleando un modelo mono exponencial.

Difracción de rayos X de polvos

Las medidas de pDRX fueron realizadas en un difractómetro PANalytical Empyrean equipado con un tubo de rayos X con radiación Cu K α de 4-kW (K-Alpha1=1,541 Å, K-Alpha2=1,544 Å, generador de potencia regulada: 60 kV y 100 mA), filtro beta de níquel y un detector de área PIXcel3D que emplea una geometría de haz paralelo (rendijas adaptadas según cada determinación, mascara incidente 15mm). Las muestras fueron medidas sobre un portamuestra de silicio monocristalino. Para todos los experimentos de pDRX los datos fueron medidos en un intervalo 2 theta de 4° a 50° con barrido continuo, velocidad de barrido de 200 s por paso y con 0,026° por paso.

Dispersión de rayos X a bajo ángulo

Las medidas de dispersión de rayos X a bajos ángulos fueron realizadas en la línea NCD-SWEET del Sincrotrón ALBA, en Barcelona, España. Debido a la alta absorción de los átomos de azufre en el DMSO, se empleó una energía incidente de 15 keV (0,8 nm de longitud de onda aproximadamente) y una distancia de la muestra al detector de 6,6 metros. La adquisición de los datos fue mediante un detector Pilatus 1M (Dectris, Suiza). Teniendo en cuenta que los experimentos de dispersión fueron isotrópicos, se pudo realizar una reducción de la dimensionalidad de los patrones a través de una integración en el ángulo azimutal empleando la librería pyFAI, la cual se encuentra disponible en python 3.³⁶ Para cada muestra fueron colectadas 20 imágenes de 1 segundo de exposición cada una, con el fin de analizar un posible daño por radiación sufrido por la muestra.³⁷

Metodología computacional

Los cálculos de estructura electrónica empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT) fueron realizados utilizando el programa ORCA.³⁸ El funcional utilizado fue BP86 en conjunto con un set de bases de Ahlrichs def2-SVP y una triple corrección de dispersión (DFT-D3). En todos los casos se empleó la aproximación por resolución de la identidad. Los cálculos de SCF fueron del tipo de spin polarizado y se utilizó un criterio de convergencia de 10^{-8} Eh en energía y $5 \cdot 10^{-7}$ como elemento máximo de error tolerable en el vector de DIIS. En todos los casos la grilla de integración final fue elevada a 6 para garantizar la precisión de los valores obtenidos.

Los cálculos de pre-optimización geométrica y de optimización de los conjuntos de trímeros se realizaron empleando un campo universal de fuerzas (*UFF* por sus siglas en inglés)³³ con un umbral de convergencia de 10^{-10} , utilizando 5000 pasos de un algoritmo de descenso empinado,³⁹ los cuales se encuentran implementados en el módulo de mecánica molecular del programa Avogadro.⁴⁰

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Para el estudio del mecanismo de ensamblado durante el proceso de gelificación se realizaron medidas resueltas en el tiempo cada 5 minutos y a temperatura variable, cada 5°C desde 25°C a 45°C. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AM-500 MHz, disponible en UMYMFOR, FCEN-UBA. Las muestras fueron estudiadas en óxido de deuterio-d₂ (D₂O) y deuteróxido-d₁ de sodio (NaOD). Los valores de los desplazamientos químicos (δ , ppm) son reportados referidos a la señal del solvente empleado. Las constantes de acoplamiento (J) se presentan en Hz. La multiplicidad de las

señales de ^1H RMN se indican mediante las abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; m, multiplete. La obtención de los espectros, su corrección y el tratamiento de los datos fue realizado con el software MNova 14.3.2 de MestreLab.

Síntesis y caracterización espectroscópica

Síntesis de los compuestos

Los compuestos reportados en este capítulo se sintetizaron siguiendo procedimientos reportados en bibliografía para compuestos similares, y los sintetizados previamente en el grupo, pero con algunas modificaciones para adaptarlos a las distintas solubilidades y reactividades de cada par de aldehído y aminoácido en específico.^{41,42} La mayoría de los reactivos y solventes empleados en la síntesis se obtuvieron de manera comercial y se utilizaron sin purificación previa. El metanol utilizado fue destilado antes de cada síntesis. Todas las reacciones se realizaron en condiciones aeróbicas. La síntesis del dialdehído utilizado como precursor del compuesto **1.g**, la divainillina, fue realizada empleando el protocolo reportado por Pemba y colaboradores.²⁶

A continuación, se describe el protocolo general de síntesis y en la tabla se indican las cantidades específicas de aminoácido, aldehído, base y agente reductor empleados para cada compuesto. Las condiciones de reacción de cada uno de los pasos y para cada uno de los pares aminoácido-aldehído, fueron optimizadas por Cromatografía de Capa delgada (CCD) y RMN. Todos los compuestos obtenidos luego de la acidificación resultaron ser insolubles en agua, acetonitrilo, metano y etanol, pero solubles en DMSO.

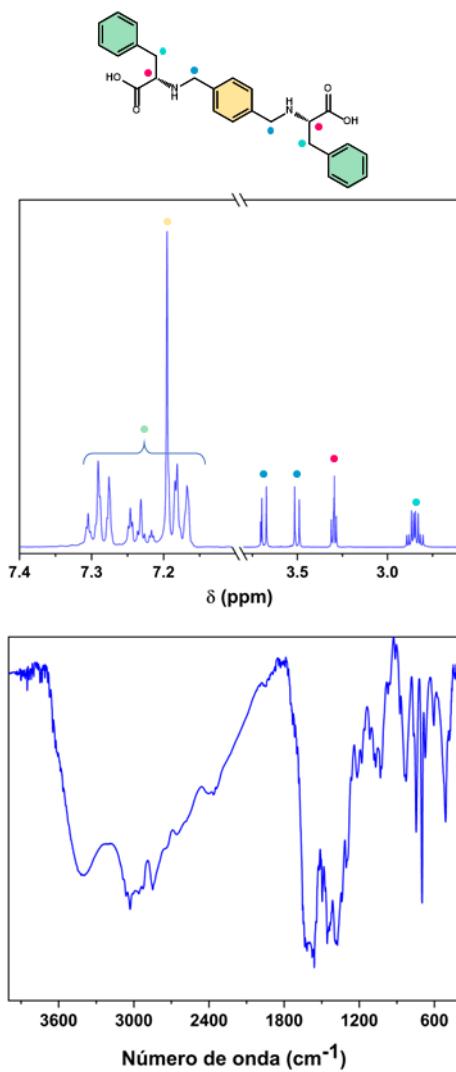
Protocolo: Una cantidad de aminoácido (7,45mmoles para **1.b** y **1.g**, o 9,26mmoles para **1.c**) e hidróxido de potasio (11,17mmoles para **1.b** y **1.g**, o 16,76mmoles para **1.c**) se suspende en metanol anhidro y se calienta hasta disolución total de ambos sólidos. A esta solución se le agrega el aldehído (3,73mmoles para **1.b**, 3,08mmoles para **1.c** y 1,51mmoles para **1.g**) y se lleva a refluo por 4 horas. Luego del agregado del aldehído la solución adquiere una coloración amarilla intensa. Al seguir la reacción por CCD se observa una apreciable disminución de la mancha correspondiente al aldehído. A la solución resultante se le agrega el NaBH₄ (14,91mmoles para **1.b** y **1.g**, o 22,36mmoles para **1.c**) en baño de hielo, y se deja reaccionar a baja temperatura por un periodo de dos horas. En este paso la solución pierde su coloración característica y se vuelve incolora. Para finalizar, la solución es acidificada con HCl (c) hasta alcanzar pH=5, lo cual conlleva a la aparición de un sólido blanco de aspecto fino. El sólido es purificado a través de lavados sucesivos con agua, etanol y acetona y caracterizado por técnicas espectroscópicas. Para el caso del compuesto **1.c**, si durante la caracterización se verifica que la transformación fue parcial y no se llegaron a derivatizar los tres grupos carbonilos, se puede emplear este producto intermedio como precursor para un nuevo ciclo de síntesis, agregando una cantidad estequiométrica de aminoácido y agente reductor según la masa a reaccionar, y utilizando la misma cantidad de horas de reacción.

Cantidades: Masas utilizadas para 500mg de aldehído. Todas las masas están expresadas en miligramos (mg).

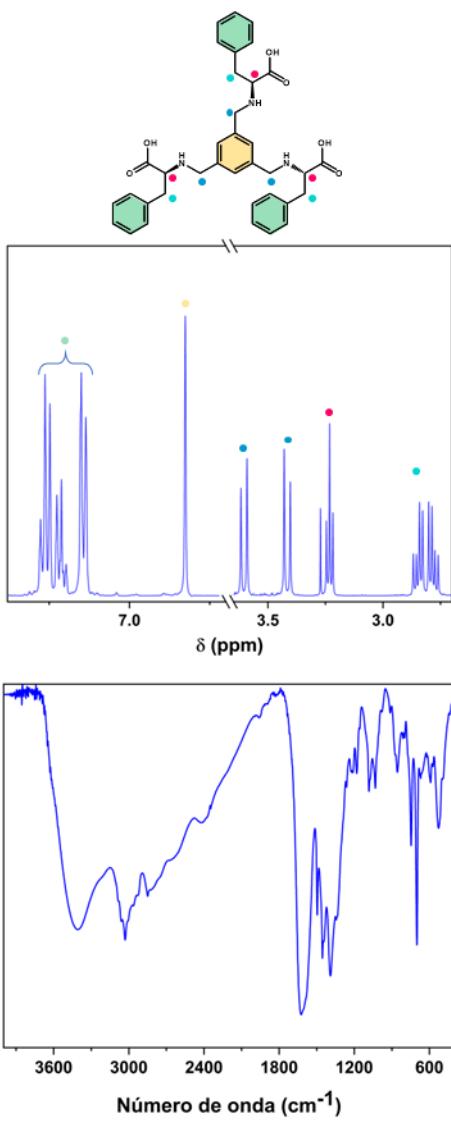
	Aminoácido	Base	Aldehído	NaBH ₄
1.b	1231	627	500	564
1.c	1529	940,5	500	846
1.g	1231	627	500	564

Caracterización

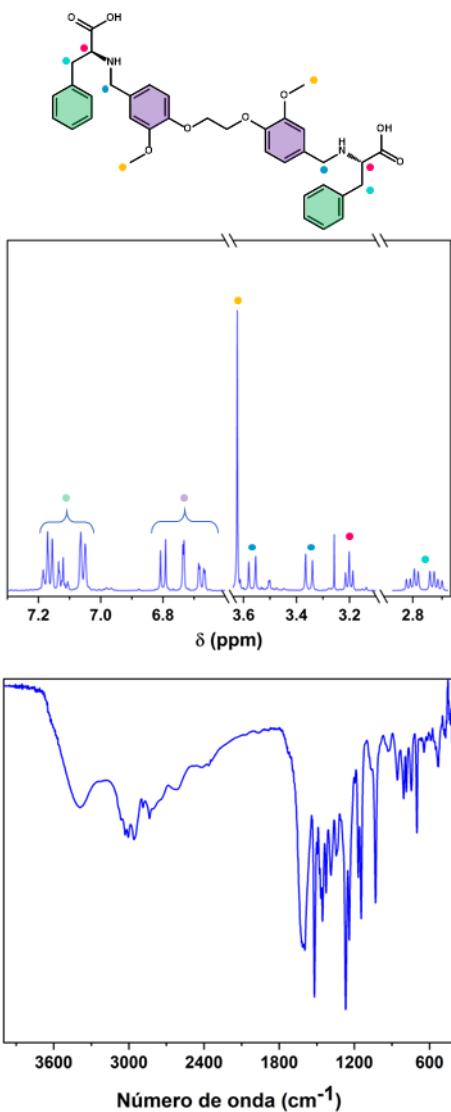
1.b: ¹H RMN (D₂O/DO⁻): δ=7.33 – 7.14 ppm (m, 5H), δ=7.20 ppm (s, 2H), δ=3.72 – 3.65 ppm (m, 1H), δ=3.53 – 3.47 ppm (m, 1H), δ=3.33 – 3.26 ppm (m, 1H), δ=2.85 ppm (qd, *J* = 13.4, 6.9 Hz, 2H). U.V-Visible en solución acuosa básica, λ_{max} =216nm, 262nm, Frecuencias de FT-IR (KBr): ν(O-H) = 3401 cm⁻¹, ν(N-H) = 3031 cm⁻¹, ν(C=O) = 1623 cm⁻¹.



1.c: ¹H RMN (D₂O/DO⁻): δ=7,31 – 7,18 ppm (m, 3H), δ=7,17 – 7,12 (m, 2H), δ=6,83 (s, 1H), δ=3,60 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), δ=3,42 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), δ=3,29 – 3,20 (m, 1H), δ=2,85 (dd, *J* = 13,5, 6,8 Hz, 1H), δ=2,78 (dd, *J* = 13,6, 7,1 Hz, 1H). U.V-Visible en solución acuosa básica, λ_{max} =218nm, 260nm, Frecuencias de FT-IR (KBr): ν(O-H) = 3412 cm⁻¹, ν(N-H) = 3026 cm⁻¹, ν(C=O) = 1626 cm⁻¹.



1.g: ¹H NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{DO}^-$) $\delta = 7,21 - 7,15$ ppm (m, 4H), $\delta = 7,15 - 7,09$ ppm (m, 3H), $\delta = 7,09 - 7,03$ ppm (m, 4H), $\delta = 6,80$ ppm (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), $\delta = 6,73$ ppm (d, $J = 2,0$ Hz, 2H), $\delta = 6,68$ ppm (dd, $J = 8,2, 2,0$ Hz, 2H), $\delta = 4,20$ ppm (s, 4H), $\delta = 3,62$ ppm (s, 6H), $\delta = 3,57$ ppm (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), $\delta = 3,35$ ppm (d, $J = 12,9$ Hz, 2H), $\delta = 3,29 - 3,12$ ppm (m, 3H), $\delta = 2,80$ ppm (dd, $J = 13,6, 6,6$ Hz, 2H), $\delta = 2,72$ ppm (dd, $J = 13,6, 7,2$ Hz, 2H). U.V-Visible en solución acuosa básica, $\lambda_{max} = 214\text{nm}, 277\text{nm}$, Frecuencias de FT-IR (KBr): $\nu(\text{O-H}) = 3391\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{N-H}) = 3005\text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{C=O}) = 1614\text{ cm}^{-1}$.



Síntesis de los materiales mesoestructurados

Geles supramoleculares

Los geles supramoleculares fueron sintetizados utilizando la metodología de sobresaturación térmica, que consiste en calentar una suspensión del agente gelificante en el solvente seleccionado hasta la disolución total, para luego bajar la temperatura hasta alcanzar el punto de sobresaturación. La formación del gel se evidencia por un cambio la consistencia de la muestra y se verifica empleando el ensayo del tubo invertido. La proporción de agente gelificante para cada solvente fue puesta a punto en función del ensayo realizado y se encuentra debidamente informada en el apartado de discusión correspondiente.

Mesocristales y agregados supramoleculares sólidos

Los sólidos mesocristalinos fueron sintetizados a través del secado directo de soluciones 50mM de cada compuesto empleando DMSO como solvente. El material obtenido fue lavado con agua y secado al vacío.

Información Suplementaria del Capítulo IV

Tabla S1. Energía libre de Gibbs asociada al proceso de desdoblamiento conformacional a 298K y 373K. de los compuestos **1.b**, **1.c** y **1.g**, en agua básica. Los colores indican aquellos valores que se encuentran por encima (rojo) y por debajo de 0 (verde). Todos los datos están informados en kJ/mol.

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 25°C

	ΔG_{Desp}^M	ΔG_{Desp}^S	ΔG_{Sup}^D	ΔG_{Sup}^P
1.b	35,1	-4,2	-73,0	-8,3
1.c	-6,3	88,3	5,9	-37,0
1.g	100,0	104,1	-90,5	15,0

Valores de Energía libre de Gibbs calculados a 100°C

	ΔG_{Desp}^M	ΔG_{Desp}^S	ΔG_{Sup}^D	ΔG_{Sup}^P
1.b	35,0	-4,0	-139,4	-75,1
1.c	-6,8	87,9	-82,0	-125,6
1.g	98,4	99,0	-182,2	-74,6

Diferencia entre los valores calculados a 100°C y 25°C

1.b	-0,1	0,2	-66,4	-66,8
1.c	-0,5	-0,4	-87,9	-88,6
1.g	-1,6	-5,1	-91,7	-89,6

Publicaciones y presentaciones en eventos científicos de los resultados de este capítulo

Presentaciones a congresos:

14. XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Abril de **2021**.
“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS BASADOS EN DERIVADOS DE L-FENILALANINA PARA SER UTILIZADOS COMO BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN DE SISTEMAS CRISTALINOS Y GELES SUPRAMOLECULARES”
Julietta Molina Flores, Federico Movilla, y Florencia Di Salvo.

Bibliografía

- (1) M. Ryan, D.; L. Nilsson, B. Self-Assembled Amino Acids and Dipeptides as Noncovalent Hydrogels for Tissue Engineering. *Polymer Chemistry* **2012**, 3 (1), 18–33. <https://doi.org/10.1039/C1PY00335F>.
- (2) Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. The Physical Properties of Supramolecular Peptide Assemblies: From Building Block Association to Technological Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (20), 6881–6893. <https://doi.org/10.1039/c4cs00164h>.
- (3) Adler-Abramovich, L.; Vaks, L.; Carny, O.; Trudler, D.; Magno, A.; Caflisch, A.; Frenkel, D.; Gazit, E. Phenylalanine Assembly into Toxic Fibrils Suggests Amyloid Etiology in Phenylketonuria. *Nat Chem Biol* **2012**, 8 (8), 701–706. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1002>.
- (4) Ménard-Moyon, C.; Venkatesh, V.; Krishna, K. V.; Bonachera, F.; Verma, S.; Bianco, A. Self-Assembly of Tyrosine into Controlled Supramolecular Nanostructures. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (33), 11681–11686. <https://doi.org/10.1002/chem.201502076>.
- (5) Shaham-Niv, S.; Adler-Abramovich, L.; Schnaider, L.; Gazit, E. Extension of the Generic Amyloid Hypothesis to Nonproteinaceous Metabolite Assemblies. *Science Advances* **2015**, 1 (7), e1500137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500137>.
- (6) Das, T.; Häring, M.; Haldar, D.; Díaz, D. D. Phenylalanine and Derivatives as Versatile Low-Molecular-Weight Gelators: Design, Structure and Tailored Function. *Biomaterials Science* **2018**, 6 (1), 38–59. <https://doi.org/10.1039/c7bm00882a>.
- (7) Singh, V.; Rai, R. K.; Arora, A.; Sinha, N.; Thakur, A. K. Therapeutic Implication of L-Phenylalanine Aggregation Mechanism and Its Modulation by D-Phenylalanine in Phenylketonuria. *Scientific Reports* **2014**, 4 (1), 3875. <https://doi.org/10.1038/srep03875>.
- (8) Singh, V.; Snigdha, K.; Singh, C.; Sinha, N.; Thakur, A. K. Understanding the Self-Assembly of Fmoc-Phenylalanine to Hydrogel Formation. *Soft Matter* **2015**, 11 (26), 5353–5364. <https://doi.org/10.1039/C5SM00843C>.
- (9) Tao, K.; Levin, A.; Adler-Abramovich, L.; Gazit, E. Fmoc-Modified Amino Acids and Short Peptides: Simple Bio-Inspired Building Blocks for the Fabrication of Functional Materials. *Chemical Society Reviews* **2016**, 45 (14), 3935–3953. <https://doi.org/10.1039/c5cs00889a>.
- (10) Sedman, V. L.; Adler-Abramovich, L.; Allen, S.; Gazit, E.; Tendler, S. J. B. Direct Observation of the Release of Phenylalanine from Diphenylalanine Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (21), 6903–6908. <https://doi.org/10.1021/ja060358g>.
- (11) Nartowski, K. P.; Ramalhete, S. M.; Martin, P. C.; Foster, J. S.; Heinrich, M.; Eddleston, M. D.; Green, H. R.; Day, G. M.; Khimyak, Y. Z.; Lloyd, G. O. The Plot Thickens: Gelation by Phenylalanine in Water and Dimethyl Sulfoxide. *Crystal Growth & Design* **2017**, 17 (8), 4100–4109. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00213>.
- (12) Anand, B. G.; Dubey, K.; Shekhawat, D. S.; Kar, K. Intrinsic Property of Phenylalanine to Trigger Protein Aggregation and Hemolysis Has a Direct Relevance to Phenylketonuria. *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 11146. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10911-z>.
- (13) Levinthal, C. Are There Pathways for Protein Folding? *J. Chim. Phys.* **1968**, 65, 44–45. <https://doi.org/10.1051/jcp/1968650044>.
- (14) Dill, K. A.; Chan, H. S. From Levinthal to Pathways to Funnels. *Nat Struct Mol Biol* **1997**, 4 (1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/nsb0197-10>.

- (15) Li, J.; Hou, C.; Ma, X.; Guo, S.; Zhang, H.; Shi, L.; Liao, C.; Zheng, B.; Ye, L.; Yang, L.; He, X. Entropy-Enthalpy Compensations Fold Proteins in Precise Ways. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (17), 9653. <https://doi.org/10.3390/ijms22179653>.
- (16) Roos, N. Entropic Forces in Brownian Motion. *American Journal of Physics* **2014**, *82* (12), 1161–1166. <https://doi.org/10.1119/1.4894381>.
- (17) Petukhov, A. V.; Tuinier, R.; Vroege, G. J. Entropic Patchiness: Effects of Colloid Shape and Depletion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2017**, *30*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.05.008>.
- (18) Chemistry (IUPAC), T. I. U. of P. and A. *IUPAC - macromolecule (M03667)*. <https://doi.org/10.1351/goldbook.M03667>.
- (19) Chen, C.-T.; Suslick, K. S. One-Dimensional Coordination Polymers: Applications to Material Science. *Coordination Chemistry Reviews* **1993**, *128* (1), 293–322. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(93\)80036-5](https://doi.org/10.1016/0010-8545(93)80036-5).
- (20) Huang, F.; A. Scherman, O. Supramolecular Polymers. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (18), 5879–5880. <https://doi.org/10.1039/C2CS90071H>.
- (21) (Gajre)Kulkarni, V.; Butte, K.; Rathod, S. Natural Polymers- A Comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2012**, *3*, 1597–1613.
- (22) Fixman, M.; Stockmayer, W. H. Polymer Conformation and Dynamics in Solution. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1970**, *21* (1), 407–428. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.21.100170.002203>.
- (23) Vorov, O. K.; Livesay, D. R.; Jacobs, D. J. Conformational Entropy of an Ideal Cross-Linking Polymer Chain. *Entropy* **2008**, *10* (3), 285–308. <https://doi.org/10.3390/e10030285>.
- (24) Cui, H.; Webber, M. J.; Stupp, S. I. Self-Assembly of Peptide Amphiphiles: From Molecules to Nanostructures to Biomaterials. *Biopolymers* **2010**, *94* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/bip.21328>.
- (25) Trznadel, M.; Kryszewski, M. Thermal Shrinkage Of Oriented Polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part C* **1992**, *32* (3–4), 259–300. <https://doi.org/10.1080/15321799208021428>.
- (26) Pemba, A. G.; Rostagno, M.; Lee, T. A.; Miller, S. A. Cyclic and Spirocyclic Polyacetal Ethers from Lignin-Based Aromatics. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (9), 3214–3221. <https://doi.org/10.1039/C4PY00178H>.
- (27) Li, P.; He, X.; Li, Y.; Lam, J. W. Y.; Kwok, R. T. K.; Wang, C. C.; Xia, L. G.; Tang, B. Z. Recent Advances in Aggregation-Induced Emission Luminogens in Photoacoustic Imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2022**, *49* (8), 2560–2583. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05726-8>.
- (28) Ma, X.; Sun, R.; Cheng, J.; Liu, J.; Gou, F.; Xiang, H.; Zhou, X. Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93* (2), 345–350. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00483>.
- (29) He, Z.; Ke, C.; Tang, B. Z. Journey of Aggregation-Induced Emission Research. *ACS Omega* **2018**, *3* (3), 3267–3277. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00062>.
- (30) Kok, C. M.; Rudin, A. Relationship between the Hydrodynamic Radius and the Radius of Gyration of a Polymer in Solution. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1981**, *2* (11), 655–659. <https://doi.org/10.1002/marc.1981.030021102>.
- (31) Kumar, S.; Tan, S.; Zheng, L.; Kochmann, D. M. Inverse-Designed Spinodoid Metamaterials. *npj Comput Mater* **2020**, *6* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41524-020-0341-6>.

- (32) Senhora, F. V.; Sanders, E. D.; Paulino, G. H. Optimally-Tailored Spinodal Architected Materials for Multiscale Design and Manufacturing. *Advanced Materials* **2022**, *34* (26), 2109304. <https://doi.org/10.1002/adma.202109304>.
- (33) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (25), 10024–10035. <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
- (34) Ji, W.; Xue, B.; Arnon, Z. A.; Yuan, H.; Bera, S.; Li, Q.; Zaguri, D.; Reynolds, P.; Li, H.; Chen, Y.; Gilead, S.; Rencus-Lazar, S.; Li, J.; Cao, Y.; Gazit, E. Rigid Tightly-Packed Amino Acid Crystals as Functional Supramolecular Materials. *18*.
- (35) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- (36) Ashiotis, G.; Deschildre, A.; Nawaz, Z.; Wright, J. P.; Karkoulis, D.; Picca, F. E.; Kieffer, J. The Fast Azimuthal Integration Python Library: pyFAI. *J Appl Cryst* **2015**, *48* (2), 510–519. <https://doi.org/10.1107/S1600576715004306>.
- (37) Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. Scattering Functions of Semiflexible Polymers with and without Excluded Volume Effects. *Macromolecules* **1996**, *29* (23), 7602–7612. <https://doi.org/10.1021/ma9607630>.
- (38) Neese, F.; Wennmohs, F.; Becker, U.; Riplinger, C. The ORCA Quantum Chemistry Program Package. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152* (22), 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
- (39) Meza, J. C. Steepest Descent. *WIREs Computational Statistics* **2010**, *2* (6), 719–722. <https://doi.org/10.1002/wics.117>.
- (40) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4* (1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- (41) Singh, R.; Devi, P. R.; Jana, S. S.; Devkar, R. V.; Chakraborty, D. Aminoacid-Derivatized Cu (II) Complexes: Synthesis, DNA Interactions and in Vitro Cytotoxicity. *Journal of Organometallic Chemistry* **2017**, *849–850*, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.04.017>.
- (42) Liu, Q.; Lin, H.; Lin, H. Studies on the Synthesis and Potentiometric Properties of Three Novel Tripodal Ligands and Their Complexes. *Transition Met Chem* **2006**, *31* (3), 325–332. <https://doi.org/10.1007/s11243-005-6382-3>.

“La perfección y el poder están sobrevalorados. Creo que es más sabio elegir la felicidad y el amor.”

M.

Capítulo V

Nanoestructuras con potencial actividad amilogénica obtenidas a partir de derivados de aminoácidos: estudio estructural y evaluación citotóxica

ÍNDICE DEL CAPÍTULO V

Introducción	280
Primeras definiciones de la entidad.....	280
Una definición basada en la estructura	281
Correlación entre el orden parcial de los cristales líquidos y las estructuras amiloides	283
Resultados y Discusión	287
Autoensamblado en solución de la L-Fenilalanina y la L-Tirosina.....	287
Análisis del carácter amiloide de sus arquitecturas supramoleculares.....	287
Actividad amilogénica de la L-Fenilalanina	288
Actividad amilogénica de la L-Tirosina	293
Autoensamblado de derivados de L-Fenilalanina y la L-Tirosina.....	295
Bases para una relación entre la estructura molecular y la arquitectura supramolecular	295
Convergencia supramolecular y arreglos apilados de planos electroestáticos	298
Divergencia Supramolecular y el desarrollo de redes extendidas de interacción	300
El factor de forma y la convergencia como predictores de arquitecturas supramoleculares.....	303
Texturas de cristal líquido.....	307
Extensión a otros derivados de L-Fenilalanina y L-Tirosina.	309
Estudios de formación en solución de estructuras con potencial actividad amilogénica	314
Estudio de alteraciones en la emisión de una sonda fluorescente sensible al entorno	314
Estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares.....	315
Estudios de citotoxicidad	318
Estudios en tiempo real empleando microscopía de imagen por tiempo de decaimiento	319
Conclusiones	329

Experimental.....	331
Síntesis de los compuestos	331
Instrumentación	331
Estudios de citotoxicidad	331
Protocolo de trabajo empleado para los estudios sobre neuritas de ratón.....	332
Protocolo para la interacción entre neuroblastos de ratón y moléculas libres o filamentos	333
Ánalisis de la formación de estructuras con carácter amiloide por ratiometría empleando una sonda fluorescente sensible al entorno	334
Protocolo para el estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares empleando la sonda AQui y la sonda ThT	334
Glosario.....	335
Bibliografía	337

Introducción

Primeras definiciones de la entidad “amiloide”

Desde la primera aparición del término “amiloide” en la bibliografía médica,¹ el cual hacía referencia a los depósitos extracelulares de material con aspecto fibrilar y cuya procedencia se podía vincular a procesos de plegamiento incorrecto de ciertas proteínas, su empleo estuvo siempre íntimamente ligado a diversas patologías,¹ lo que lo convirtió en el “sospechoso de siempre” a la hora debatir sobre enfermedades neurodegenerativas,² patologías cardíacas,³ o actividad citotóxica en distintos órganos cuando hay sospechas de que se encuentran involucradas proteínas incorrectamente plegadas.⁴⁻⁸

Sin embargo, esta mala fama se ha visto en franco declive desde hace unos años debido a que muchos trabajos han mostrado un rol fisiológico normal del péptido β -amiloide ($A\beta$) a bajas concentraciones, y hasta se ha propuesto que está implicado en el correcto funcionamiento de la memoria, entre otras.⁹ Este péptido, formado por 36 a 43 aminoácidos, se deriva de la proteína precursora APP, del inglés *amyloid beta precursor protein*. Aunque actualmente el rol de las estructuras amiloides sigue siendo motivo de debate,⁹⁻¹¹ se considera que existe un carácter citotóxico íntimamente ligado a los primeros estadios de formación de las fibras características de estas estructuras. La principal diferencia entre el rol fisiológico y el desarrollo de la actividad citotóxica parece estar dado por la formación de agregados supramoleculares en concentraciones tales que se aprecia la agregación, pero no es suficiente para precipitar.¹² Esta existencia de un delicado equilibrio de precipitación en el que se encuentran involucradas especies individuales, agregados supramoleculares y partículas macroscópicas, se asemeja a la descripción actual de los procesos de formación de materiales cristalinos a través del mecanismo de nucleación y crecimiento clásico.¹³

Aunque en los inicios se consideraba que las estructuras amiloides estaban conformadas principalmente del péptido $A\beta$, debido a que era el principal encargado de desarrollar las placas amiloides observadas en la materia gris del cerebro de pacientes que sufrían la enfermedad de Alzheimer,¹⁴ actualmente está aceptada una hipótesis general que establece que la capacidad de formar estructuras amiloides puede extenderse hasta el campo de las moléculas pequeñas.¹⁵ En este universo de nuevos precursores amilogénicos se encuentran no solamente metabolitos proteicos como la L-Fenilalanina o la L-Tirosina, sino también especies que no están directamente relacionadas con el metabolismo de proteínas, como la adenina.¹⁵

Teniendo en cuenta la marcada actividad biológica que se ha reportado para las estructuras amiloides, y la evidencia experimental que demuestra que pequeñas moléculas individuales también son capaces de dar origen al desarrollo de este tipo de agregados, resulta fundamental estudiar la existencia de ciertas características estructurales de estos

¹ Al final de este capítulo se encuentra un Glosario en el que se definen los términos más relevantes que serán empleados a lo largo de las discusiones.

pequeños bloques construcción que permitan predecir y, en última instancia, modular la actividad amilogénica.

Debido a la carencia de una definición rigurosa, tanto desde lo cualitativo como desde lo estructural, el término “amiloide” fue adoptando varias formas a lo largo de los últimos años.¹⁶ A medida que se encontraban nuevas estructuras amilogénicas y las fuentes de la actividad citotóxica se diversificaban, esta definición se fue alterando casi de manera arbitraria para terminar representando un conjunto de estructuras fibriformes asociadas al incorrecto plegamiento proteico, y con una implicancia potencial en patologías relacionadas con la actividad citotóxica.¹⁷ Esta definición conlleva a una identidad por contraste, implicando que toda estructura amiloide parece ser aquella “a fin” a la que se desarrolla a partir del péptido A β , aunque el grado de similitud requerido para poder emplear esta definición tampoco parece estar rigurosamente definida aún.

Aunque no parece existir en bibliografía un consenso sobre la definición rigurosa de una estructura amiloide, sí existen metodologías ampliamente aceptadas para su detección. Por mucho tiempo, este rótulo se le daba a toda aquella estructura fibriforme capaz de adquirir una birrefringencia de coloración verdeazulada al ser teñida con Rojo Congo y analizada con un polarizador,¹⁸ o que podía estimular la emisión fluorescente de la Tioflavina T,¹⁹ o que se teñía frente al agregado de iodo.²⁰ Aunque rápidas y simples, estas técnicas presentan fuertes limitaciones en su selectividad y sensibilidad, y ya se encuentran reportadas varias restricciones para su uso en presencia de sustancias exógenas o matrices complejas.^{21,22}

Por otro lado, si deseamos basar la definición de estructura amiloide no desde su reactividad frente a las distintas caracterizaciones, sino desde sus propiedades, notamos que tampoco están completamente establecidas de forma exhaustiva y rigurosa las características mínimas y necesarias para poder discriminar de cuáles se trata. A modo de ejemplo, por mucho tiempo la citotoxicidad fue considerada como una de las principales características asociada a las estructuras amiloides. Pero se demostró que esta propiedad depende en gran medida de la concentración,⁹ y cada vez aparece un mayor número de estructuras amiloides funcionales tanto en humanos como en bacterias.²³

Una definición basada en la estructura

Un abordaje lo suficientemente robusto es aquel que se hace desde las propiedades estructurales. En estos términos, se puede definir a una estructura amiloide como un agregado de aspecto fibrilar producido a través del ensamblado, autónomo, supervisado o inducido, por apilamiento de bloques de construcción poliméricos con estructuras semejantes a una lámina β .²⁴ El principal beneficio de emplear una definición en términos estructurales es que permite determinar de manera measurable distancias características entre los componentes del sistema. Esto allana el camino en pos de desarrollar una técnica que permita distinguir inequívocamente entre una estructura amiloide y cualquier otra entidad fibriforme en un dado sistema.

Bajo esta definición, la caracterización de estas estructuras puede realizarse de manera directa y rápida empleando técnicas de difracción de rayos X que permiten obtener un patrón bidimensional característico, el cual está asociado a las distancias que quedan

determinadas entre polímeros y entre agregados laminares.²⁵ A este tipo de patrones de difracción identitarios se los denomina “patrón en cruz- β ” (*cross- β motif*). Este se compone de dos pares de semiarcos perpendiculares cuyos valores de distancia característica son de 4,8 y 10,5 Å. (Figura 1) y es un tipo de arreglo supramolecular que se encuentra conservado en casi todas las estructuras amiloides reportadas hasta ahora.²⁴ En términos de la aplicación práctica de esta definición es importante notar que, aunque preferible, no es condición necesaria la observación directa de un patrón bidimensional de difracción, en tanto esta misma información puede obtenerse realizando un experimento de difracción de rayos X de polvos sobre una muestra, y analizando la posición e intensidad de sus picos.^{26,27}

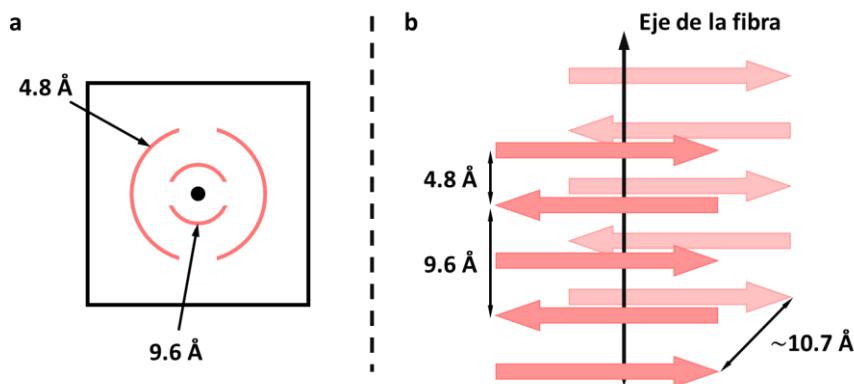


Figura 1. (a) Esquema del patrón de difracción de rayos X esperado para una estructura de tipo lámina β . (b) Distancias características de una estructura secundaria de tipo lámina β . Imagen adaptada de la cita ²⁵.

El hecho de que el autoensamblado espontáneo de estas sustancias conlleve una segregación de fases en la que se da lugar a la coexistencia de regiones hidrofóbicas en el interior e hidrofílicas en el exterior de las láminas, es característica de un orden a mediana escala como el que se observa en cristales líquidos liotrópicos.²⁸ Los cristales líquidos son estados intermedios entre el estado sólido y líquido. Se los suele denominar estados mesomorfos, debido a que las partículas que los componen poseen un grado de ordenamiento que se encuentra entre el perfecto orden extendido tridimensionalmente característico de los sólidos cristalinos y la ausencia de orden a largo alcance que se manifiesta en líquidos isotrópicos, gases y sólidos amorfos. La formación de este tipo de mesofases suele estar dada por la segregación a pequeña escala de las regiones miscible e inmiscibles de una dada estructura molecular, así como la búsqueda de un empaquetamiento eficaz que minimice el volumen libre del sistema.²⁹

Debido a la naturaleza intrínsecamente dual que poseen los cristales líquidos podemos explicar cómo las estructuras amiloides pueden presentar un comportamiento tan ambivalente, con las respuestas mecánicas flexibles y plásticas de un material que se percibe amorfico y fácilmente adaptable, pero con las propiedades estructurales de orden y periodicidad bien definidas que usualmente están asociadas a los sistemas cristalinos.

Correlación entre el orden parcial de los cristales líquidos y las estructuras amiloides

En muchos materiales se ha observado el desarrollo espontáneo de zonas discretas altamente ordenadas en medio de regiones isotrópicas o amorfas durante el proceso de descomposición en fases.³⁰ Estas zonas se presentan como inhomogeneidades birrefringentes al ser estudiadas empleando un conjunto de dos polarizadores, y se caracterizan por su aspecto esferiforme y una distribución radial en forma de bandas alrededor de un centro. En muchos casos, si el material presenta cierto carácter termotrópico, estas regiones esferiformes pueden observarse insertas entre texturas birrefringentes extendidas en todo el campo observado.³¹

Estas inhomogeneidades birrefringentes de morfología esférica se denominan esferulitas y, en el ámbito de los cristales líquidos, pueden ser entendidas como un tipo particular de disclinación, discreta y delimitada, dentro de las texturas de Schlieren.^{30,32} Aunque este tipo de inhomogeneidades puntuales y esferiformes se han observado en sistemas tan diversos como cristales líquidos,³² materiales poliméricos³¹ y algunos minerales,³³ en todos los casos están asociados a un orden periódico local de corto alcance que no abarca en extensión todo el campo observado.³⁴

Esta inhibición en la extensión puede entenderse en el marco de la teoría de fluctuaciones de concentración presentada en el Anexo del Capítulo III y la discusión desarrollada en torno a los mecanismos de descomposición, tanto en el capítulo III como el IV. Si pensamos a una mezcla homogénea como un sistema que contiene fluctuaciones de concentración que se desarrollan en una dada escala espacial imperceptible macroscópicamente, podemos representar a estas fluctuaciones en la concentración como nodos de una “concentración promedio” que difunden constantemente a lo largo del seno del sistema.

Cuando un sistema sufre una descomposición, esta produce que las fluctuaciones de concentración ya no se puedan relajar y queden fijas tanto en posición como en composición, lo cual es equivalente a que los nodos de concentración interrumpan su difusión y se detengan. Estos nodos son lo que luego actuarán como núcleos de precipitación y determinarán el carácter cristalino o espinodal del material resultante. El grado de ordenamiento de los componentes de estos núcleos estará dado por la acción de las fuerzas entrópicas y la complementariedad supramolecular, mientras que su tamaño será producto del equilibrio que se genere entre la estabilización que produce aumentar el volumen de una nueva fase y la desestabilización que deviene de incrementar el tamaño de su superficie al ser expuesta al entorno. En el caso particular en que no exista otro componente en el sistema y la transición que se está dando es por motivo de una solidificación/precipitación, es posible que este fenómeno de segregación se manifieste en forma de texturas de Schlieren, como sucede en líquidos termotrópicos, debido a que no existirá una frontera apreciable entre fases de distinta composición. El aporte de desestabilización superficial se vuelve despreciable frente a la estabilización volumétrica, lo cual extiende desmesuradamente el volumen de los nodos de precipitación hasta desdibujar la frontera entre ellas.

La hipótesis principal de esta sección de este capítulo de tesis es que estos nodos de concentración encuentran su correlato experimental en las esferulitas. Para facilitar la nomenclatura a lo largo de esta sección y de todo el capítulo, el término “esferulita” será empleado de forma general para describir todos los eventos de fluctuación (estable) de la concentración y el término “Cruz de Malta” se empleará de forma específica para referirse a las inhomogeneidades de morfología esférica y arreglo concéntrico que presentan bandas radiales de birrefringencia.

La distinta combinación de tamaños y órdenes posibles permite describir el panorama tan diverso de texturas y morfologías que se ilustra en la Figura 2 empleando imágenes representativas reportadas en la bibliografía ya citada.

- 1) Nodos medianos y claramente distinguibles entre si con un grado de orden elevado dará lugar a la formación de núcleos cristalinos consistentes con la teoría de nucleación y crecimiento clásicos.
- 2) Nodos pequeños con un grado de orden elevado darán lugar a la formación de núcleos cristalinos polidispersos que podrían aglomerarse o compartir caras de crecimiento común para dar lugar a la formación de material policristalino.
- 3) Nodos pequeños con bajo grado de orden serán características de los materiales espinodales, altamente entrecruzados y dispersos.
- 4) Esferulitas de gran tamaño con alto grado de orden darán lugar a maclas.
- 5) Esferulitas de gran tamaño con un grado de orden orientacional, pero no posicional, darán lugar a las texturas de Schlieren.
- 6) Esferulitas de menor tamaño e independientes entre sí con un grado de orden orientacional, pero no posicional darán lugar a los arreglos en forma de cruz de malta.

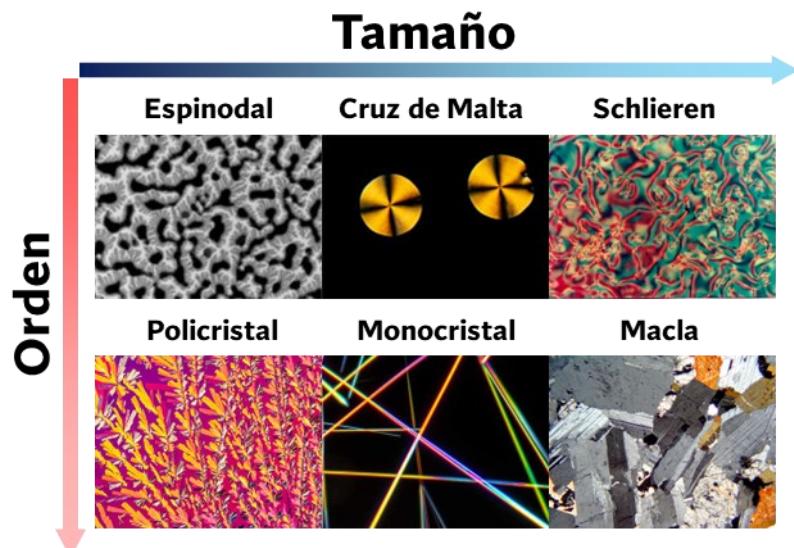


Figura 2. Materiales generados a partir de diversas combinaciones de tamaño y orden de las esferulitas y tipos de nodos. La imagen del material espinodal está adaptada del trabajo de Braun y Meyer,³⁵ las de materiales policristalinos, cruces de maltas, monocristales y texturas de Schlieren fueron adaptadas del trabajo de Berdan,³⁶ y la de macla fue adaptada del trabajo de Gil-Crespo.³⁷

Mas allá de la presencia ubicua de este tipo de regiones de orden local en materiales poliméricos y cristales líquidos, es poco frecuente encontrar el término “esferulita” o “textura de Schlieren” asociado a placas seniles o a otros fenómenos devenidos de la agregación molecular. Sin embargo, al estudiar el aspecto de la birrefringencia que produce la tinción con Rojo Congo en estos compuestos podemos apreciar un grado de similitud notable (Figura 3).

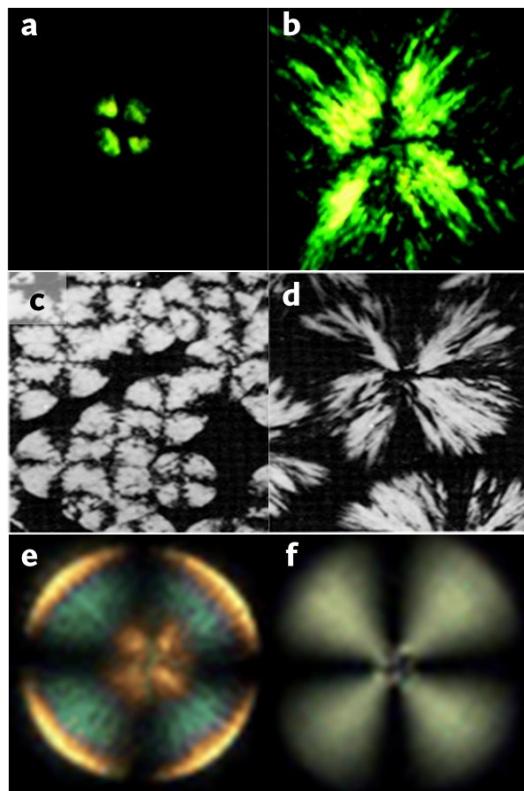


Figura 3. Birrefringencia observada en arreglos radiales de placas seniles teñidas con Rojo Congo (a y b, imagen adaptada del trabajo de Kahr y colaboradores),³⁸ en esferulitas de polietileno (c y d, imagen adaptada del trabajo de Lauritzen y colaboradores),³⁹ y en una gota de un cristal líquido (e y f, imagen adaptada del trabajo de Park y colaboradores).⁴⁰

Si desconociéramos el origen amiloide de las imágenes que se muestran en la Figura 3a y 3b podríamos caer en la tentación de describirlas como “esferulitas estriadas”, en tanto presentan la misma morfología esferiforme y el arreglo radial en bandas equivalente al que se espera para estructuras de este estilo. Esto pone de manifiesto la estrecha relación que existe entre las estructuras amiloides y los materiales mesogénicos, al menos en el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía, y apoya la hipótesis de que existe un paralelismo estructural en términos de orden local, respuesta colectiva y fluidez para ambos sistemas.

En resumen, se puede decir que, en las estructuras amiloides conviven tanto la necesidad de ubicar de manera ordenada bloques de construcción para desarrollar una estructura regular y bien definida, como la necesidad de generar una respuesta mecánica que brinde flexibilidad y adaptabilidad, facilitando su locación ubicua y garantizando la fluidez a través del organismo. Esto nos permite abordar el estudio de la formación de estos sistemas supramoleculares desde el marco termodinámico constituido para los

fenómenos de nucleación y crecimiento y descomposición espinodal, que serán los empleados durante este trabajo de tesis.

Durante este capítulo de tesis se presentará un análisis detallado de las diversas estructuras supramoleculares generadas por los aminoácidos L-Fenilalanina, L-Tirosina y los respectivos derivados que fueron discutidos en los Capítulos III y IV. Teniendo en cuenta las características que se observaron en algunos de los materiales obtenidos a partir de las moléculas que se sintetizaron en este trabajo de tesis, y los antecedentes que se presentaron en los párrafos anteriores, surgió la motivación de extender su estudio en el contexto de la formación y propiedades de las estructuras amiloïdes.

Adicionalmente, se planteó otro interrogante que consiste en comprender si existen ciertas características en las estructuras moleculares de estos compuestos que permitan predecir o modular la actividad amilogénica. Para ello, se analizó en detalle las similitudes y diferencias que presentan las estructuras cristalinas de sus switeriones y sus sales en comparación con el modelo estándar de lámina β y estructura amiloide. En base a estos resultados se propone una relación estructural entre la potencial actividad amilogénica y el desarrollo de red anisotrópica de interacciones supramoleculares mediada tanto por el residuo aminoacídico, como por el aporte del aldehído.

Por un lado, como parte de los experimentos, se puso a prueba la capacidad de desarrollar ensambles en solución capaces de ser detectados por una sonda especialmente diseñada para la identificación de agregados amiloïdes. Por otro lado, se investigó la citotoxicidad tanto de las moléculas libres en solución como de los agregados supramoleculares formados, con el fin de estudiar una potencial actividad biológica nociva. Finalmente, se estudió la interacción entre los compuestos individuales, sus agregados supramoleculares y células nerviosas con la intención de observar alteraciones en la morfología celular. Los resultados de estos experimentos son ambiguos, en tanto no parece observarse de manera sistemática la formación de filamentos con carácter amilogénico, ni se puede apreciar un cambio en el tiempo de decaimiento de la sonda empleada, pero sí se evidencia la presencia de alteraciones en la membrana celular y la proliferación de filamentos en el espacio interneuronal que podrían estar indicando tanto un fenómeno de apoptosis como la maduración de las células nerviosas.

Resultados y Discusión

Autoensamblado en solución de la L-Fenilalanina y la L-Tirosina

Análisis del carácter amiloide de sus arquitecturas supramoleculares

Como se introdujo en el Capítulo II, podemos considerar un bloque de construcción como *convergente* cuando este no presenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno, o ninguna otra interacción no covalente fuerte y direccionada, a través de sus residuos o grupos no aminoacídicos. Al contrario, se considerará bloque de construcción *divergente* a aquel capaz de desarrollar interacciones del tipo puente de hidrógeno, o cualquier otra interacción no covalente fuerte y direccionada, desde sus residuos hacia “el exterior” del agregado supramolecular. El concepto de divergencia deviene de la capacidad de formar redes no covalentes extendidas tridimensionalmente de forma tal de hacer “divergir” la topología del ensamble.

Esta dicotomía entre convergencia y divergencia supramolecular se puede ver ilustrada claramente en la relación estructural entre L-Fenilalanina y L-Tirosina (Figura 4). La primera no presenta la capacidad de donar o aceptar puentes de hidrógeno en ninguna de las posiciones de su residuo aminoacídico, mientras que la segunda sí. Esta diferencia de comportamiento se origina debido a la existencia del grupo hidroxilo en la posición *para* en la L-Tirosina. En los casos en que haya más de un residuo y exista la posibilidad de formar puentes de hidrógeno en alguno de ellos y en otros no, las especies serán consideradas mixtas. En los casos en que el sistema esté compuesto únicamente de moléculas cuyo residuo es capaz de aceptar puente de hidrógeno, pero no de donar y no haya otros donores posibles, el bloque de construcción se comportará convergentemente y, por lo tanto, será considerado de esta manera.

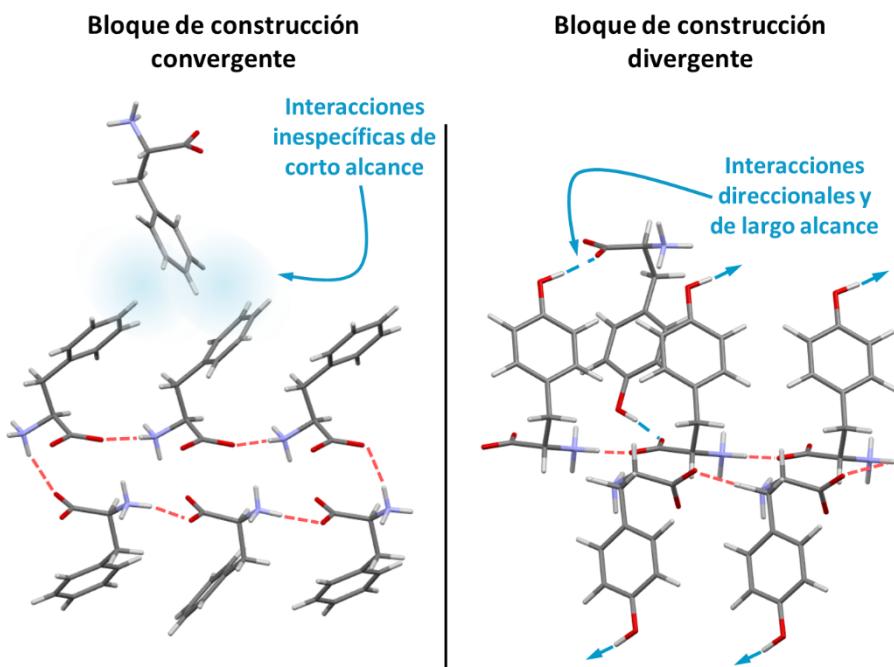


Figura 4. Comportamiento convergente y divergente representado para las estructuras de L-Fenilalanina (izquierda) y L-Tirosina (derecha)

La propiedad de divergencia supramolecular es esencial para garantizar la formación de ensambles supramoleculares extendidos tridimensionalmente que sean capaces de desarrollar redes de energía de interacción atractivas e intensas.⁴¹ La importancia de realizar el análisis empleando este concepto se pone de manifiesto en su aplicación para diseñar racionalmente bloques de construcción para el desarrollo de nuevos materiales con una respuesta mecánica isotrópica y una baja flexibilidad.

Actividad amilogénica de la L-Fenilalanina

Actualmente se encuentran reportados en bibliografía agregados supramoleculares de L-Fenilalanina que forman filamentos amiloideos y cuyo carácter cristalino ha permitido una caracterización estructural completa.⁴² Como ya se presentó en el capítulo III, en estos filamentos, constituidos únicamente a partir de L-Fenilalanina en estado switeriónico, se da a lugar la formación de un “cierre electroestático” que se establece a través de interacciones electroestáticas atractivas entre regiones de carga opuesta de moléculas aledañas. Esto da lugar a la constitución de láminas supramoleculares que, a su vez, desarrollan interacciones electroestáticas con otras láminas orientadas de forma inversa para constituir finalmente una bicapa electroestática. Por último, estas bicapas interactúan con otras a través de interacciones no covalentes desarrolladas por sus residuos aminoacídicos, apilándose de forma similar a una lámina β . (Figura 5).

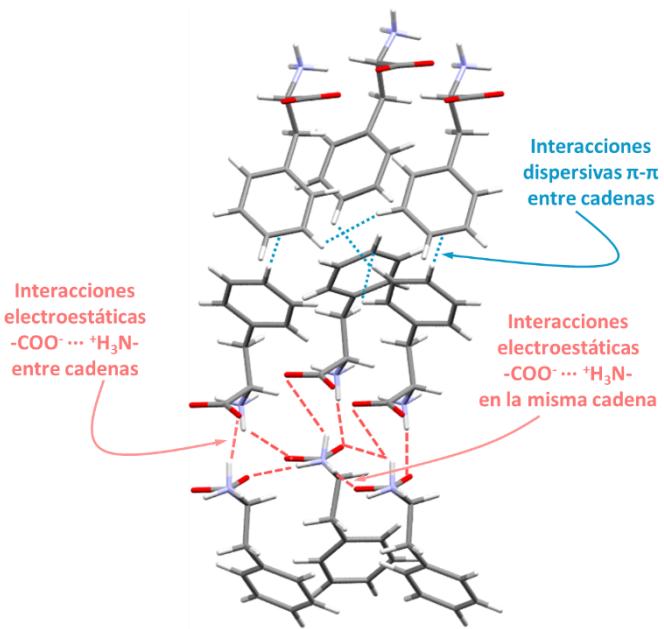


Figura 5. Interacciones intermoleculares presentes en la estructura de L-Fenilalanina switeriónica.

Esta configuración de apilamiento de planos permite distinguir dos distancias características. Una de ellas es la distancia asociada a la interacción electroestática y el puente de hidrógeno que se constituye entre aminoácidos aledaños, que se encuentra alrededor de los 4,6 Å, y la otra, es la asociada a la separación entre las “bicapas electroestáticas”, la cual está modulada por el tipo de interacción que pueda generar el residuo aminoacídico. En este caso, para la L-Fenilalanina, esta distancia es de 10,3 Å y está dada por la formación de interacciones dispersivas entre las nubes electrónicas de los anillos aromáticos (Figura 6).⁴²

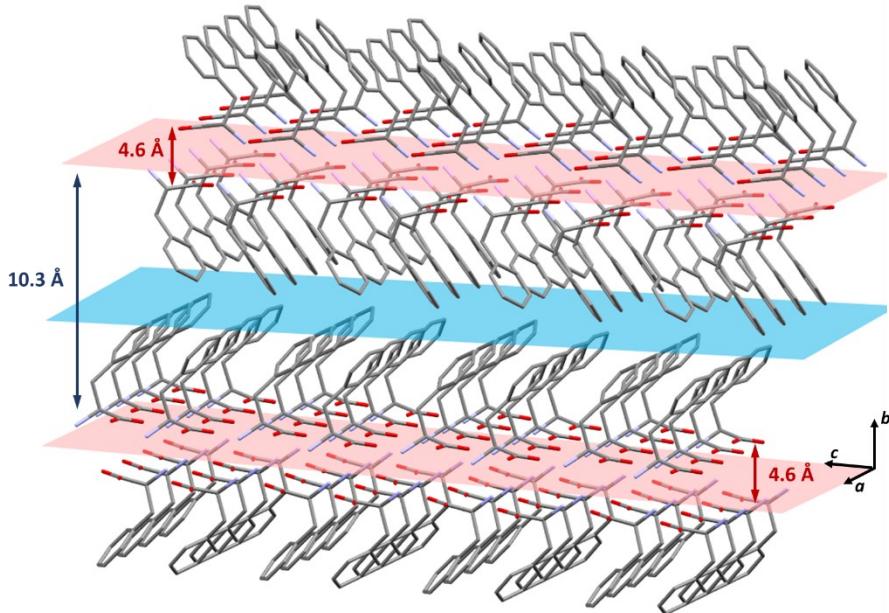


Figura 6. Distancia interplanar observada para la estructura cristalográfica de L-Fenilalanina en estado switeriónico. En rojo se identifican las regiones electroestáticas que unen dos láminas para dar lugar a la formación de las bicapas electroestáticas. En azul se detalla la región donde se desarrollan las interacciones no covalentes dispersivas.

Esta estructura en capas descripta para los filamentos de la L-Fenilalanina es consistente con los resultados de trabajos reportados recientemente en los que se relaciona la identificación de ciertas características moleculares y supramoleculares con la formación de estructuras amiloïdes. Algunos autores proponen que la presencia de un fragmento molecular de carácter aromático, en conjunto con una región capaz de formar interacciones electroestáticas, podría ser una combinación suficiente para dar lugar al desarrollo del carácter amilogénico.^{15,43}

Esta relación entre la estructura molecular y la actividad amilogénica puede explicarse considerando que el proceso de autoensamblado requiere, por su naturaleza homomolecular, la capacidad de adquirir carga neta tanto positiva como negativa en una misma molécula. Pero esta condición de estabilización electroestática no es suficiente para garantizar la flexibilidad y el desarrollo longitudinal característico de las estructuras amiloïdes. Es necesario contar también con la presencia de un fragmento estructural que tenga la capacidad de formar interacciones no covalentes de corto alcance, con poca demanda geométrica y una considerable reversibilidad a temperatura ambiente. Esto no solamente concede la capacidad de separar los planos electroestáticos entre sí de manera reversible, dando lugar a la respuesta mecánica flexible, sino que también permite inhibir el desarrollo de una red cristalina tridimensional, lo cual daría como resultado estructuras extremadamente orientadas, rígidas y con mucha facilidad para desarrollarse en las tres dimensiones. En el caso límite en el cual se desarrollan interacciones fuertes de manera isotrópica, es casi inevitable que se dé como resultado la obtención de un material cristalino rígido y duro, carente tanto de la morfología como de la respuesta mecánica requerida para el plegamiento observado en las estructuras amiloïdes. Es por este motivo que los aminoácidos y sus derivados, a diferencia de otros metabolitos que están implicados en rutas metabólicas muy emparentadas, suelen estar en el foco de las investigaciones asociadas a la amilogénesis.

La estructura secundaria formada por la L-Fenilalanina en los filamentos descritos se asemeja de forma notable a una lámina β ,⁴⁴ pero su cadena principal no está constituida de un polímero monodimensional de enlaces peptídicos, sino de un polímero supramolecular y bidimensional que se obtiene a partir del desarrollo de las interacciones puentes de hidrógeno. Esto genera láminas más gruesas, extendidas a lo largo de dos dimensiones, y con residuos aromáticos asomando perpendicularmente a las láminas en ambas caras y para todos los bloques de construcción (Figura 6). No existe una alternancia en la disposición de los residuos, como sí sucede en las láminas β reportadas en proteínas.⁴⁴

Si empleamos una representación en términos de flechas orientadas semejante a la que se utiliza típicamente para las láminas β , podemos observar que los agregados de L-Fenilalanina se ordenan de manera compacta entre sí, con apenas una diferencia en la rotación del residuo aromático entre pares de aminoácido. Esto hace que la representación en flechas monodimensionales y orientadas pierda sentido. Por este motivo resulta más adecuado pensar la descripción esquemática de esta estructura en términos de planos electroestáticos apilados entre sí, debido a las interacciones no covalentes desarrolladas por los residuos alojados entre los planos (Figura 7).

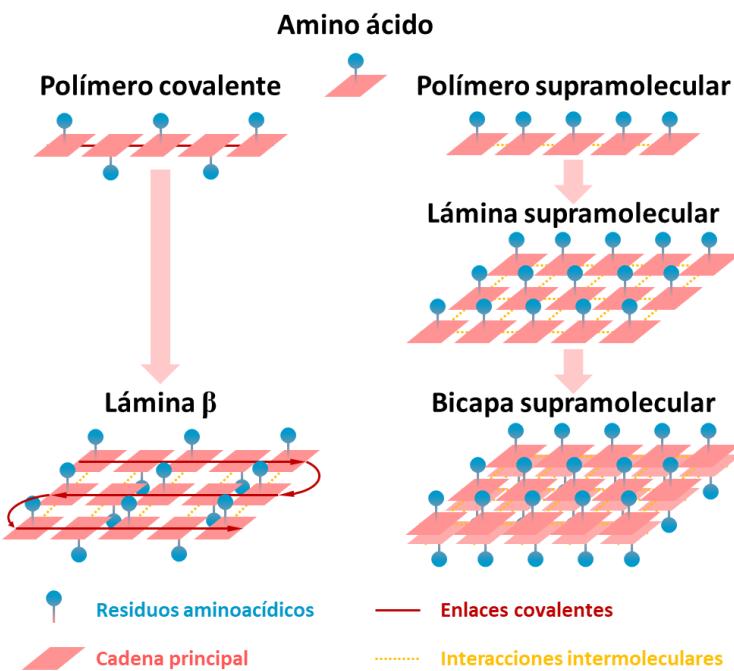


Figura 7. Esquema de representación de una estructura secundaria de tipo lámina β y el caso del empaquetamiento de la L-Fenilalanina.

Este empaquetamiento en capas descrito para los filamentos de L-Fenilalanina nos permite observar ciertas semejanzas entre la estructura supramolecular desarrollada por la L-Fenilalanina y las estructuras amiloides encontradas para varias proteínas amilogénicas. En primer lugar, así como ciertas regiones de una proteína pueden dar lugar a la formación de una estructura secundaria del tipo lámina β por interacción de puente de hidrógeno entre distintas porciones de la cadena principal que se encuentran cercanas entre sí, algunos monómeros supramoleculares pueden autoensamblarse para dar lugar a la formación de láminas supramoleculares con una morfología plana y extendida extremadamente semejante.

Además, la formación de estructuras del tipo lámina β en las proteínas conlleva la necesidad de alojar los residuos aminoacídicos de forma tal que queden de manera alternada por encima y por debajo de esta lámina.⁴⁵ Algo muy similar sucede en las bicapas desarrolladas en la estructura de L-Fenilalanina, aunque, en este caso, todos sus residuos se encuentran orientados hacia la misma cara de cada lámina que conforma el plano de la bicapa.⁴⁴ Por último, de la misma manera que un conjunto de láminas beta pueden apilarse entre sí para dar lugar a ensambles compactos que luego desarrollan las protofibras citotóxicas,²⁴ las bicapas supramoleculares también pueden apilarse. En este caso, la principal diferencia reside en que el grosor de la bicapa supramolecular es considerablemente mayor, si se tiene en cuenta tanto la distancia de la región electroestática como el largo de cada residuo, respecto al grosor de una lámina β . Esto genera que, al comparar el apilamiento entre un mismo número de bicapas y de láminas, las primeras darán lugar a protofilamentos de mayor grosor.^{42,46} (Figura 8)

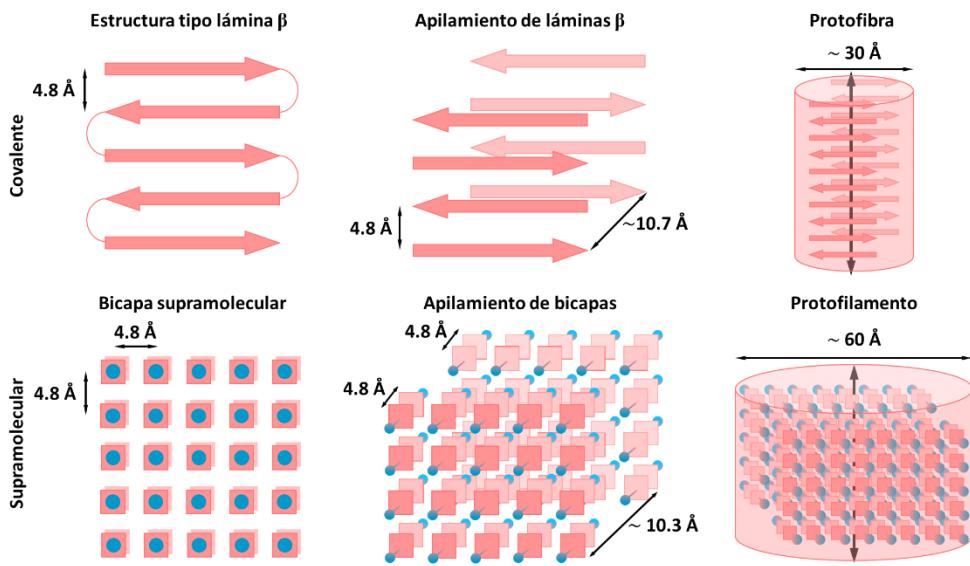


Figura 8. Esquema de las posibles jerarquías estructurales que pueden presentar los polímeros unidos covalentemente y aquellos ensamblados a través de interacciones no covalentes. Para los polímeros unidos covalentemente, los valores de distancias se han extraído de los trabajos publicados por Kirschner et. al.⁴⁷ Balbach et. al.⁴⁸ y Lührs et. al.⁴⁶ Para las distancias características observadas en estructuras supramoleculares de L-Fenilalanina se utilizaron los datos reportados por Adler-Abramovich et. al.⁴⁹ y Zaguri et. al.⁴²

En vistas de todo lo discutido hasta ahora, resulta fundamental comprender el rol del tipo de unión entre monómeros en la estructura obtenida para cada ensamble. Por un lado, las láminas β se desarrollan partiendo de una estructura primaria construida a través de interacciones covalentes que imponen restricciones geométricas, lo que se traduce en tensiones estructurales y una fuerte restricción a la libertad conformacional de sus monómeros. Por otro lado, las interacciones no covalentes que sostienen la arquitectura supramolecular de los filamentos de L-Fenilalanina, como la interacción electroestática entre dos partículas de carga opuesta, brindan una gran versatilidad posicional al ser intrínsecamente isotrópicas y de largo alcance. Adicionalmente, el hecho de que presenten cierto grado de reversibilidad en condiciones normales las vuelve idóneas para construir arquitecturas poliméricas termodinámicamente estables. Por último, el hecho de que no sea necesario amoldarse a las restricciones geométricas que impone el enlace peptídico permite que todos los monómeros que constituyen el plano electroestático expongan sus residuos hacia el exterior. De esta manera se genera una región superficial densamente poblada de residuos por encima y por debajo de este plano.

Considerando que serán estas regiones interplanares las que medien y modulen la interacción entre cadenas para dar lugar a la formación de los filamentos, y que se ha demostrado experimentalmente que estos filamentos se corresponden con estructuras amiloïdes, entender el rol de estos residuos y la naturaleza de esta interacción se vuelve esencial para comprender de manera integral los mecanismos de amilogénesis.

Para poder entender de manera concisa el impacto directo de estos residuos en las propiedades de los ensambles obtenidos, en bibliografía se encuentran reportados estudios sobre las propiedades nanomecánicas de los filamentos amiloïdes obtenidos para L-Fenilalanina.⁴² Se observó que estos presentan valores para el módulo de Young de entre

7 y 32 GPa, lo que representa un aumento de casi tres veces respecto al valor obtenido para fibras amiloïdes generadas a partir de proteínas, sintéticas o funcionales, usualmente asociadas con el fenómeno de amiloidosis.^{50,51} Los autores proponen que esta diferencia en la dureza entre ambos materiales puede estar directamente asociada tanto al empaquetamiento tan eficaz que logran las interacciones supramoleculares entre monómeros de L-Fenilalanina, como con el impacto que tienen las interacciones entre residuos en la estabilización total de la cadena supramolecular. Adicionalmente, se suma el hecho de que no existen en el material monómeros no amilogénicos, como sí puede suceder en cadenas peptídicas compuestas de una gran diversidad de aminoácidos distintos.

Actividad amilogénica de la L-Tirosina

De manera similar a lo observado para L-Fenilalanina, para la L-Tirosina también se encuentran reportadas estructuras supramoleculares capaces de dar lugar a la formación de agregados con carácter amiloïde.⁵² Pero, en este caso, existen resultados que pueden llegar a resultar difíciles de compatibilizar entre sí, si no se tiene en cuenta en qué “instancia” del proceso de autoensamblado se estudió el carácter amiloïde de la estructura obetinida.

Aunque los materiales sólidos obtenidos para la L-Tirosina en distintas condiciones evidencian la formación de fibras longitudinales, estas muestran un carácter cristalino mucho mayor en comparación con las estructuras amiloïdes obtenidas de moléculas similares.⁵² Esta característica se evidencia tanto en la morfología de los sólidos obtenidos, que se caracterizan por poseer una estructura prismática con bordes bien definidos y caras paralelas sin ninguna curvatura, como por la respuesta al estrés mecánico, dado que no parecen presentar la flexibilidad esperada para las estructuras amiloïdes. Estos materiales parecen ser, en realidad, cristales agujiformes. Su relación con las estructuras amiloïdes desarrolladas por metabolitos similares parece residir únicamente en la morfología longitudinal y en el hecho de que sus bloques de construcción sean pequeñas moléculas emparentadas metabólicamente.

En efecto, al estudiar estos agregados supramoleculares por difracción de rayos X de polvos se observa que presentan una cristalinidad comparable con cualquier otro sistema policristalino clásico, caracterizada por la formación de un patrón de difracción con picos finos e intensos y una señal de fase amorfa muy tenue.⁵² Adicionalmente, la morfología de prisma elongado con bordes bien definidos es muy similar a la observada en muestras de cristal único tanto de la misma L-Tirosina como de sus derivados.^{52,53}

Si analizamos en detalle la estructura cristalina reportada para estos agregados no se observa una distribución estructural en planos como la descripta para L-Fenilalanina. Mientras que la estructura de L-Fenilalanina exhibe una clara anisotropía en la distribución de sus interacciones que da lugar a un apilamiento de planos, la estructura de L-Tirosina presenta una distribución mucho más isotrópica de interacciones electroestáticas. Esto inhibe la formación de regiones de mayor y menor intensidad de interacción y, por lo tanto, no da lugar a la obtención de un plano o eje preferencial sobre el cual se puedan asignar las interacciones de mayor intensidad. Como resultado se obtiene una estructura con

interacciones atractivas homogéneamente distribuidas en todo su volumen que da lugar a materiales cristalinos, duros y compactos. (Figura 9)

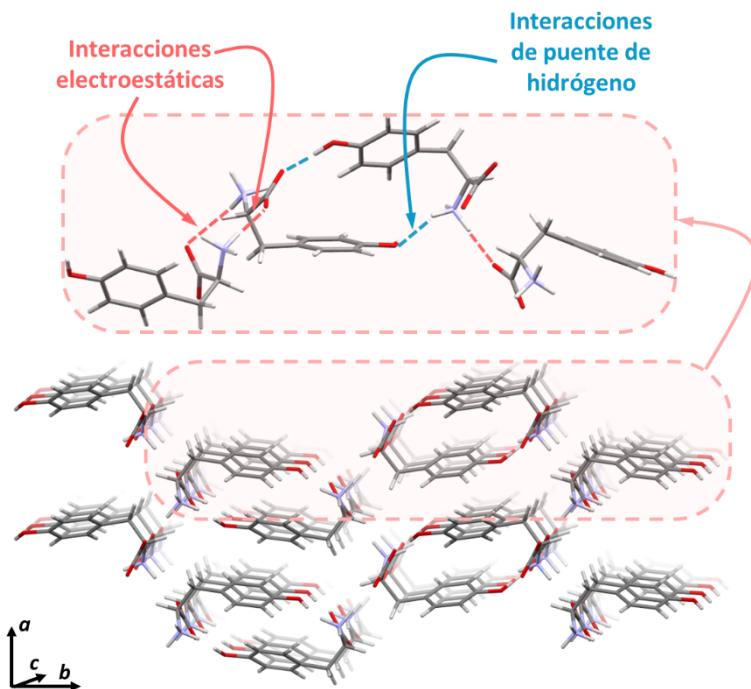


Figura 9. Estructura cristalina reportada para la L-Tirosina en las fibras elongadas.

No obstante, en franca oposición al comportamiento cristalino descripto anteriormente, existen publicaciones que reportan actividad amilogénica para la L-Tirosina en solución.⁵⁴ Este comportamiento es detectado a partir de los experimentos de interacción con Tioflavina T y Rojo Congo, aunque este último fue realizado en solución y la birrefringencia no fue analizada. Más allá de que estos resultados, y en específico bajo estas condiciones, podrían no ser concluyentes para reportar de forma rigurosa la formación de una estructura amiloide, es ciertamente interesante el “efecto de semilla” o “iniciador”, que parece presentar la L-Tirosina al ser puesta en contacto con proteínas no amilogénicas.⁵⁴ Curiosamente, el modelo propuesto por los autores para el ensamblado en solución de la L-Tirosina en este trabajo difiere de manera considerable con todas las estructuras amiloides reportadas hasta la fecha, presentando la sorprendente característica de carecer de la estructura laminar tipo bicapa β . En cambio, los autores proponen una estructura esferiforme construida a partir de una combinación de interacciones de apilamiento aromático y electroestáticas, que parece asemejarse a la estructura cristalina reportada para los materiales agujiformes.

Resulta fundamental comprender que los resultados reportados por Ménard-Moyon y por Anand no son mutuamente excluyentes entre sí, si se considera que cada uno de ellos pueden analizarse como periodos distintos de un mismo proceso. En este sentido, se podría pensar al “agregado esferiforme amilogénico en solución” como la etapa inicial de nucleación y crecimiento, que luego da lugar a la formación de los “prismas elongados”, que se observan macroscópicamente, y que presentan las propiedades cristalinas.

Esta interpretación es consistente con lo observado para las fibras amiloides de varias proteínas amilogénicas, para las cuales se observó que una fragmentación en trozos

más pequeños aumentaba la citotoxicidad.⁵⁵ A modo de ejemplo, para el caso específico el péptido A β , no solamente se ha reportado un aumento en la citotoxicidad al fragmentarla o al estudiar las primeros estadios de la formación del aglomerado⁵⁶ sino, también, se ha encontrado que no parece haber relación causal entre el número de placas amiloides formadas en el cerebro y el deterioro cognitivo de los pacientes. Parecería que los estadios más tardíos del fenómeno de autoensamblado en estos sistemas no revisten citotoxicidad alguna.^{57,58}

Si se compara el proceso de autoensamblado de L-Tirosina, considerando una primera etapa de formación de agregados amilogénicos⁵⁴ y una etapa posterior de maduración y estructuración para dar lugar a la formación de un material cristalino,⁵² con los estudios realizados sobre L-Fenilalanina y las posibles etapas de formación de sus ensambles, podemos observar que esta última retiene su carácter amiloide desde los orígenes del ensamble⁵⁹ hasta la formación de los filamentos.⁴² Al contrario, la L-Tirosina parece sufrir una pérdida del carácter amiloide en pos de la formación de una estructura cristalina. El “exceso de orden” y una posición espacial rigurosa en los componentes de un ensamble molecular parece ir en contra de la obtención de agregados con fuerte carácter amiloide.

A la luz de estos resultados, se hace evidente la relevancia de estudiar en detalle, de manera exhaustiva y con rigurosidad, la química supramolecular tanto de la L-Tirosina y la L-Fenilalanina, como de sus derivados. La relación entre la estructura de los residuos aminoacídicos y su química supramolecular ha mostrado tener un impacto directo en los procesos de selección que terminan discriminando entre el desarrollo de estructuras amiloides, o la conformación de materiales cristalinos. Finalmente, también es necesario resaltar las propiedades citotóxicas asociadas a estos ensambles supramoleculares y su vínculo, en última instancia, con el desarrollo del grupo de patologías ya mencionadas.

En este sentido, los compuestos basados en L-Fenilalanina, L-Tirosina y aldehídos de relevancia biológica sintetizados en este trabajo de tesis, representan un excelente grupo de moléculas modelo para estudiar el rol de los nuevos grupos funcionales adicionados al esqueleto del aminoácido, en la modulación de la interacción entre los planos electrostáticos anteriormente mencionados, y su impacto en las propiedades de autoensamblado.

Autoensamblado de derivados de L-Fenilalanina y la L-Tirosina

Bases para una relación entre la estructura molecular y la arquitectura supramolecular

En base a las conclusiones que se extraen de analizar la estructura amiloide de los filamentos de L-Fenilalanina, se destaca nuevamente la importancia de que, para todos los derivados sintetizados en la tesis, el estado de carga dipolar o switeriónico resultó ser muy estable. Esto implica la posibilidad de que se desarrolle de forma favorable el “cierre electroestático” característico de la lámina β supramolecular (Figura 5).

Cabe discutir brevemente ciertos aspectos sobre los aldehídos empleados para la derivatización de los aminoácidos, que cobran especial relevancia en este capítulo. Todos ellos presentan un fragmento estructural aromático que podrá favorecer la interacción dispersiva entre estructuras supramoleculares, como las bicapas β , “imitando” de alguna manera el rol del residuo aromático de la L-Fenilalanina. La comparación entre los derivados de benzaldehído y el de naftaldehído permitirá, por ejemplo, evaluar los efectos estéricos del residuo. Por otro lado, los fragmentos que incluyen hetero átomos, como el piperonal, permiten estudiar el impacto que pudiera tener la formación de otro tipo de interacciones intermoleculares adicionales a las ya identificadas como esenciales para la formación de estructuras amiloïdes.

Adicionalmente, algunos de ellos son comúnmente utilizados como agentes saborizantes en la industria alimenticia. El incremento en los últimos años del consumo de alimentos procesados ha generado un enorme aumento en la utilización de este tipo de agentes para simular aromas y sabores de manera artificial. La autoridad europea de seguridad alimenticia (EFSA) engloba a los alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres, y acetales bencílicos en el grupo químico 23 de los agentes saborizantes y los considera seguros de utilizar aunque recomienda valores de ingesta diaria específicos según la subcategoría estructural de cada uno de ellos.⁶⁰ Sin embargo, la aparición de nuevas tecnologías de fabricación y conservación de alimentos, así como la utilización de estas sustancias en productos consumibles modernos que hasta ahora no habían sido estudiados, como los cigarrillos electrónicos, ha vuelto a ponerlas en el foco de las investigaciones sobre toxicidad y posibles reacciones adversas para la salud.⁶¹ Este es uno de los principales motivos por los cuales resulta relevante estudiar los derivados obtenidos a partir de este tipo de aldehídos con aminoácidos frecuentemente encontrados en alimentos y bebidas.

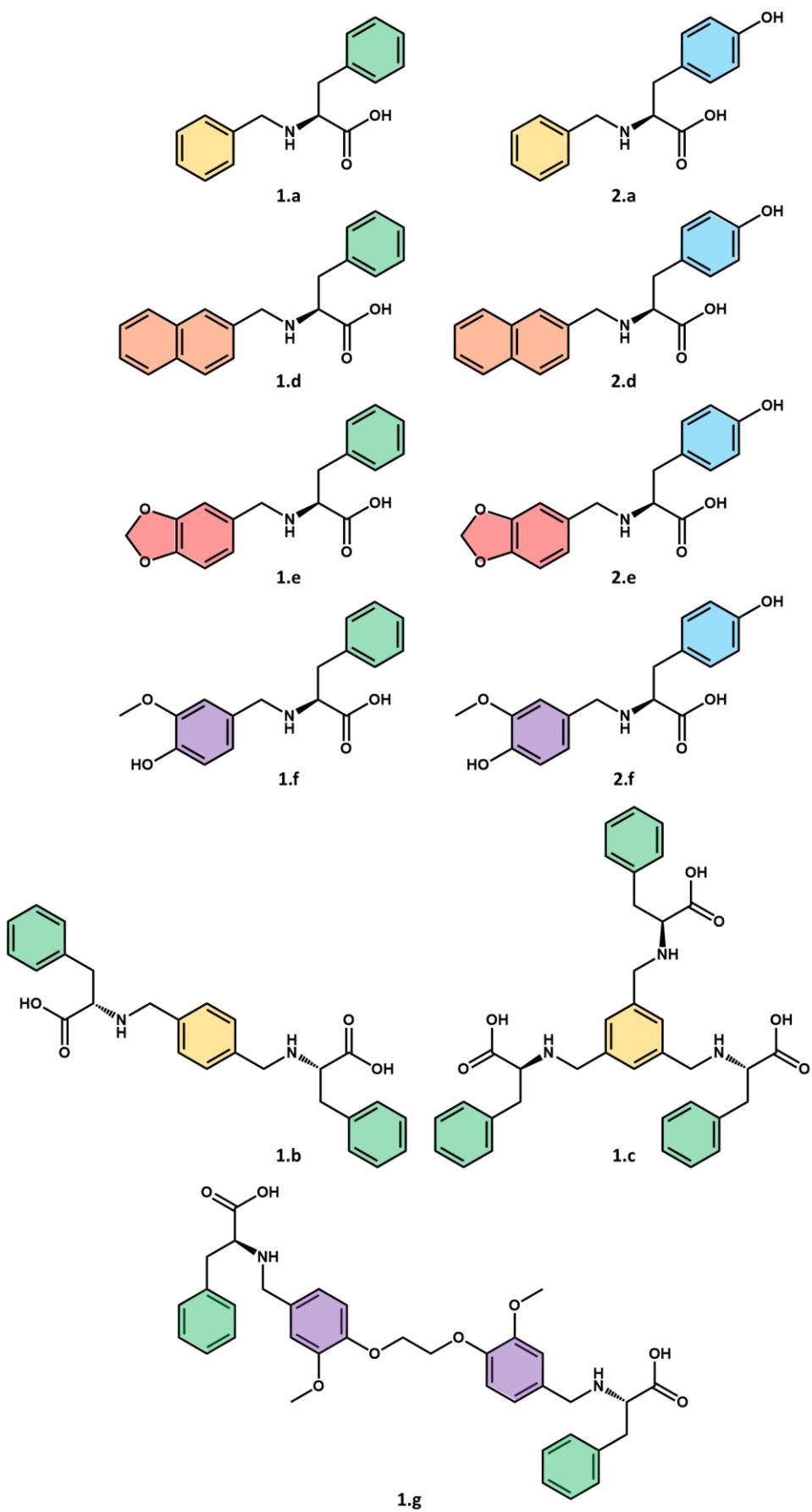


Figura 10. Estructuras moleculares de las sustancias utilizadas durante este capítulo

Para la discusión de los próximos apartados se emplearán los datos estructurales determinados por difracción de rayos X de monocrystal presentados en el capítulo III, es por eso que no se incluirán los compuestos **1.b**, **1.c**, y **1.g**. Para realizar el análisis de las estructuras supramoleculares en estado sólido y compararlas con lo observado para los compuestos amilogénicos es conveniente hacer una subdivisión en dos categorías:

- 1) aquellos cuya estructura supramolecular se asemeja a la distribución en capas apiladas como la observada para la L-Fenilalanina (Figura 6)
- 2) aquellas cuya distribución de interacciones intermoleculares presenta un grado de entrecruzamiento más cercano al observado para la estructura supramolecular presente en los agregados de L-Tirosina (Figura 9).

Es importante notar que, como se discutió en capítulos anteriores, el hecho de que un compuesto sea sintetizado a partir de un dado aminoácido no implica que este herede una química supramolecular similar, ya que en esta impactan tanto el aminoácido como el aldehído empleado, así como la química configuracional que se puede desarrollar por la totalidad de la estructura.

Convergencia supramolecular y arreglos apilados de planos electroestáticos

Los compuestos que se encuentran en el grupo que se discute en este apartado son los derivados de L-Fenilalanina con benzaldehído, 2-naftaledhído y piperonal, **1.a**, **1.d** y **1.e**, respectivamente. Para **1.a** y **1.d** se obtuvieron monocrystals de los respectivos iones dipolares. Adicionalmente, para **1.d** también se obtuvo la sal de cloruro que co-cristaliza con una molécula de ácido acético. Para **1.e** sólo se cuenta con los datos cristalográficos corresponden a su sal de cloruro. Para estos dos últimos, el estado de carga de los derivados es catiónico. Cabe recordar que, debido a las condiciones de cristalización empleadas, algunos de ellos corresponden a los racematos, y no a las especies enantioméricamente puras. No obstante, del análisis de todas estas estructuras cristalinas se desprende que presentan de forma común el mismo esquema de capas, compuesto por regiones electroestáticas que se alternan con las zonas donde la interacción no covalente principal es de carácter dispersivo o dipolar (Figura 11). Cabe aclarar que no se incluye en este capítulo la estructura obtenida para la sal de sodio del compuesto **1.d** debido a que la especie adquiere una conformación plegada y, además, no presenta el arreglo en planos electroestáticos descripto para todas las otras estructuras incluidas en el análisis.

Todas estas estructuras presentan sus bloques de construcción en conformación desplegada, orientados longitudinalmente y paralelos entre sí. Este tipo de empaquetamiento, que recuerda a la fase esmética de un cristal líquido, favorece la formación de un sistema de interacciones entre el grupo amino protonado, el carboxilato o ácido carboxílico, y el cloruro, en aquellos casos donde está presente, equivalente al cierre electroestático reportado para L-Fenilalanina. Adicionalmente, esta orientación preferencial facilita el acomodamiento de los residuos aromáticos hacia el exterior de esta capa electroestática. En consecuencia, se optimiza la distancia y orientación entre los residuos de forma tal de maximizar el carácter atractivo de las interacciones de apilamiento aromático y dipolares que pueden desarrollar.

Es particularmente relevante notar cómo esta configuración estructural en capas que alternan interacciones electroestáticas y dispersivas se conserva aún para la estructura obtenida para ambas estructuras del compuesto **1.d**, donde la derivatización incorpora un fragmento de un volumen considerable (Figura 11, b). Esto podría estar sugiriendo, además, que la presencia del anión no es necesaria para el desarrollo o la estabilización de la región electroestática sino, más bien, que esta región permite acomodar en su interior iones sin distorsionar de manera apreciable la lámina supramolecular formada. La capacidad de desarrollar una estructura laminar configurada en capas, similar a la observada para los filamentos amiloides de L-Fenilalanina, se vuelve particularmente atractiva al pensar cómo podría ser el comportamiento colectivo en condiciones fisiológicas de estas moléculas, donde la interacción con distintos tipos de iones se vuelve mucho más factible y azarosa.

En concordancia con la hipótesis de que estas estructuras presentan un grado de versatilidad que les permite tolerar la presencia de estructuras exógenas sin alterar de manera apreciable la configuración en láminas, podemos observar que sucede con la sal de **1.d**, que co-cristaliza con ácido acético en su estructura. Las moléculas de ácido acético se alojan en la región del espacio “asignada” para las interacciones dispersivas o dipolares sin intervenir de forma directa tanto en el desarrollo de la capa electroestática como en la correcta conformación de la estructura laminar en general. Este resultado es tan llamativo como relevante, dado que la presencia del grupo ácido podría haber interrumpido la formación de la capa electrostática a través del desarrollo de interacciones de puente de hidrógeno con el grupo amino. Esto podría estar demostrando indirectamente la gran estabilidad de la interacción entre los derivados de aminoácido.

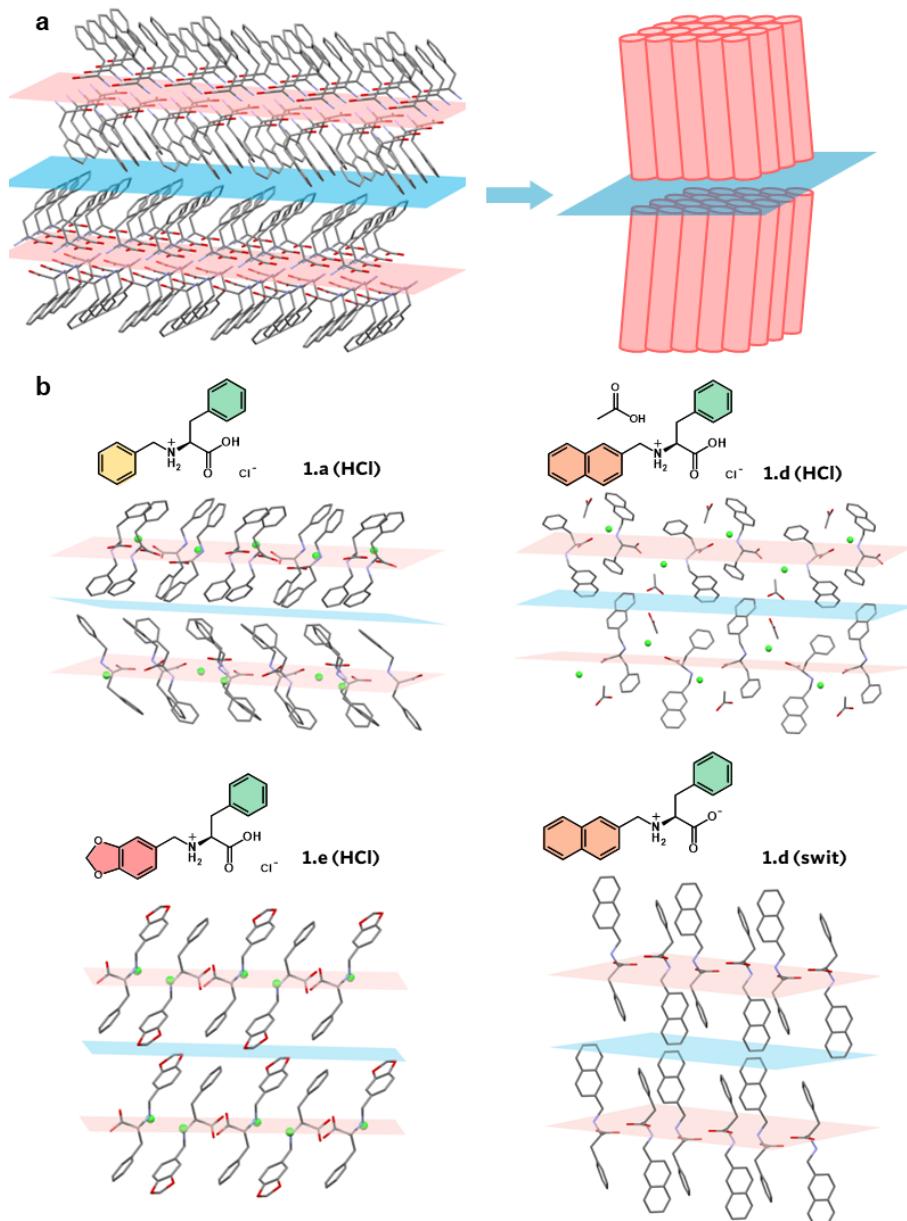


Figura 11. (a) Comparación entre la estructura cristalina observada para L-Fenilalanina en las estructuras amiloideas y la orientación esperada para la fase esmética en los cristales líquidos. (b) estructuras cristalinas de los compuestos derivados de L-Fenilalanina. En rosado se resaltan las regiones donde preponderan las interacciones electroestáticas y en celeste las regiones con interacciones dispersivas y/o dipolares.

Divergencia Supramolecular y el desarrollo de redes extendidas de interacción

Al utilizar la misma representación en planos electrostáticos o de interacciones no covalentes fuertes, encontramos que todas las estructuras cristalográficas de los derivados de la L-Tirosina y el compuesto **1.f** (derivado de la L-Fenilalanina con vainillina) no presentan la configuración en capas observada para los análogos de L-Fenilalanina que se discutieron en el apartado anterior (Figura 12). Las moléculas que se encuentran en este grupo son los derivados de L-Tirosina con benzaldehído, piperonal y vainillina, **2.a**, **2.e** y **2.f**,

respectivamente. Adicionalmente, como se mencionó, el único derivado de la L-Fenilalanina que pertenece a este subconjunto es aquel derivatizado con vainillina, **1.f**. Para todas estas estructuras se pudieron cristalizar los correspondientes sólidos en estado switerión. Para el compuesto **2.a** también se obtuvo la sal de cloruro. Todos estos derivados cristalizaron en su forma enantioméricamente pura.

Del análisis supramolecular se desprende que estos derivados presentan una distribución isotrópica de interacciones electroestáticas y puentes de hidrógeno que da lugar a la formación de un conjunto de planos entrecruzados. El carácter divergente de estos bloques de construcción se ve reflejado en la isotropía que se observa para la distribución tridimensional de interacciones. No se percibe a simple vista un eje o plano preferencial para el cual no esté presente un conjunto de interacciones atractivas intensas o de largo alcance. Se destaca particularmente la estructura del derivado **2.f**. Este presenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno tanto desde la región aminoacídica como desde la heredada del aldehído. Esto le brinda la capacidad de desarrollar interacciones intermoleculares desde ambas regiones de la molécula dando lugar a la constitución de una red extremadamente interconectada y fuertemente asistida por la versatilidad configuracional.

Como se discutió en el capítulo III, tanto la L-Tirosina como los derivados **2.a** y **2.e** forman dímeros supramoleculares utilizando el grupo hidroxilo aminoacídico junto con los grupos amino y ácido carboxílico. Queda así constituido un dímero que pierde parte de su capacidad para formar interacciones con su entorno y altera su factor de forma, semejándose así a un bloque de construcción más isotrópico y parcialmente convergente. La formación de este dímero permite que se satisfagan la mayoría de los puntos de unión molecular sin “depender” de un mayor número de moléculas. Sin embargo, el switerón de **2.a** y su sal requieren ser analizados de una manera particular, la cual se discutirá a continuación.

Por otro lado, el compuesto **2.f**, por el contrario, no genera este tipo de entidades discretas. Debido a la presencia de grupos hidroxilos tanto en el residuo aminoacídico como en la región heredada de la vainillina, sería difícil de satisfacer por completo los sitios de unión empleando una configuración dimérica similar, salvo que esta adquiera una configuración extremadamente tensionada que permitiera compensar el impedimento estérico que impone la presencia del grupo metóxido.

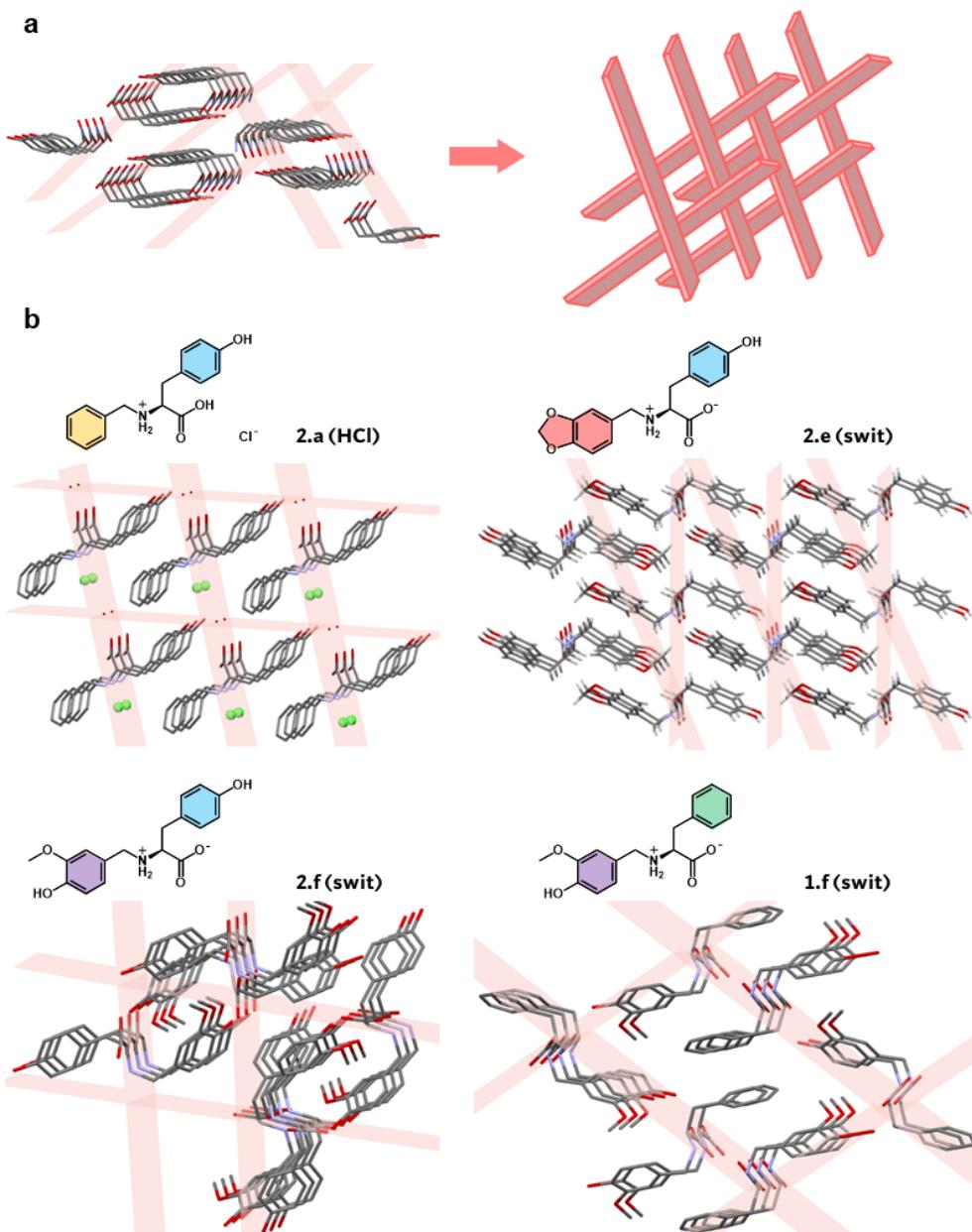


Figura 12. Estructura cristalina reportada para las estructuras amiloïdes de L-Tirosina y las estructuras cristalinas de los derivados de L-Tirosina sintetizados durante este trabajo de tesis, salvo el switerión del compuesto **2.a** que será discutido más adelante. Se incluye también la estructura cristalina del derivado **1.f** de la L-Fenilalanina debido a su semejanza estructural.

El compuesto **2.a**: Un caso de respuesta híbrida y de selección por entorno

Un caso particular que ilustra la diversidad de estructuras que pueden ser desarrolladas por estas moléculas se observa al estudiar el caso del compuesto **2.a** (Figura 13). Mientras que la estructura desarrollada por su switerión es capaz de conformar dímeros supramoleculares estables que se ordenan de forma tal de ubicar sus anillos aromáticos conformando un plano de interacción débil que se asemeja parcialmente a lo observado para las estructuras con carácter amiloide, su sal de cloruro altera esta estructura para dar lugar a la formación de planos electroestáticos entrecruzados muy similares a los observados para la L-Tirosina y sus derivados. Nuevamente, queda

demonstrado que no es posible hacer una extrapolación directa del carácter potencialmente amilogénico o cristalino de un compuesto en términos de sus precursores moleculares, ya que este depende en gran medida de factores experimentales, como el estado de carga, la naturaleza del contríon y el solvente en el que se lleva a cabo el experimento.

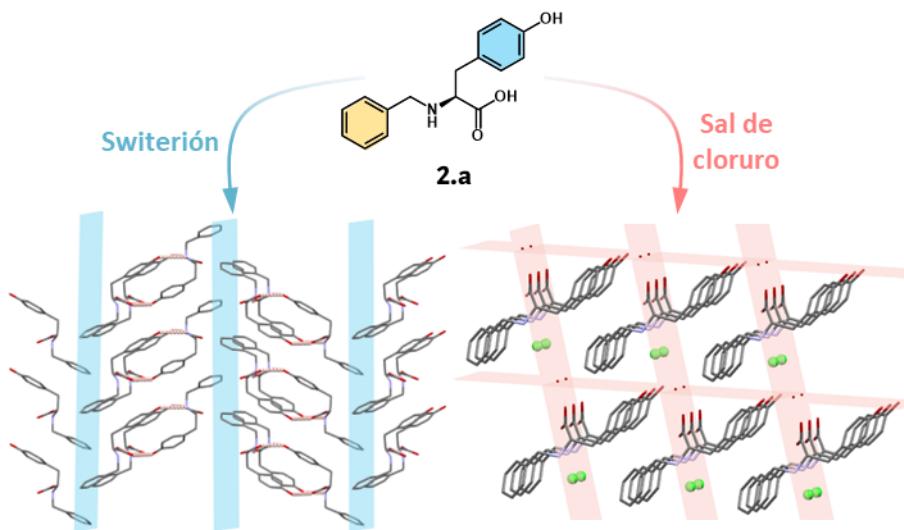


Figura 13. Estructuras cristalinas obtenidas para el compuesto **2.a** en estado switteriónico (izquierda) y para su sal de cloruro (derecha). En celeste se detallan los planos de interacción débil y en rosado los planos de interacción electroestática o interacción no covalente fuerte.

El factor de forma y la convergencia como predictores de arquitecturas supramoleculares

Al igual que en los capítulos anteriores, para realizar un análisis detallado de las diferencias y similitudes entre las estructuras cristalinas de los aminoácidos y sus derivados, es recomendable emplear las dos herramientas de análisis estructural que ya han sido introducidas en este trabajo de tesis: el factor de forma y la convergencia o divergencia de sus interacciones. Estos dos parámetros nos permiten describir de manera simple pero integral la totalidad de las interacciones que pueden desarrollarse en un sistema; tanto aquellas que ocurren de manera “explícita” por la presencia de grupos funcionales, como aquellas inherentes a su forma y tamaño.

Primero, es necesario notar que el concepto de divergencia o convergencia en moléculas polifuncionales tiene que ser definido para una configuración dada. A modo de ejemplo, podemos ver qué sucede al intentar estudiar la convergencia o divergencia en las interacciones de **2.f** en estado switteriónico (Figura 14).

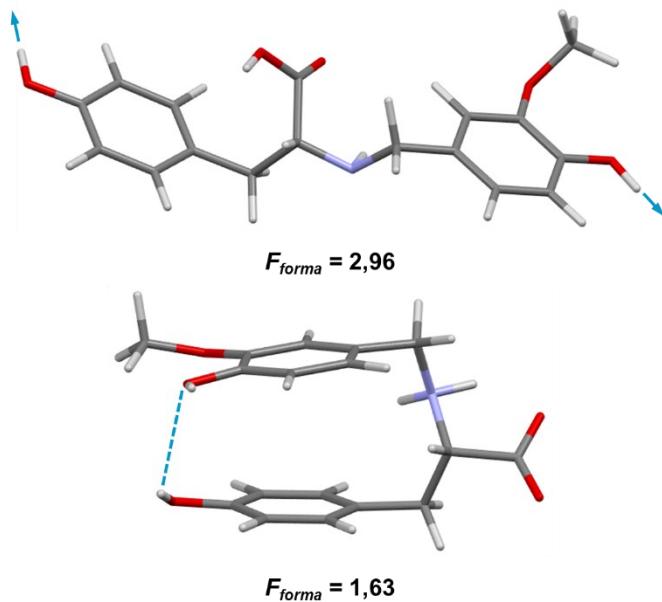


Figura 14. Estructura desplegada y plegada del compuesto **2.f**

Esta molécula presenta, al menos, dos configuraciones posibles: una desplegada, en la que el factor de forma es máximo, y una plegada, para la cual el factor de forma es mínimo. La especie en la configuración desplegada puede desarrollar interacciones puentes de hidrógeno desde sus dos extremos hacia el entorno, maximizando de esta manera su carácter divergente. Por el contrario, si la misma se encuentra plegada, se favorece la formación de una interacción intramolecular por puente de hidrógeno, lo cual inhibe su capacidad de interactuar con otras moléculas y le brinda un carácter convergente. Este caso permite ejemplificar cómo una misma molécula puede alterar su capacidad de interactuar con su entorno simplemente adquiriendo una configuración distinta. Este comportamiento es análogo a lo que sucede durante la dimerización supramolecular de la L-Tirosina y sus derivados presentada en el Capítulo III, los cuales veían disminuido su carácter divergente al establecer dímeros estables en solución.

Si analizamos todas las estructuras cristalinas obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis podemos ver que todos los bloques de construcción tanto sean iones dipolares o cationes, se encuentran desplegados, o parcialmente desplegados. Pero, en la mayoría de ellos, se observa que cada bloque se encuentra conformando un dímero supramolecular que se podría identificar como la unidad de construcción de los arreglos extendidos. En ambos casos esta configuración maximiza su factor de forma. *A priori*, esto implica que ninguno está formando interacciones intramoleculares y, por lo tanto, toda su química supramolecular está puesta al servicio de la interacción con su entorno.

Considerando lo discutido anteriormente respecto a la formación de bicapas β en las estructuras amiloides de L-Fenilalanina y su semejanza con las láminas β convencionales (Figura 8), podemos evaluar cuál es el factor de forma de una unidad de L-Fenilalanina aislada, y el de un par de moléculas alineadas y unidas a través de interacciones electroestáticas como se encuentran en la estructura cristalina (Figura 15).

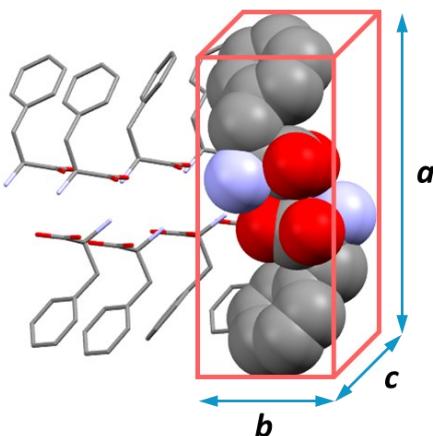


Figura 15. Cálculo del factor de forma para un par moléculas alineadas de L-Fenilalanina presentes en la estructura reportada para los ensambles con carácter amiloide.

Para una molécula única de L-Fenilalanina tenemos un factor de forma de 1,71 y para el caso de dos L-Fenilalaninas alineadas, este es de 2,28. Podemos entender a este ensamble dimérico longitudinal como la menor entidad discreta presente en las bicapas β . Si pensáramos en la bicapa supramolecular como un arreglo esméctico de cilindros (Figura 11, a) entonces este dímero de L-Fenilalaninas sería la unidad asimétrica que se repite en el espacio.

Empleando la misma metodología podemos calcular todos los factores de forma de las moléculas aisladas de los derivados de L-Fenilalanina para los cuales se obtuvo una estructura cristalina (Tabla 7).

Tabla 7. Factores de forma calculados para la L-Fenilalanina y sus derivados en sus respectivas estructuras cristalinas. Para los compuestos que se pudo determinar un solo tipo de estructura no se incluye aclaración del estado de carga ya que la misma corresponde a la determinada experimentalmente por DRX de monocristal.

Molécula	Factor de Forma	
	Monómero	Dímero
1	1,71	2,28
1.a	2,47	-
1.d (HCl)	2,36	-
1.d (swit)	3,23	-
1.e	2,71	-
1.f	2,35	-

Notablemente, todos los compuestos presentan valores de factor de forma semejantes al calculado para el dímero de L-Fenilalanina y no al del monómero. Resalta el factor de forma obtenido para el estado switeriónico de **1.d** debido a que es el mayor de todos los calculados. Este resultado podría considerarse como indicativo de que este derivado podría estar afectado en mayor medida por la acción de las fuerzas entrópicas que asistan al empaquetamiento cristalino. A su vez, es probable que se establezca una mayor imposición de orden en la estructura, adquiriendo un esquema muy similar al esperado para estructuras amiloides, más allá de la naturaleza de sus interacciones.

Considerando que todos estos bloques de construcción son intrínsecamente convergentes, de igual manera que el dímero de L-Fenilalanina, podemos entender que termina siendo el factor de forma, en última instancia, la variable que determina la capacidad amilogénica. Esto podría estar dando un indicio claro de cómo predecir la capacidad amilogénica de una sustancia y por lo tanto, brinda una herramienta clave para el diseño racional de pequeñas moléculas cuando el objetivo es desarrollar este tipo de comportamiento.

Por otro lado, al analizar la estructura de la L-Tirosina y sus derivados **2.a** y **2.e**, ambos en estado switerón, debemos tener en consideración la formación de los dímeros supramoleculares estables discutidos anteriormente. En este caso, el factor de forma ya no es el único parámetro estructural relevante a la hora de discernir entre comportamientos, dado que la capacidad divergente de los compuestos también se ve afectada por la formación de estos ensambles supramoleculares. Para los términos de este análisis, los dímeros supramoleculares de L-Tirosina y sus derivados serán considerados todos convergentes. Esto es debido a que su química supramolecular es gobernada por el desarrollo de esta entidad dimérica. No obstante, esto no ocurre para el compuesto **2.a** en su sal de cloruro y para **2.f** en su estado switerónico.

Por un lado, la sal de cloruro del compuesto **2.a** no constituye un dímero debido a que toda la química supramolecular es puesta en juego para desarrollar interacciones con el solvente y el contraíon. Esto conlleva a que sea imposible distinguir un dímero supramolecular en el que no estén involucrados al menos una molécula de cada una de estas sustancias. Por otro lado, el compuesto **2.f** ha mostrado conservar la capacidad de desarrollar redes extendidas aún en la estructura cristalina, lo cual impidió que fuera posible delimitar la existencia de un dímero con claridad. En la Tabla 8 se informan los factores de forma calculados para estos compuestos.

Tabla 8. Factores de forma calculados para la L-Tirosina y sus derivados en sus respectivas estructuras cristalinas. Para los compuestos que se pudo determinar un solo tipo de estructura no se incluye aclaración del estado de carga, ya que la misma corresponde a la determinada experimentalmente por DRX de monocrystal.

Molécula	Factor de Forma	
	Monómero	Dímero
2	1,61	1,96
2.a (HCl)	2,87	-
2.a (swit)	2,27	2,98
2.e	2,42	2,99
2.f	2,07	-

En líneas generales podemos observar una diversidad de factores de forma que pone de manifiesto la gran versatilidad conformacional de los compuestos derivados de L-Tirosina. Si comparamos estos valores con el de referencia del dímero de la L-Fenilalanina (2,28), podemos observar que no es posible extraer una tendencia clara, dado que hay monómeros con valores superiores, como el compuesto **2.a** y **2.e**, y hay dímeros con magnitudes menores del factor de forma, como el de la L-Tirosina.

Esta carencia de una tendencia clara ilustra las restricciones que tiene el factor de forma por sí mismo para intentar predecir el potencial amilogénico de una sustancia. Si caemos en la tentación de creer que, a mayor factor de forma, mayor será el efecto de las fuerzas entrópicas y el carácter esmético del arreglo generado, estamos descartando el rol determinante que cumple la química supramolecular en la selección de la estructura desarrollada. Más allá de que el factor de forma favorezca cierto tipo de empaquetamiento por encima de otros, es en última instancia el aporte conjunto del aspecto morfológico de una partícula y la capacidad de formar interacciones no covalentes fuertes, lo que parece determinar el comportamiento final de una dada sustancia.

Texturas de cristal líquido

Como se presentó en la introducción, el hecho de que se pueda encontrar una relación tan estrecha entre las fases esméticas, las estructuras amiloides, y las estructuras cristalinas de todos estos compuestos, nos permite asumir que debería de existir al menos un set de condiciones experimentales en el que estos presenten algunas de las propiedades características de los cristales líquidos. Podríamos pensar que las condiciones más propicias para que esto suceda son aquellas en las que las concentraciones sean suficientes para dar lugar al desarrollo de una interacción colectiva en todo el seno del líquido. O, al menos, que sea suficiente como para permitir que se desarrollen agregados supramoleculares cuyas propiedades puedan ser apreciables macroscópicamente.

Al estudiar la extensión del orden molecular en este tipo de sistemas podemos pensar las estructuras amiloides como “pequeñas regiones ordenadas embebidas en un entorno desordenado y fluctuante”. Sólo cuando la concentración sea suficiente como para permitir que se agreguen varias de estas estructuras, deberíamos ser capaces de empezar a ver alteraciones en las propiedades macroscópicas del sistema. El resultado, en este caso, debería ser equivalente, o al menos comparable, con lo que se observa en la formación de placas seniles que presentan un orden elevado, pero de corto alcance (Figura 3).

Sin embargo, poder observar la formación de regiones puntuales de orden local, o texturas extendidas con orden orientacional, suele ser desafiante debido a que puede implicar la utilización de concentraciones elevadas o altas temperaturas.⁶² Por este motivo, es posible entender los pocos ejemplos reportados a la fecha de manifestaciones del comportamiento tipo cristal líquido de las estructuras amiloides en condiciones fisiológicas, las cuales suelen estar muy lejos de las concentraciones y temperaturas asociadas a estos procesos.⁶³ Otro punto a favor de esta hipótesis es el hecho de que en la bibliografía actual tampoco hay reportados casos de cristales líquidos cuyos componentes principales sean L-Fenilalanina o L-Tirosina, aunque sí existen algunos reportes de cristales líquidos iónicos de sus derivados.^{63,64}

En nuestro caso pudimos observar y registrar exitosamente una textura asociada a una fase de cristal líquido para la L-Fenilalanina para distintas concentraciones utilizando dimetilsulfóxido como solvente (Figura 16). Este resultado es muy relevante, dado que ilustra lo discutido anteriormente: bajo ciertas condiciones se pudo desarrollar una textura de cristal líquido para una especie con propiedades amilogénicas.

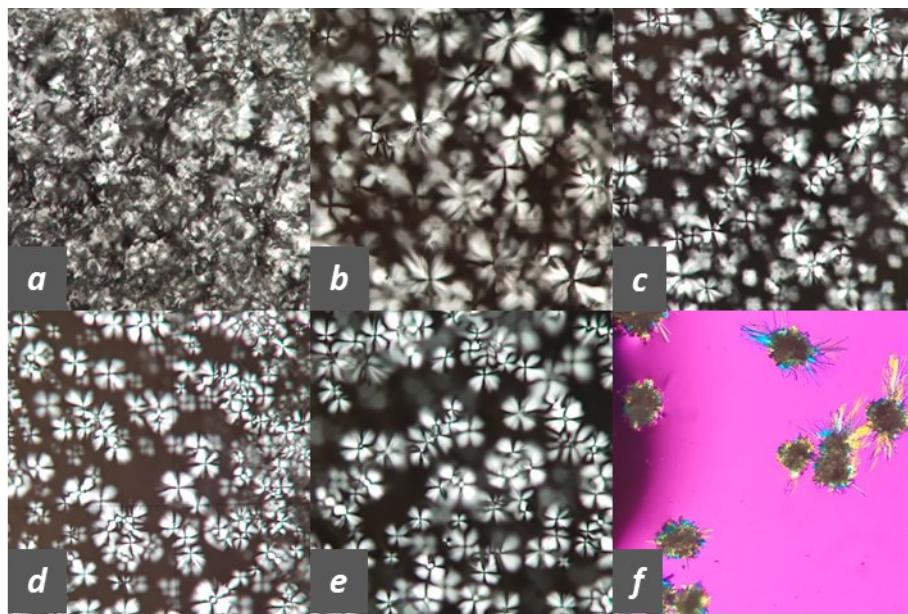


Figura 16. Microscopía óptica de luz polarizada de una solución de L-Fenilalanina en DMSO calentada a 180°C y dejada enfriar a temperatura ambiente: (a) 100 mM, (b) 90 mM, (c) 81 mM, (d) 73 mM, (e) 53 mM y material cristalino obtenido a partir de la solución 100 mM al cabo de un tiempo.

En las imágenes se puede observar que coexisten regiones isotrópicas (regiones donde la luz polarizada es transmitida sin alteraciones, zonas negras o rosas) y regiones de birrefringencia aisladas y bien determinadas. Las texturas observadas no conforman un “césped” de inhomogeneidades como se suele observar en las texturas de Schlieren, sino que dan lugar a la constitución de disclinaciones puntuales y bien definidas. Esto es consistente con la formación de regiones puntuales de agregación supramolecular donde se han concentrado las moléculas de L-Fenilalanina.

Al cabo de un tiempo todo el sistema muta y adquiere aspecto cristalino, perdiéndose por completo cualquier resto de la textura observada inicialmente. Este resultado podría estar indicando que la fase cristal líquido actúa como un estado metaestable entre la solución homogénea a altas temperaturas y la descomposición en dos fases a temperatura ambiente.

El hecho de que esta fase se haya observado para una solución en dimetilsulfóxido tampoco parece ser un hecho casual. Este solvente presenta un elevado punto de ebullición, lo cual facilita acceder a solubilidades mucho mayores que luego, al enfriar, dan lugar a la formación de fases sólidas con una gran cantidad de material expulsado del seno de la solución. Esto podría facilitar que se produzca un amontonamiento molecular, el cual propicia la aparición de fases cristal líquido. Al mismo tiempo, el momento dipolar permanente y la constante dieléctrica de este solvente lo vuelven ideal para estabilizar moléculas cargadas, aspecto particularmente relevante a la hora de estudiar los procesos de solubilización y precipitación de switeriones.⁶⁵

Extensión a otros derivados de L-Fenilalanina y L-Tirosina

Debido a que muchos de estos materiales se autoensamblan asistidos parcialmente por el efecto de las fuerzas entrópicas, un experimento interesante consiste en estudiar qué sucede cuando distintos compuestos ocupan una misma fracción del volumen del sistema. El fundamento de la propuesta se basa en el hecho de que las fuerzas entrópicas surgen principalmente del espacio libre disponible para el solvente.⁶⁶ A partir de esto se puede estudiar el rol de las interacciones no covalentes y la forma del compuesto sin introducir sesgos artificiales debido a los distintos volúmenes que ocupa cada sustancia. La propuesta es respetar la relación de volúmenes ocupados de forma tal de garantizar que el efecto ordenador de las fuerzas entrópicas sea comparable en ambos sistemas.

Si aproximamos el volumen molecular por el espacio que queda determinado por el paralelepípedo que definimos para el cálculo del factor de forma (Figura 15), obtenemos un valor de volumen ocupado por un dímero de L-Fenilalanina de 989,22 Å³. Esto nos permite calcular, para una concentración de 90mM de L-Fenilalanina, un porcentaje en volumen de 2,90%. Utilizando este porcentaje y la misma metodología de cálculo para el volumen molecular podríamos determinar que concentración molar de **1.a** ocuparía el mismo porcentaje en volumen. A esta concentración la denominamos **concentración isocórica**. Esto da como resultado una concentración de 70.7 mM para **1.a**.

Para complementar los resultados obtenidos para L-Fenilalanina, como prueba de concepto se ensayó la capacidad de formar cristales líquidos en DMSO de la L-Tirosina (**2**) empleando una solución 90 mM y de la molécula **1.a**, tanto usando una concentración de 90 mM como 71mM (Figura 17).

Para el compuesto **1.a**, ambas concentraciones dieron lugar a la obtención de materiales con un aspecto parcialmente cristalino, pero con un tamaño muy distinto en ambos casos. Para el sistema de mayor concentración se obtuvo una gran cantidad de partículas de menor tamaño, mientras que para el sistema de menor concentración se obtuvieron un menor número de partículas, pero de tamaños mayores. Las partículas presentes en ambos sistemas presentaron una distribución concéntrica de su birrefringencia dividida en cuatro cuadrantes alternados. Para L-Tirosina, por el contrario, se observó la formación cristales únicos dispersos.

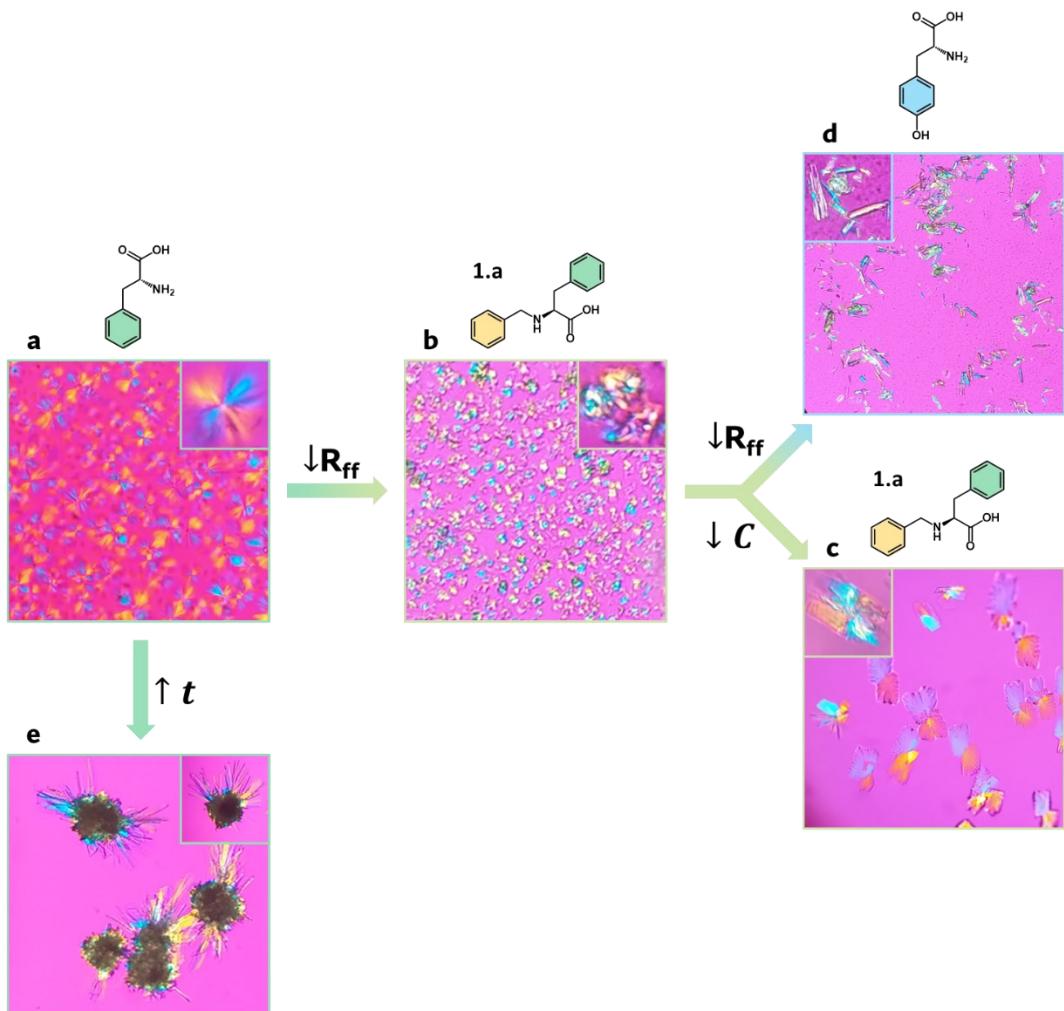


Figura 17. Texturas obtenidas para soluciones en DMSO a temperatura ambiente luego de calentamiento hasta disolución total de: L-Fenilalanina 90mM (a), **1.a** 90mM (b), **1.a** 71mM (c), L-Tirosina 90 mM (d). En todas las imágenes se presenta un recuadro donde se muestran detalles de las partículas generadas. Para el caso de la L-Fenilalanina se muestra también la morfología adquirida por las partículas al cabo de 90 minutos (e). Sobre las flechas se detallan los parámetros que se alteran entre cada experimento, los cuales se discuten más adelante; t = tiempo, C = concentración, R_{ff} = radio aparente.

Los resultados obtenidos para estas sustancias se pueden interpretar utilizando nuevamente el marco de la teoría de fluctuaciones de concentración presentada en el apéndice del Capítulo III, y en el capítulo de introducción.

Antes de adentrarnos en el marco termodinámico, es recomendable identificar la tendencia que se observa para los resultados experimentales. A medida que cambiamos de sustancia y vamos de L-Fenilalanina al compuesto **1.a** y luego a la L-Tirosina, se desarrollan materiales cada vez más cristalinos, hasta llegar al extremo de generar cristales únicos (Recorrido a→b→d en la Figura 17). Por otro lado, si mantenemos la identidad química conservada y cambiamos la concentración del sistema, obtenemos un menor número de partículas, pero de mayor tamaño, de forma análoga a lo que habríamos esperado para la teoría de nucleación y crecimiento clásica (Recorrido b→c en la Figura 17). Por último, al envejecer el material obtenido para L-Fenilalanina el tiempo suficiente,

se observa la necesidad de un grado de orden mayor, dando lugar a la formación de material policristalino (Recorrido a>e en la Figura 17)

Si pensamos las esferulitas como la representación experimental de los nodos de concentración en el instante en que estos se equilibran y ya no pueden relajarse, entonces podemos utilizar la Ecuación 28 y la Ecuación 29 para describir tanto la cristalinidad como el tamaño de las esferulitas formadas.

Ecuación 28. Cantidad de moléculas o iones que conforman un nodo de concentración cuando este entra en equilibrio y ya no puede relajarse.

$$n = \frac{3\gamma}{r.Ff.\Delta G_V}$$

Ecuación 29. Cantidad de nodos generadas por unidad de volumen en función de la concentración, la solubilidad y los parámetros termodinámicos y estructurales.

$$N = \frac{(C - S).N_A}{n} = \frac{(C - S).N_A.r.Ff.\Delta G_V}{3\gamma}$$

Para construir la Ecuación 28 se utiliza la Ecuación 18 del apéndice del Capítulo III, pero empleando el número de moléculas contenidas en el nodo (n) y el radio aparente (r^*Ff , de ahora en más R_{ff}) de cada una de estas para estimar el radio del nodo. Este abordaje es equivalente al que se realiza para obtener la Ecuación 20 del mismo apéndice.

La Ecuación 29 parte de la idea de que el “exceso de moléculas” que no pueden ser toleradas en el seno del sistema, proviene de la diferencia entre la concentración empleada para armar la solución y la solubilidad a la temperatura en la que se esté estudiando el material. La proporción entre esta diferencia y el número de moléculas en cada nodo da como resultado la cantidad de nodos que se generarán en un dado volumen. Es importante notar que esta ecuación solo tiene sentido cuando, en un sistema liotrópico, la concentración es mayor a la solubilidad, lo cual es condición necesaria para que se produzca una descomposición en el sistema. Si el sistema es estable y la concentración empleada es menor o igual a la solubilidad, no se formarán esferulitas, o bien estas serán transitorias y podrán disolverse espontáneamente. Esto se verá reflejado en la desaparición del término de exceso superficial, lo cual volvería nulo en denominador y generaría que el número de nodos se vuelva infinito. Aunque absurdo, este resultado puede entenderse en términos de que el número de nodos se equipara con el número de moléculas de un dado componente presentes en el sistema. Un comportamiento análogo se obtiene si se intenta emplear esta ecuación para modelar compuestos puros termotrópicos. Este tipo de sistemas no presentarán esferulitas discretas sino disclinaciones.

Con estas dos ecuaciones podemos tener una idea clara del grado de cristalinidad, el número y la extensión las esferulitas formadas.

Por un lado, si analizamos cómo impacta el radio aparente en el número de moléculas que constituyen cada nodo, nos encontramos con un resultado familiar. A medida que el radio aparente disminuye, el número de moléculas en un nodo aumenta. Este resultado es consistente con lo observado en las caracterizaciones por microscopía del fenómeno de separación de fases de todos estos derivados estudiados en los capítulos

anteriores. Radios aparentes grandes conllevaban a la formación de materiales mayoritariamente espinodales (compuesto **1.c** en el Capítulo IV) mientras que radios aparentes más pequeños generaron materiales con una cristalinidad mayor (compuesto **1.g** en el Capítulo IV).

Si estudiamos qué sucede con el radio, el factor de forma y el radio aparente en la L-Fenilalanina, L-Tirosina y el compuesto **1.a**, cada uno adquiriendo el mismo estado supramolecular y conformacional que presenta en su material cristalino (L-Fenilalanina y L-Tirosina formando dímeros y **1.a** como un monómero desplegado), podemos notar una tendencia similar.

Tabla 9. Radio, factor de forma y radio aparente calculado para los compuestos **1**, **2** y **1.a** en los mismos estados conformacionales y supramoleculares que presentan en sus estructuras cristalinas.

	Radio (Å)	F _f	R _{ff} (Å)
L-Fenilalanina (Dímero)	5,04	2,28	11,49
1.a	4,40	2,47	10,86
L-Tirosina (Dímero)	4,54	1,98	8,98

Como predice la Ecuación 28, el aumento en la cristalinidad del material obtenido al ir desde el dímero de L-Fenilalanina al compuesto **1.a**, y luego, al dímero de la L-Tirosina, se condice con una disminución en el radio aparente de todas estas sustancias en solución. Este ejemplo ilustra el rol que parece estar cumpliendo la difusión en la selección del grado de cristalinidad.

Por otro lado, utilizando la Ecuación 29 podemos comprender qué sucede cuando disminuimos la concentración de una solución y llevamos a cabo el fenómeno de precipitación conservando todos los otros parámetros estructurales (recorrido b→c en la Figura 17). Experimentalmente se observa que haber disminuido la concentración generó un aumento en el tamaño y una disminución en la cantidad de esferulitas. Esto es consistente con una disminución en el numerador de la Ecuación 29, lo cual implicaría una caída neta del valor de N. Aunque este resultado no logra predecir el aumento en el tamaño, este puede producirse posteriormente a la generación de las esferulitas como un evento de crecimiento o de maduración.

Aunque es necesario realizar un análisis detallado del orden molecular utilizando técnicas de difracción y dispersión de rayos X para comprender la naturaleza de esta fase tan atípica, el hecho de que este tipo de texturas sean, al menos, consistentes con los arreglos esperados para estructuras amiloïdes, deja asentado un precedente a favor de la relación entre cristales líquidos y estructuras amiloïdes presentada en este trabajo de tesis. Esta relación no se propone de manera inocente con la intención de describir una correlación sino, más bien, con toda la intencionalidad de extender un puente que invite a desplegar el arsenal de herramientas que están desarrolladas para la caracterización y el diseño racional de moléculas en el marco de la cristalografía y la ciencia de materiales y ponerla a disposición del diseño de nuevas moléculas con propiedades terapéuticas.

El hecho de que se hayan observado este tipo de estructuras birrefringentes tanto para L-Fenilalanina como para el compuesto **1.a** es otro punto a favor la propuesta de un carácter amilogénico para estos compuestos, lo cual podría estar indicando una similitud estructural de sus agregados con las estructuras amiloides.

Para cerrar este apartado, poder comparar las esferulitas observadas para L-Fenilalanina y **1.a** con imágenes reportadas en bibliografía para placas seniles desarrolladas en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Estas últimas presentan una respuesta óptica consistente en una birrefringencia radial que se pone de manifiesto al ser teñidas con Rojo Congo. Esta birrefringencia no es inducida por el colorante, sino que es intrínseca de este tipo de placas que se confeccionan en un arreglo radialmente ordenado alrededor de un centro desordenado.³⁸ Ambas imágenes presentan una clara similitud, lo cual podría estar sugiriendo un grado de orden similar en ambas sustancias.

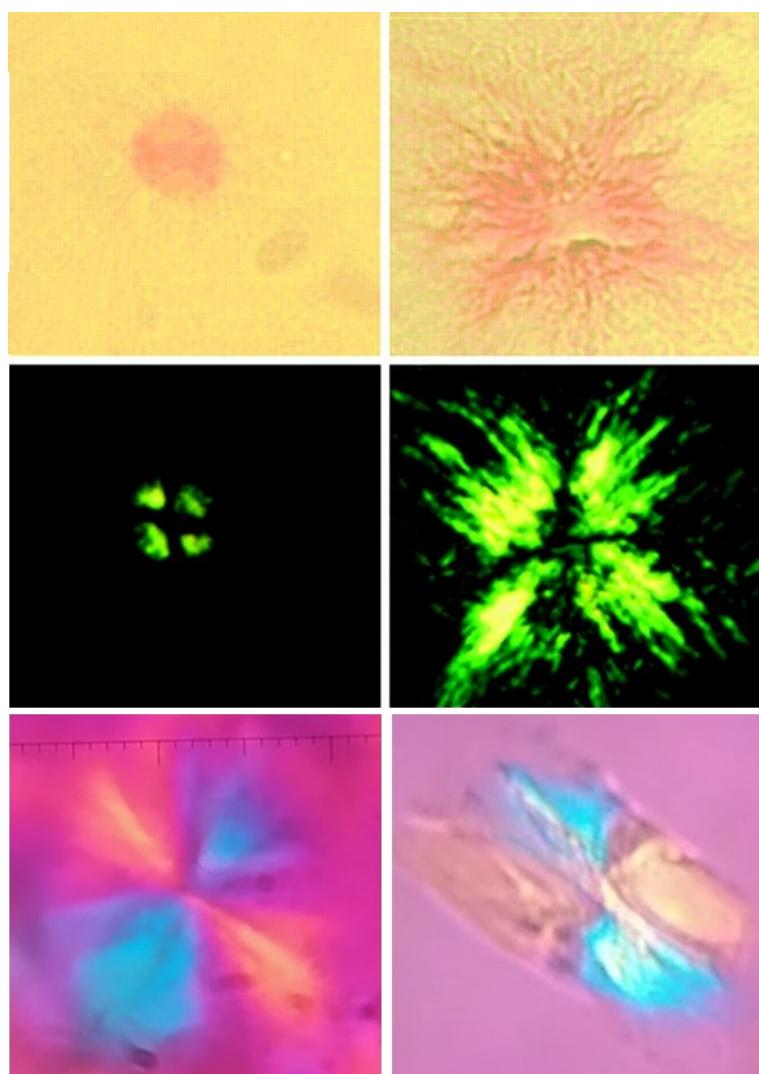


Figura 18. Placas seniles teñidas con Rojo Congo detectadas en tejido cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Arriba: Iluminadas empleando luz linealmente polarizada. Medio: Iluminadas empleando un arreglo de dos polarizadores. Imagen adaptada del trabajo de Jin et. al.³⁸ Abajo: Esferulitas de L-Fenilalanina y el compuesto **1.a** en DMSO observadas empleando un arreglo de dos polarizadores.

Estudios de formación en solución de estructuras con potencial actividad amilogénica

Estudio de alteraciones en la emisión de una sonda fluorescente sensible al entorno

El estudio de la formación de agregados supramoleculares con potencial actividad amilogénica en solución se realizó empleando soluciones en DMSO, agua básica (NaOH 0,1 M), agua ácida (HCl 0,1 M) y agua neutra (MiliQ) de los diferentes derivados. Para la identificación se empleó una sonda basada en quinolimida (AQui) especialmente diseñada para censar ambientes hidrofóbicos.⁶⁷ A medida que los agregados supramoleculares se ensamblan, la sonda se intercala entre los bloques de construcción, lo cual altera la polaridad de su entorno. Debido a este cambio en la hidrofobicidad, la sonda ve alterada tanto su longitud de onda de emisión como el rendimiento cuántico de fluorescencia. Esto se manifiesta como una alteración en el espectro de emisión, el cual pasa de una señal tenue a 630 nm a una señal intensa a 550 nm. El experimento de detección consiste en la determinación de la intensidad de las ambas señales de emisión y el cálculo de la relación entre ellas.

En base a estos resultados, no se observó la presencia de agregados supramoleculares en ninguna de las soluciones estudiadas, salvo para la L-Fenilalanina (**1**) en DMSO (Tabla 10 y

Tabla 11).

Tabla 10. Resultados de los estudios de formación de fibras amiloïdes en medio acuoso. La coloración rojiza implica una proporción mayor de la emisión asociada al entorno hidrofílico y la emisión verde una emisión mayor asociada al entorno hidrofóbico.

Básico				Neutro				Ácido			
Molécula	I ₆₃₀	I ₅₅₀	Ratio	Molécula	I ₆₃₀	I ₅₅₀	Ratio	Molécula	I ₆₃₀	I ₅₅₀	Ratio
2	65380	6543	10	2	122880	8423	14.6	1.d	81377	4711	17.3
1.f	45413	9670	4.7	1.c	118226	8236	14.4	2	49698	3371	14.7
1	67912	17533	3.9	1	88184	6782	13	1	55964	3878	14.4
1.a	65274	21351	3.1	1.g	45675	8181	5.6	1.a	66743	4655	14.3
2.e	127095	44748	2.8	1.d	27998	5360	5.2	2.e	36162	2875	12.6
1.e	61606	24396	2.5	1.a	58725	11770	5	1.f	28144	2983	9.4
1.c	109590	49719	2.2	1.e	40095	8428	4.8	1.e	61365	7837	7.8
1.g	70496	33087	2.1	1.b	59538	15860	3.8	1.b	45200	7160	6.3
1.d	48607	24147	2	2.e	31379	9684	3.2	1.g	55091	8955	6.2
2.f	28067	14218	2	2.f	21265	7035	3	2.f	18222	3067	5.9
1.b	39867	24979	1.6	1.f	26601	29432	0.9	1.c	51872	31046	1.7

Tabla 11. Resultados de los estudios de formación de fibras amiloïdes en DMSO. La coloración rojiza implica una proporción mayor de la emisión asociada al entorno hidrofilico y la emisión verde una emisión mayor asociada al entorno hidrofóbico.

DMSO			
Molécula	I ₆₃₀	I ₅₅₀	Ratio
1.e	239598	23072	10.4
1.a	169730	16496	10.3
2.e	278153	31415	8.85
1.c	78028	9498	8.22
2.f	71045	9697	7.33
1.g	213328	29987	7.11
1.d	127688	19635	6.5
1.b	211722	35679	5.93
1.f	40419	6879	5.88
2	273081	64577	4.23
1	942	1865	0.51

Aunque los resultados negativos de este experimento indican la ausencia de estructuras supramoleculares hidrofóbicas en estas condiciones, en particular para todos los compuestos salvo la L-Fenilalanina, también podrían ser un indicio más general de la incapacidad de estas sustancias de formar agregados supramoleculares en solución lo suficientemente grandes como para interactuar con la sonda empleada, cuando la concentración no es suficiente.

Estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares

Para estudiar si el desarrollo de las estructuras amiloïdes es dependiente del tiempo se realizaron experimentos de cinética de agregación empleando tanto la misma sonda fluorescente AQui como la Tioflavina T. Esta última es considerada el reactivo estándar para censar el desarrollo de estructuras amiloïdes en sistemas biológicos.⁶⁸ Ambos experimentos se llevaron a cabo empleando las mismas concentraciones de compuesto que se utilizaron para los experimentos de interacción compuesto-neuritas discutidos más adelante. La concentración de cada una de las sondas se eligió en base a condiciones previamente optimizadas para la visualización y control de la formación de estructuras amiloïdes en péptidos Aβ (10μM para ThT y 20μM para AQui).^{67,69} La longitud de onda de emisión se eligió específicamente para maximizar la señal detectada en cada sonda. El resto de las condiciones experimentales y los controles realizados se detallan en el apartado experimental. Los resultados obtenidos para ambas sondas se detallan en la Figura 19 para ThT y en la Figura 20 para AQui.

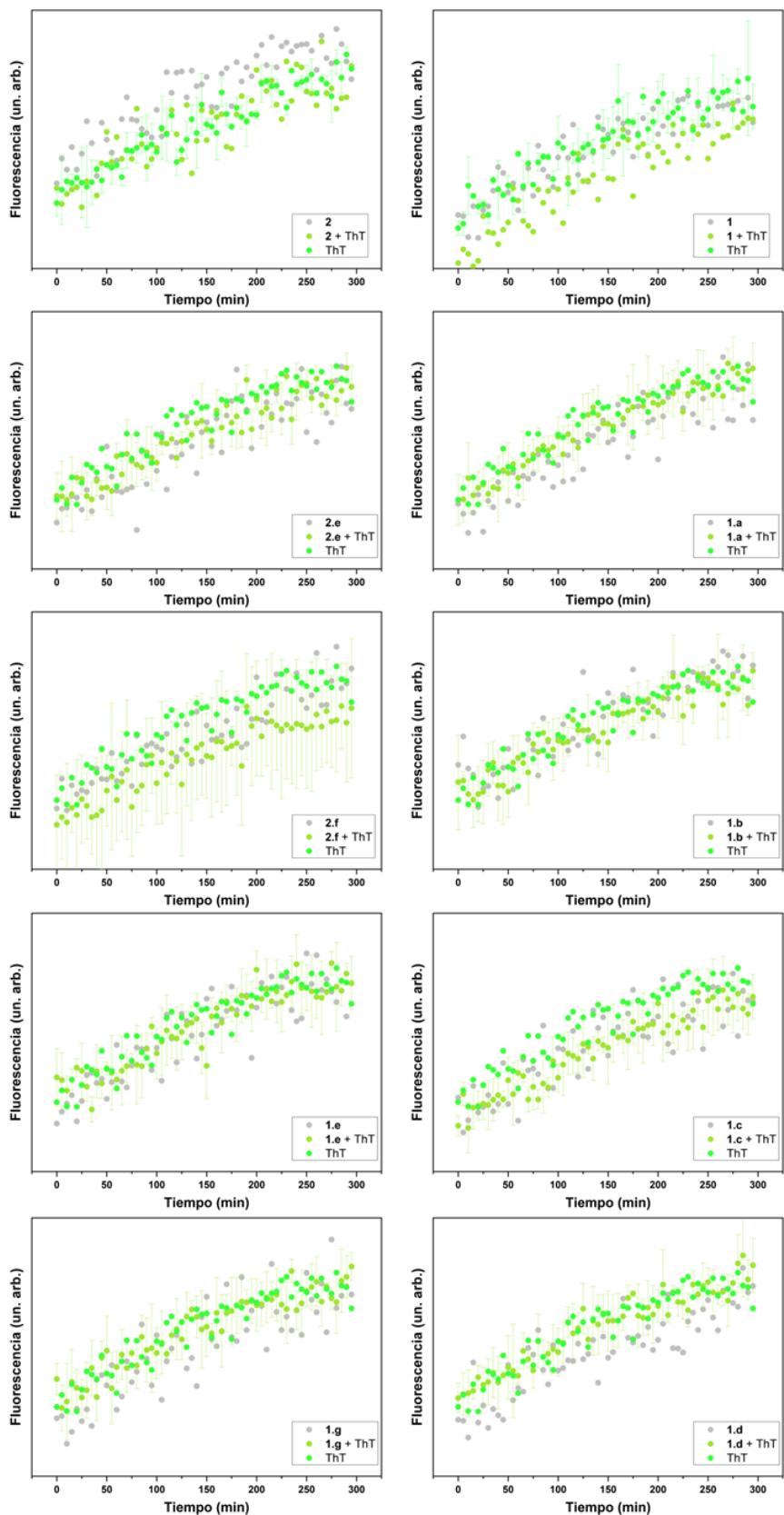


Figura 19. Experimentos de cinética de agregación realizados sobre los compuestos **1**, **2**, **1.a**, **1.b**, **1.c**, **1.d**, **1.e**, **1.f**, **1.g**, **2.e** y **2.f** empleando ThT como sonda fluorescente. En gris se indica la fluorescencia registrada para los compuestos sin sonda (control 1), en verde claro la emisión registrada para los compuestos en presencia de la sonda, y en verde oscuro la emisión registrada para la sonda sin compuesto (control 2).

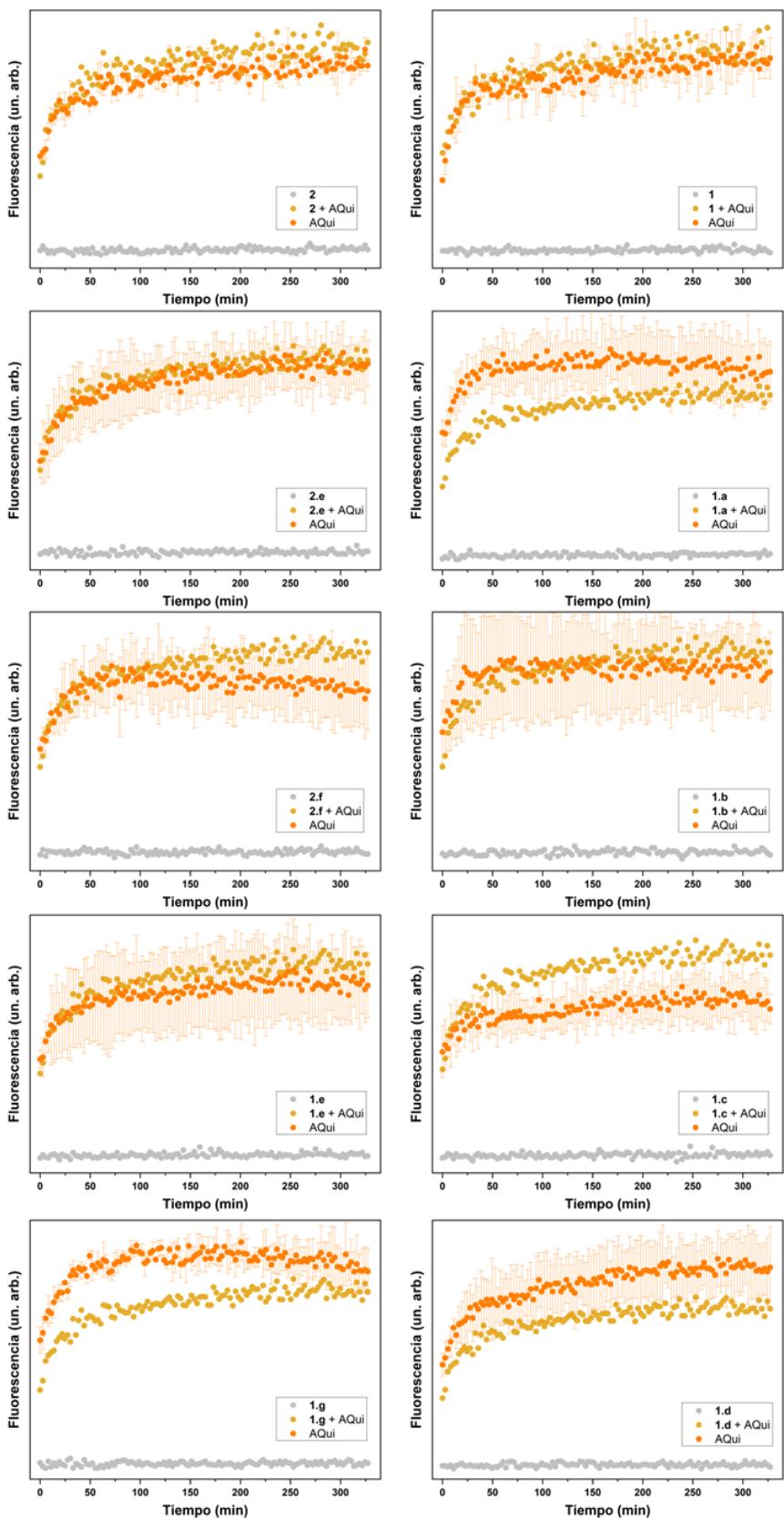


Figura 20. Experimentos de cinética de agregación realizados sobre los compuestos **1, 2, 1.a, 1.b, 1.c, 1.d, 1.e, 1.f, 1.g, 2.e y 2.f** empleando AQui como sonda fluorescente. En gris se indica la fluorescencia registrada para los compuestos sin sonda (control 1), en naranja claro la emisión registrada para los compuestos en presencia de la sonda, y en naranja oscuro la emisión registrada para la sonda sin compuesto (control 2).

La caracterización realizada empleando ThT permite observar que, en todos los compuestos, tanto los controles como la muestra en contacto con la sonda dan lugar a los mismos resultados. Esto implica que la fluorescencia detectada no proviene de una emisión incrementada de la sonda al cambiar la polaridad de su entorno, sino que es producto de la propia autofluorescencia de los compuestos en estas condiciones.

Para el caso de la sonda AQui se observa un resultado similar para todos los compuestos. En estas condiciones se obtuvo una señal leve de autofluorescencia al ser medidos en ausencia de la sonda, y una señal de fluorescencia equivalente a la que tendría la sonda por su propia cuenta al ser medidos en presencia de ella. Esto implica que la esta sonda tampoco ve alterado su entorno molecular al estar en presencia de los compuestos. Estos resultados permiten descartar la formación de agregados supramoleculares de estos compuestos en estas condiciones.

Para evitar confusiones, resulta esencial notar que las condiciones de estos experimentos no son equivalentes a las empleadas en capítulos anteriores para las microscopías confocales por tiempo de decaimiento de fluorescencia, ya que en estos casos se indujo a la precipitación a través de un salto de pH, lo que aumentaba de forma radical la concentración local de los compuestos.

Estudios de citotoxicidad

Inspirados en la semejanza estructural observada entre las arquitecturas supramoleculares desarrolladas por estas especies y las estructuras modelo reportadas en bibliografía para las especies con actividad amilogénica (Figura 11, Figura 12 y su correspondiente discusión) se estudió la interacción entre los ensambles supramoleculares de algunos de estos compuestos y células nerviosas de ratón en estado de desarrollo (células Neuro-2a de neuroblastomas de ratón murino). Debido a que se han reportado varios casos en los que la citotoxicidad asociada a las estructuras amiloides se incrementa al fragmentar las fibras o al emplear los primeros estadios del ensamblado,⁵⁵ se decidió investigar también la interacción entre las moléculas individuales en solución y la misma familia de células

En todos los casos, antes de realizar los experimentos de interacción compuesto-neurona, se estudió la citotoxicidad empleando células de carcinoma cervical humano (células HeLa) como modelo celular (Figura 21). Todos los estudios se realizaron por triplicado y abarcando concentraciones desde 0,01 a 31,6 μ M tanto en agua básica como en DMSO.

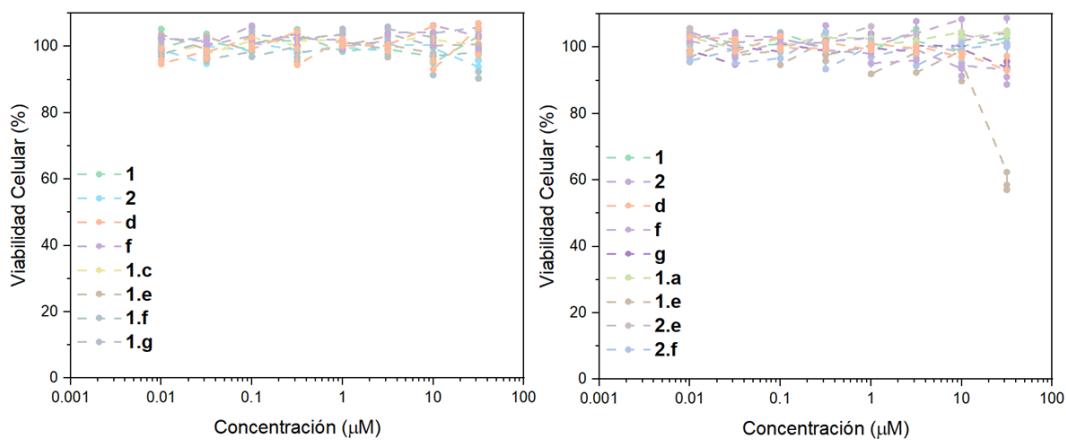


Figura 21. Resultados de los estudios de citotoxicidad realizados sobre células HeLa para los derivados de L-Fenilalanina (**1**) y L-Tirosina (**2**) en agua básica (izquierda) y DMSO (derecha). Se informan también los resultados obtenidos para los aminoácidos y algunos aldehídos precursores como ensayo control. Las moléculas que no figuran en el ensayo no pudieron ser testeadas debido a limitaciones de solubilidad.

Los resultados de estos experimentos permitieron observar una actividad citotóxica nula para todos estos compuestos, tanto en DMSO como en agua en medio básico. Este comportamiento no difiere apreciablemente del registrado para los aminoácidos y aldehídos precursores, los cuales tampoco presentaron una citotoxicidad apreciable en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el único compuesto para el que parece haber una caída apreciable de la viabilidad celular a altas concentraciones es para **1.e** en DMSO recién a $31,6\mu\text{M}$, donde la viabilidad celular se reduce a un 60%.

El hecho de que se haya mantenido la viabilidad celular para todos los compuestos testeados, en ambas condiciones y en todo el rango de concentraciones, es consistente con el hecho de que no se haya observado la formación de estructuras supramoleculares con potencial actividad amilogénica, ni al emplear la sonda fluorescente AQui ni la Tioflavina T.

Estudios en tiempo real empleando microscopía de imagen por tiempo de decaimiento

Considerando que los estudios de citotoxicidad sugieren que no hay evidencia para sospechar de un riesgo a la salud de las neuronas, y que los experimentos de caracterización de estructuras amiloides en solución permitieron corroborar la ausencia de estas para todos los compuestos en las condiciones estudiadas, consideramos que estaban dadas las condiciones para garantizar la viabilidad y, por lo tanto, se decidió avanzar con los experimentos de interacción compuesto-neurona. Estos fueron realizados empleando microscopía confocal con imágenes coloreadas por tiempo de decaimiento, utilizando una sonda especialmente diseñada para teñir las posibles estructuras amiloides presentes en el sistema. El protocolo detallado empleado para la obtención de las soluciones de molécula libre, filamento y la propia interacción compuesto-molécula se encuentra informado en el apartado experimental.

Los controles realizados empleando únicamente la sonda, y la sonda con los aminoácidos precursores permitieron realizar un análisis extendido de la viabilidad celular a lo largo de todo el experimento. Los aminoácidos se testearon empleando las soluciones de filamentos debido a que estos agregados supramoleculares son para los que se ha reportado en bibliografía la actividad citotóxica.

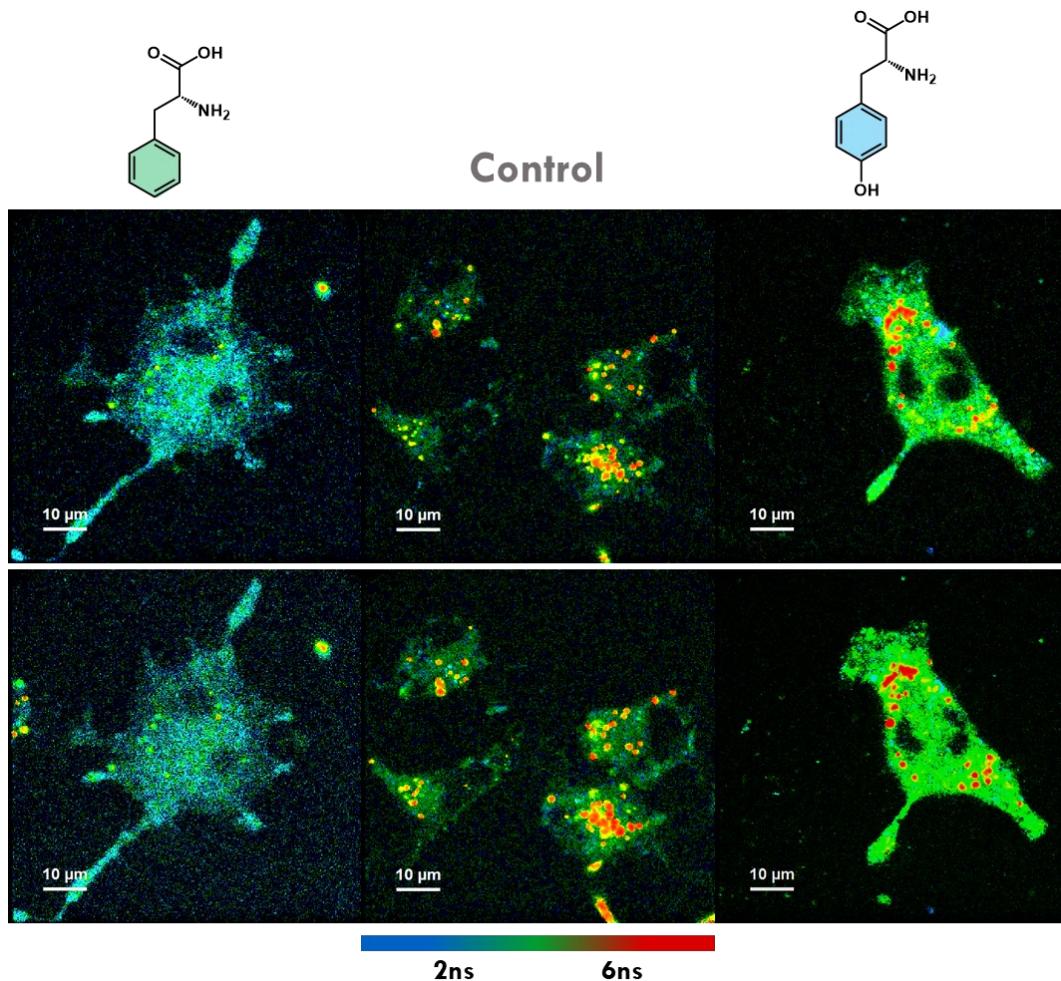


Figura 22. Estudios de interacción compuesto-neurita para los aminoácidos precursores y la sonda empleada para teñir las estructuras amiloideas.

Arriba: Primer imagen tomada sobre el sistema. Abajo: Última imagen tomada sobre la misma célula.

Durante la totalidad del periodo de adquisición de las imágenes se pudo apreciar una estructura celular intacta y sin alteraciones. Las neuronas no evidenciaron síntomas de apoptosis ni cambios apreciables en su morfología que dieran indicios de algún mal funcionamiento en sus ciclos metabólicos. Ni la presencia de la sonda, ni la interacción entre esta y los aminoácidos parecen disparar eventos de muerte o alteración celular. En todos los casos se observa la presencia de regiones discretas y esferiformes en las cuales el tiempo de decaimiento de fluorescencia calculado para la sonda es mayor al resto de la imagen. Este tiempo de decaimiento es consistente con la presencia de un entorno molecular lipofílico alrededor de la sonda.⁶⁷ Tanto la morfología, como el carácter lipofílico, y la locación celular de estas organelas es consistente con la presencia de vesículas sinápticas.⁷⁰

Al realizar el mismo experimento empleando los compuestos sintetizados se observan dos comportamientos con claros contrastes. Por un lado, al estudiar los ensambles supramoleculares directamente sobre las neuronas, todos aquellos compuestos que presentaron una cristalinidad muy elevada, como el compuesto **1.a**, o una solubilidad extremadamente baja, como el compuesto **1.b** y el compuesto **2.f**, no dieron lugar a cambios apreciables en las células observadas. Estos resultados no se informan debido a que no hubo cambios apreciables a lo largo de todo el experimento. Los compuestos **2.a** y **2.d** no pudieron ser estudiados debido a que no habían sido sintetizados para el momento en que se realizaron estos experimentos.

Por otro lado, para todo el resto de los compuestos ensayados se observó la presencia de cuerpos filamentosos (Figura 23 y Figura 24).

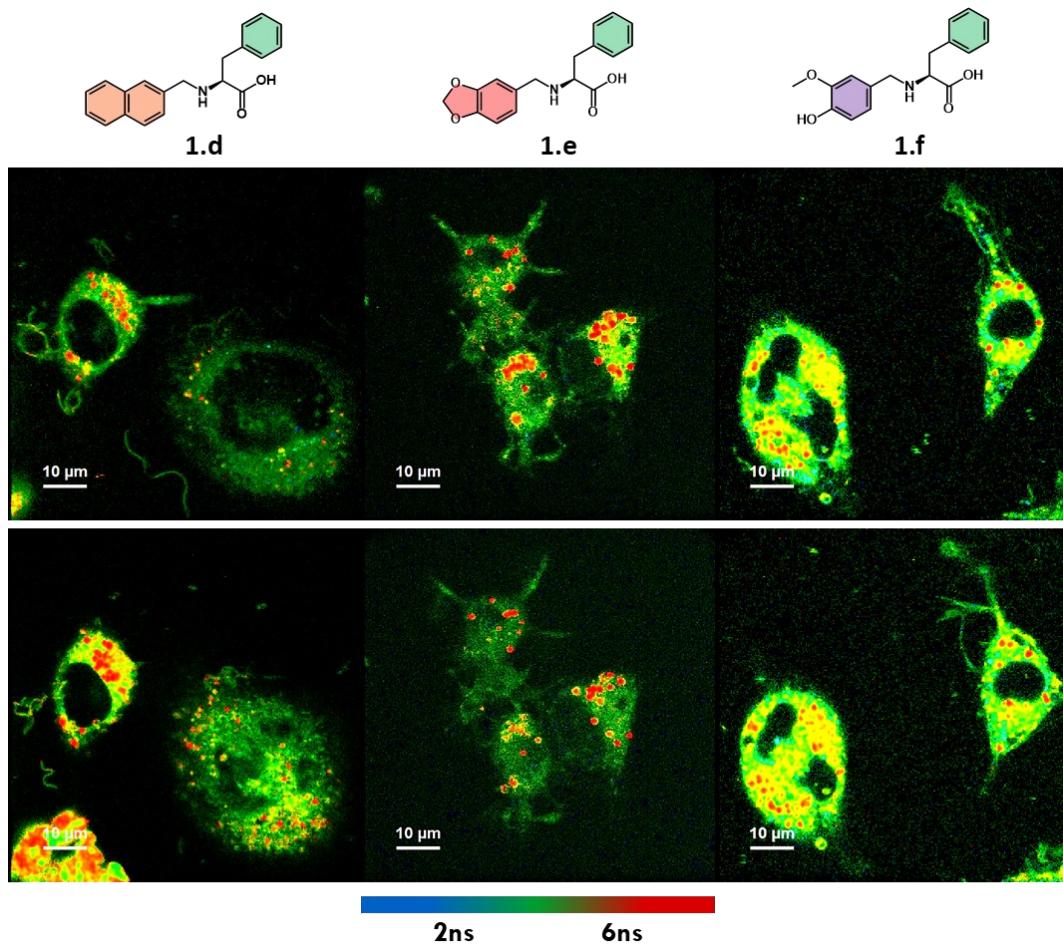


Figura 23. Estudios de interacción ensamble-neurita para **1.d**, **1.e** y **1.f**.
Arriba: Primer imagen tomada sobre el sistema. Abajo: Última imagen tomada sobre la misma célula.

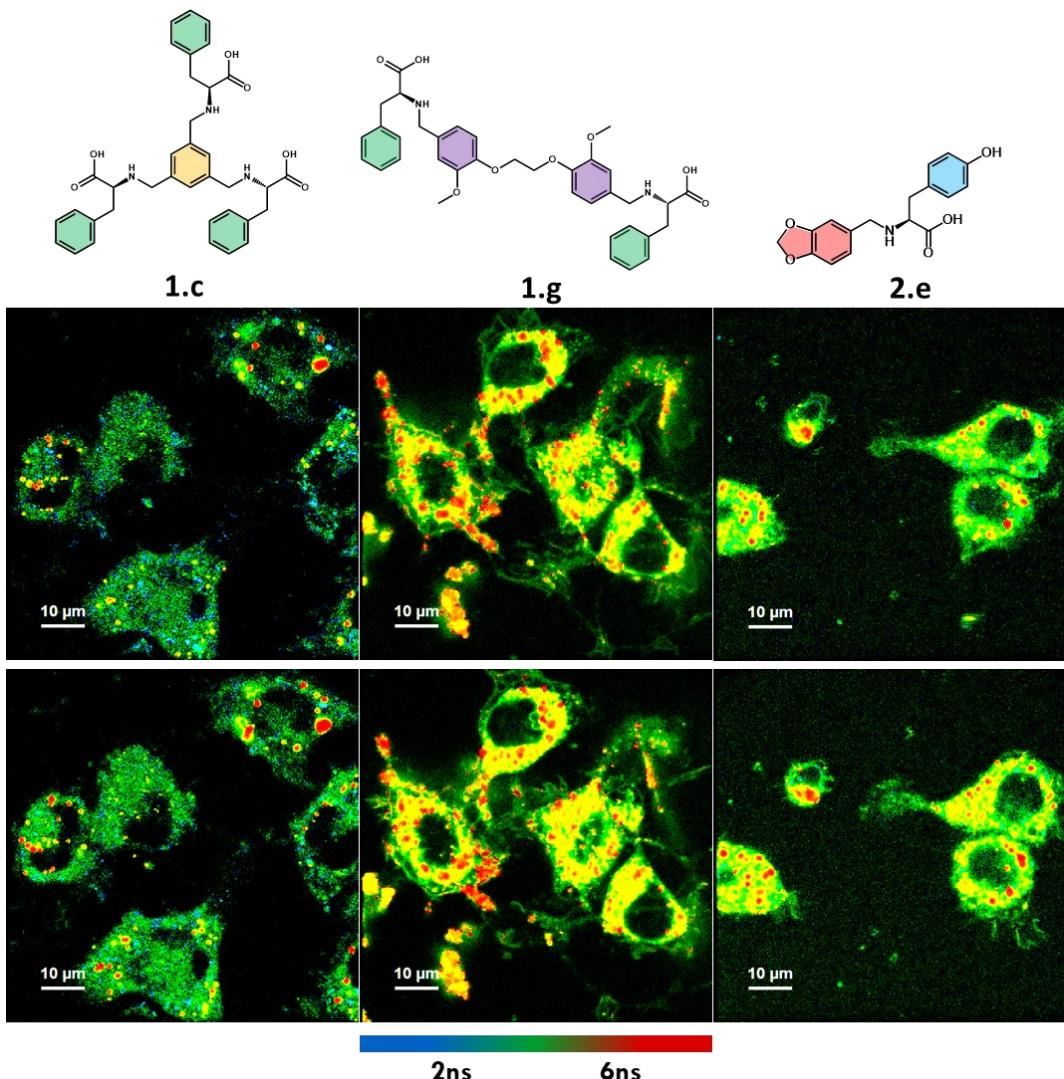


Figura 24. Estudios de interacción ensamble-neurita para **1.c**, **1.g** y **2.e**.
Arriba: Primer imagen tomada sobre el sistema. Abajo: Última imagen tomada sobre la misma célula.

Estos cuerpos filamentosos no parecen generarse desde la solución, sino que parecen extenderse desde las propias paredes celulares, dando la sensación de ser “prolongaciones de esta misma pared” y no objetos exógenos siendo invaginados. En algunos de estos casos, como en el compuesto **1.d**, la observación de estos filamentos está acompañada por la presencia de células apoptóticas (Figura 23).

Estas células se pueden identificar fácilmente debido a que carecen de membrana celular que envuelva el soma, y presentan una distribución casi homogénea de sus vesículas sinápticas a lo largo de toda su extensión celular, lo cual da un indicio claro de la pérdida de la compartmentalización interna. En algunos casos puntuales puede observarse también la presencia de vesículas sinápticas sobre la membrana celular y en las inmediaciones exteriores, lo cual indica una pérdida parcial del contenido celular.

La presencia de células apoptóticas en estos experimentos es inesperada debido a que no se condice con los resultados de los estudios de citotoxicidad. Esta diferencia puede deberse a una sensibilidad especial por parte de las neuronas respecto a este tipo de

ensambles, a un resultado inusual dado por el reducido espacio muestral que logra abarcar esta técnica. Cualquier sea el caso, resulta imperioso estudiar en detalle la citotoxicidad de todos estos ensambles sobre modelos neuronales y en un rango de concentraciones más elevado. Esta es una de las principales perspectivas propuestas para este trabajo de tesis en futuro inmediato.

Es importante resaltar que, en todos los casos, sin distinción del compuesto estudiado, los filamentos observados son muy similares en morfología y extensión. Todos presentan longitudes que oscilan entre los 2 y 20 μm y un grosor de aproximadamente 1 μm . Estos filamentos parecen encontrarse homogéneamente distribuidos alrededor de la célula, sin presentar una locación preferencial entre neuritas y soma. Para el caso puntual de los compuestos **1.d** y **1.g**, se ha podido observar algunos de estos filamentos sin estar directamente adheridos al cuerpo celular.

Realizar el mismo experimento, pero empleando una solución de moléculas libres sin ensamblado previo arroja resultados muy similares. El primer cambio considerable es que, en estas condiciones, la solubilidad de los compuestos no parece ser un limitante en tanto estos son inoculados partiendo de una solución alcalina, la cual favorece la estabilización de los aniones y facilita su disolución.

Por otro lado, respecto a la formación de filamentos, se observa claramente el desarrollo de estructuras filamentosas de aspecto alargado que parecen extenderse desde el soma celular hacia el exterior. Estos filamentos, en muchos casos, parecen orientarse hacia las células aledañas y adherirse a su superficie. Este fenómeno se manifestó en todos los compuestos salvo **1.b**, el cual podría estar sufriendo una restricción por su solubilidad a pesar del medio acuoso básico. Sin embargo, no en todos los compuestos parece desarrollarse en la misma intensidad (Figura 25).

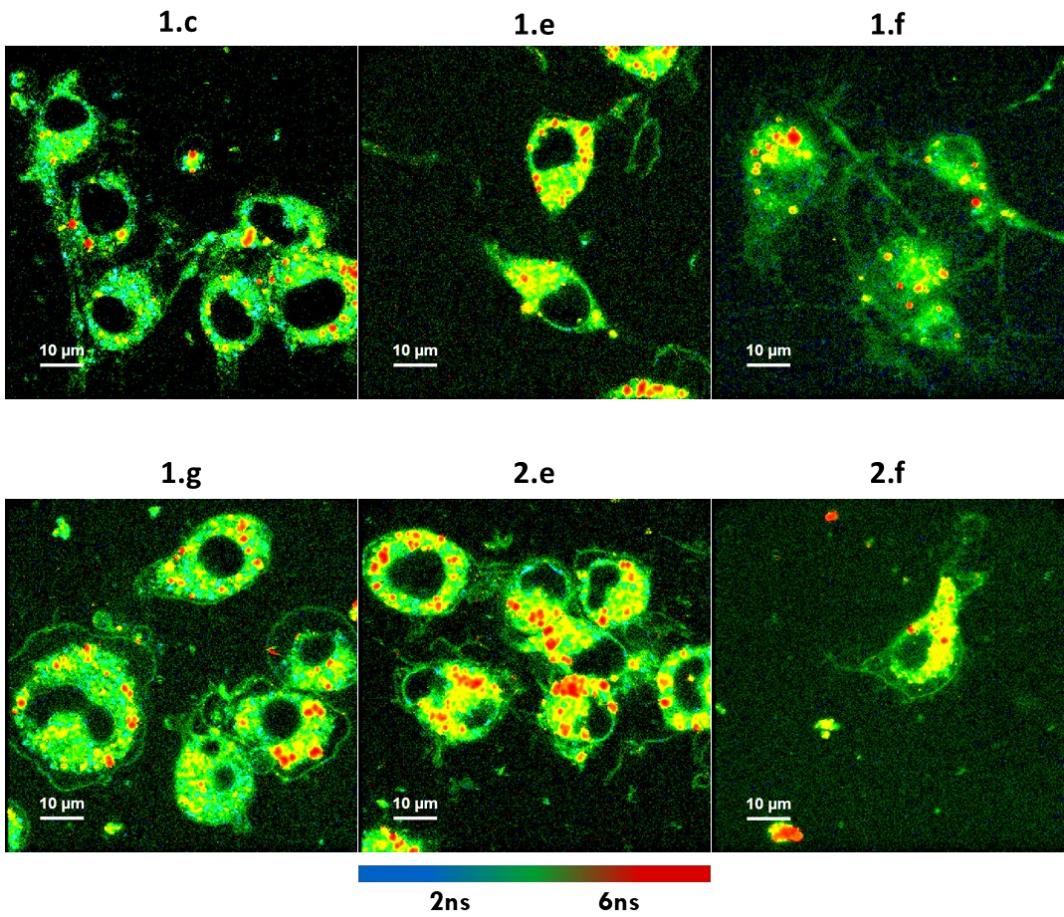


Figura 25. Imágenes de microscopía coloreada por tiempo de vida de fluorescencia de neuroblastos de ratón en presencia de moléculas libres de los distintos compuestos. En todos los casos se informa la última de las imágenes captadas durante la adquisición.

Para ambos compuestos derivados de la vainillina (**1.f** y **2.f**) se observa la presencia de estos filamentos desde la primera imagen captada y casi no se aprecian cambios al largo de toda la adquisición. En ninguno de los casos pudo observarse la presencia de células apoptóticas, aunque sí se aprecian alteraciones en la morfología de la membrana celular que podrían ser consistentes con la formación de protrusiones.

Dentro de este grupo de experimentos de interacción molécula-neurona, resaltan dos compuestos cuyos resultados son particularmente ilustrativos. Por un lado, el compuesto **1.a**, para el cual pudo ser registrada de manera clara la expansión que sufre el soma celular a medida que se capturan las imágenes de microscopía (Figura 26). Sorprendentemente, esta expansión no parece estar acompañada por la iniciación de un proceso de apoptosis, en tanto todas las células capturadas en la imagen parecen retener el contenido del soma y conservan la localización de sus vesículas sinápticas. El desarrollo de esta expansión se extiende hasta alcanzar un contacto estrecho con las membranas vecinales, de forma similar a lo que se observa durante la confluencia celular de células adherentes.^{71,72}

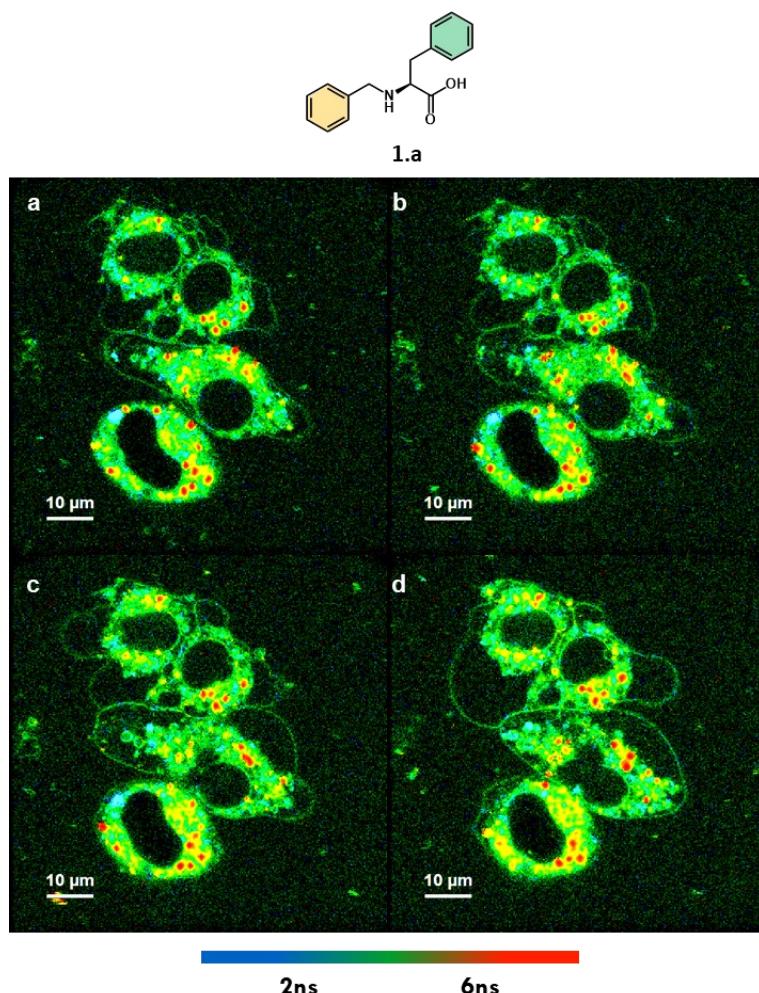


Figura 26. Imágenes captadas durante el fenómeno de interacción molécula-neurona para el compuesto **1.a** durante 4 períodos distintos. (a) imagen inicial, (b) al cabo de 150s, (c) al cabo de 330s y (d) al cabo de 645s.

Un efecto muy similar se observa para el compuesto **1.d** (Figura 27). Aunque, en este caso, el aumento en la extensión celular sí está acompañado de una deslocalización parcial de las vesículas sinápticas y una pérdida de la compartmentalización interna, al menos en los alrededores del núcleo.

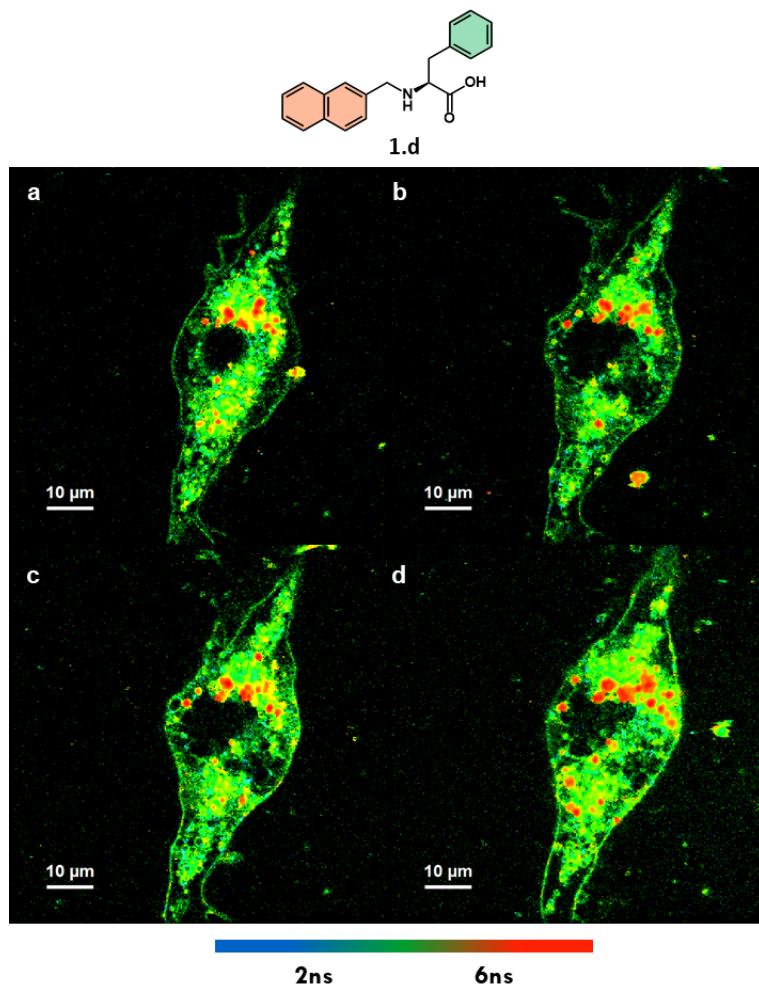


Figura 27. Imágenes captadas durante el fenómeno de interacción molécula-neurona para el compuesto **1.d** durante 4 períodos distintos. (a) imagen inicial, (b) al cabo de 240s, (c) al cabo de 375s y (d) al cabo de 645s.

Aunque no parece desarrollarse un proceso de apoptosis en el periodo de tiempo estudiado, esta reorganización del contenido celular podría estar indicando el inicio de un fenómeno de muerte celular. No obstante, más allá de los cambios en la estructura interna de la célula, la membrana celular permanece intacta y no parece fragmentarse ni resquebrajarse durante todo el fenómeno.

Tanto las alteraciones en la estructura interna de la célula, como el aumento apreciable del número de filamentos desarrollados para interactuar con el resto de las neuronas vecinales, son eventos característicos del proceso de diferenciación de células nerviosas.⁷³⁻⁷⁵ Actualmente existen reportados en bibliografía un escaso número de compuestos capaces de regular de manera eficaz el fenómeno de diferenciación de células madre pluripotentes a células nerviosas. En este escaso pero diverso universo de compuestos, podemos encontrar estructuras tan distintas como la del ácido retinoico,⁷⁵ el neuropatiazol,⁷⁶ y algunos derivados del imidazol,⁷⁷ y de la urea.⁷⁸

Sorprendentemente, por lo que sabemos hasta ahora, son aún más escasos los compuestos reportados capaces de reprogramar neuroblastos de ratón, o células diferenciadas de origen humano, para dar lugar a la obtención de células nerviosas

funcionales.^{79,80} Es importante distinguir que en estos estudios las células ya atravesaron la barrera de la diferenciación morfológica y la meta es lograr que esta diferenciación sea alterada a través de una maduración que permita reobtener las propiedades funcionales de una neurona madura. Sin embargo, esto sólo ha sido logrado hasta ahora empleando una combinación de cuatro⁷⁹ o seis⁸¹ distintos compuestos que actúan de manera sinérgica sobre diversos factores de transcripción génica.

Una de las conclusiones más importantes que se desprende de estos estudios es la necesidad de una acción conjunta de todos los compuestos ensayados para lograr la reprogramación, en tanto cada uno de ellos por separado no fue capaz de dar lugar a los mismos resultados en ningún grado.^{79,81,82} Aunque se pueden encontrar en bibliografía propuestas para los mecanismos de acción de algunas de estas moléculas, como el efecto que tiene el compuesto CHIR99021 en aumentar la eficiencia de la conversión neuronal mediada por factores de transcripción, o la reducción de la peroxidación lipídica generada por la presencia del compuesto Forskolin,^{80,83} la variedad de estructuras y la diversidad de vías de interacción posibles entre estas y las células, hacen que cada mecanismo sea propio y característico de cada sustancia, y difícilmente pueda extrapolarse un mismo mecanismo a distintos compuestos.⁸⁴

Es por este motivo que se vuelve esencial notar el paralelismo que existe entre el fenómeno de diferenciación y maduración de células nerviosas y los cambios sufridos por las neuronas al ser expuestas a soluciones de estas pequeñas moléculas.

En resumen, si consideramos que en los experimentos de interacción neurita-derivado de aminoácido fue posible observar cambios tanto en el número, como en el aspecto de los filamentos adheridos a las membranas celulares acompañados de cambios en la estructura subcelular, y que estos cambios se dieron en una escala de tiempo mucho menor a la frecuentemente requerida para experimentos de diferenciación o maduración (15' de tiempo de captura de video vs 24-48h de tiempo de incubación con los compuestos de interés),⁸³ podemos percibir que hay un paralelismo, al menos parcial, entre los efectos que producen las pequeñas moléculas capaces de inducir la maduración celular y los efectos producidos por la interacción con la neurita.

Además, aunque en los experimentos de interacción neurita-derivado de aminoácido realizados no se pudo distinguir con rigurosidad estadística la presencia de filamentos con un carácter amiloide apreciable debido a que los mismos no pudieron diferenciarse de fragmentos de membrana producidos por protrusiones características del fenómeno de apoptosis (*blebs*),⁸⁵ o por distorsiones ópticas debido a elementos no enfocados, el hecho de que todos estos compuestos hayan mostrado una citotoxicidad baja, o nula, en condiciones experimentales similares, es un indicio a favor de descartar la inducción estimulada de los procesos de apoptosis.

Por último, es interesante resaltar que existen reportes en bibliografía donde se observa cómo los precursores solubles de la proteína precursora de la formación de amiloides (APP) pueden inducir la diferenciación de células madres embrionarias humanas en células nerviosas,⁸⁶ y el desarrollo y la proliferación de axones en células nerviosas previamente diferenciadas,⁸⁷ siendo este resultado un punto a favor de la actividad neuroestimulante de los pequeños fragmentos peptídicos amilogénicos. En ese sentido,

los resultados obtenidos para los derivados de aminoácidos podrían indicar cierta analogía con lo observado en bibliografía, asociado con una potencial actividad neuroestimulante.

En base a todos estos resultados podemos postular que podría existir una acción potencial como agente acelerador de la maduración celular de algunos de estos compuestos, siendo los principales candidatos de estudio las moléculas libres. Con esto en consideración, se propone como principal perspectiva de este trabajo un análisis exhaustivo y detallado de la capacidad de estos compuestos de disparar los fenómenos de diferenciación de células nerviosas.

Conclusiones

En este capítulo de tesis se empleó la familia de compuestos derivados de L-Fenilalanina y L-Tirosina presentada en los capítulos anteriores con el objetivo de estudiar en detalle la relación que existe entre la estructura molecular de un dado compuesto y su capacidad de autoensamblarse para dar lugar a la formación de filamentos con potencial carácter amiloide. Basados en la evidencia cada vez más abrumadora de la actividad patológica que presentan los amiloïdes obtenidos a partir de ensambles supramoleculares, podemos entender que es apremiante contar con una descripción precisa de cuáles son los parámetros que rigen este proceso, tanto para la L-Fenilalanina y la L-Tirosina en general, como para toda la pléthora de metabolitos y derivados para los cuales se haya observado potencial actividad amilogénica en condiciones fisiológicas.

A lo largo de toda esta tesis, se han estudiado en detalle los efectos que introducen las diversas derivatizaciones en aspectos fundamentales del fenómeno de autoensamblado como es la química supramolecular, la libertad conformacional y la solubilidad. En base al estudio detallado de las estructuras cristalinas de todos estos compuestos, y sus aminoácidos precursores, se ha podido encontrar una relación directa entre el carácter convergente, el factor de forma y la capacidad de desarrollar estructuras planares apiladas en secciones electroestáticas y dispersivas. Adicionalmente, se ha logrado mostrar cómo la introducción de derivatizaciones que simulan estructuras presentes en otros aminoácidos, por ejemplo la presencia del grupo fenol en el fragmento de la L-Tirosina, o la inclusión de un bloque con el mismo grupo a partir de la vainillina, o la derivatización con benzaldehído permite incorporar un grupo fenilo de la misma manera que se presenta en la L-Fenilalanina, permiten inducir comportamientos híbridos, y modular la respuesta supramolecular para alterar de manera directa la estructura final obtenida.

Por otro lado, un análisis pormenorizado de las estructuras cristalinas de todos estos compuestos ha permitido ilustrar el rol que cumple el anión cloruro y otras moléculas de cristalización en las estructuras, como agua o ácido acético, y su funcionamiento como asistentes en el desarrollo de planos electroestáticos. En todos los casos se pudo observar que el estado de carga y la estructura molecular son factores determinantes de la estructura supramolecular desarrollada, siendo el contrío solamente un complemento que asiste a la formación de las características estructurales. En líneas generales, no se encontró evidencia suficiente para sugerir que la fuerza impulsora de la selección de la estructura supramolecular no fuera otra que la propia estructura molecular.

Este resultado es esencial para sentar las bases de un diseño racional de nuevas moléculas derivadas de aminoácidos y aldehídos que sean construidas a través de la selección de bloques de construcción con propiedades previamente conocidas, como la capacidad de autoensamblarse en bicapas electroestáticas observada para L-Fenilalanina, o la facilidad para desarrollar redes extendidas de interacciones isotrópicas como se observó para L-Tirosina.

Otra de las principales conclusiones extraídas del análisis de las diversas estructuras cristalinas de estos compuestos, es el paralelismo claro que existe entre las regiones de interacción electroestática y dispersiva desarrollada en estas arquitecturas, y los fenómenos de microsegregación frecuentemente observados durante el ensamblado de cristales líquidos liotrópicos. Inspirados en la existencia de estas similitudes estructurales se estudió la obtención de texturas de cristal líquido para algunos de estos derivados, dando lugar a la formación de inhomogeneidades birrefringentes características de las fases esmécticas. Aunque se encuentra entre las principales proyecciones a futuro, continuar con la caracterización y el estudio en detalle de la síntesis de este tipo de materiales, se han propuesto al menos las bases para pensar la síntesis de estos materiales en términos de volúmenes moleculares, factores de forma y concentraciones isocóricas.

Por otro lado, los estudios de citotoxicidad junto con el de la interacción entre estos compuestos y las células nerviosas de ratón no dieron motivos para sospechar de un comportamiento nocivo bajo ninguna de las condiciones estudiadas. Al contrario, existen argumentos para sospechar que algunos de estos compuestos podrían estar estimulando el fenómeno de maduración y reprogramación de los neuroblastos en neuronas funcionales. Aunque es necesario realizar una caracterización exhaustiva del impacto que tienen estos compuestos en el correcto desarrollo de este tipo de células, están asentadas las bases que permiten profundizar la exploración de esta interacción. Entre las perspectivas a futuro se propone, principalmente, un estudio extenso de las concentraciones críticas en las cuales se observen cambios apreciables en las células nerviosas con el fin de arrojar luz sobre el delicado equilibrio que existe entre los fenómenos de nucleación, crecimiento, autoensamblado y su rol en diversas patologías.

Experimental

Síntesis de los compuestos

Las síntesis y caracterización de los compuestos incluidos en este capítulo se detalla en la sección Experimental e Información Suplementaria de los Capítulos III y IV.

Instrumentación

Microscopía óptica de luz polarizada (MOLP)

Las microscopías ópticas de luz polarizada se realizaron utilizando un microscopio triocular Nikon SMZ-745T con un sistema de iluminación Nikon Ni-150. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa MicrometricsTM SE Premium para las mediciones y el programa ImageJ⁸⁸ para el análisis.

Microscopía confocal de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM)

Los experimentos de microscopía confocal de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia fueron realizados con un equipo Abberior Expert Line empleando un láser pulsado de excitación de 470nm con una frecuencia de 20MHz. Para la detección se emplearon fotomultiplicadores híbridos con filtros pasabandas de 550/40nm. El tiempo de exposición por pixel fue seleccionado específicamente para cada muestra como una solución de compromiso entre tiempo de captura de imagen e intensidad de fluorescencia detectada. La electrónica empleada para la adquisición fue un módulo HydraHarp 400 de PicoQuant trabajando a una tasa de repetición de 20 MHz. Las imágenes de FLIM se construyeron considerando tiempos de vida de fluorescencia 1.5 a 3ns para los casos de moléculas sin sonda y 2 a 6ns para aquellas obtenidas en presencia de AQui. El análisis de las imágenes de FLIM se realizó empleando el software SyphoTime 64 de PicoQuant y macros propias programadas en ImageJ. Los tiempos de vida de fluorescencia fueron modelados empleando un modelo mono exponencial.

Estudios de citotoxicidad

Los estudios de citotoxicidad han sido realizados empleando el equipamiento de inspección avanzada de alto rendimiento (*HTS, High throughput screening*) del departamento de biología celular, computacional e integrativa (CIBIO) de la universidad de Trento, Italia. La librería de moléculas empleada consistió en las moléculas sintetizadas durante este trabajo de tesis, la línea celular ensayada fueron células HeLa de carcinoma cervical humano, realizando el protocolo detallado a continuación:

Los compuestos fueron disueltos en DMSO o en solución acuosa de NaOH 20mM y fueron distribuidos en una placa multiwells de 384 pocillos con fondo transparente empleando un dispensador acústico Echo 650. Un volumen de 50µL de células HeLa fueron sembradas hasta una densidad de 1500 células por pocillo utilizando un dispensador de reactivos ViaFill. Luego de 72 horas de incubación las células fueron teñidas con Hoechst 33342. Una serie de imágenes fue captada empleando el sistema Operetta High Content

(Perkin Elmer) y analizadas empleando el software Harmony. Luego del análisis por imágenes se adicionaron 15µL del reactivo CellTiter-Go (Promega) y se midió la luminiscencia desarrollada empleando el lector de placa Ensite (Perkin Elmer).

Protocolo de trabajo empleado para los estudios sobre neuritas de ratón

Las neuritas de ratón (células Neuro-2a de neuroblastomas de ratón murino, ATCC Nº CCL-131) fueron cultivadas en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina plus (2mM), suero bovino fetal (*FBS*, 10%), penicilina (100 unidades/mL) y estreptomicina (0,1mg/mL) en una atmósfera de CO₂ (5%) y 95% de humedad. Las células fueron sembradas en portaobjetos Ibidi de vidrio con 18 pocillos y fondo plano con una densidad de 2,3.10⁵ células por pocillo por 24 horas para obtener un 80-90% de confluencia celular. Sobre estos Pocillos fueron inoculadas las soluciones de filamentos y moléculas libres estudiadas.

Para el estudio de la interacción neurita-compuesto fue necesario realizar dos grupos de experimentos independientes debido a la tendencia que tienen los derivados de aminoácidos a formar arquitecturas supramoleculares ordenadas que podrían presentar una potencial actividad citotóxica distinta a la observada para las moléculas independientes en solución. Debido a esto, se decidió emplear una única solución madre de igual concentración para todas las moléculas, la cual luego es dividida en dos partes y fue tratada de manera diferencial para obtener las estructuras preensambladas (filamentos, simbolizados con la letra **F**) o mantener las moléculas libres (**m**).

Para un volumen de solución madre de 1mL y una concentración de 8mM de todas las moléculas, se pesaron las cantidades informadas en la siguiente tabla y se llevaron a volumen con solución de NaOH 0,1M. En todos los casos se sonicó la solución por 5' para garantizar una correcta disagregación de cualquier gránulo de sólido que pudiera demorar en disolverse. La disolución se preparó a temperatura ambiente.

Molécula	Masa a Pesar (mg)
1	1,3
2	1,4
1.a	2
1.b	3,5
1.c	4,9
1.d	2,4
1.e	2,4
1.f	2,4
1.g	5
2.e	2,5
2.f	2,5

Para la obtención de moléculas libres (m): De la solución madre de concentración 8 mM se tomaron 100 μ L, se agregaron 8 μ L de una solución de AQui 1mM, y se llevaron a un volumen final de 400 μ L, empleando agua destilada para obtener una solución de moléculas libres cuya concentración fuera de 2mM.

Para la obtención de filamentos (F): De la solución madre de concentración 8mM se tomaron 100 μ L, se agregaron 8 μ L de una solución de AQui 1mM, y se agregaron 2 μ L de HCl concentrado. Esta solución se homogeneizó empleando un vortex y se dejó estacionar durante 15' para garantizar que se desarrollen las estructuras supramoleculares. La solución resultante se llevó a volumen con agua destilada hasta un valor final de 400 μ L para obtener una solución de filamentos cuya concentración fuera de 2mM en el monómero.

Es importante notar que el agregado de la sonda debe realizarse antes de agregar el ácido para garantizar que la formación de los agregados supramoleculares se lleve a cabo en presencia de la sonda.

Protocolo para la interacción entre neuroblastos de ratón y moléculas libres o filamentos

De las dos soluciones anteriores se tomó una alícuota de 5 o 20 μ L, según la concentración que se desee estudiar, y se agregó a un pocillo que contiene un volumen de 150 μ L de neuroblastos de ratón crecidos en DMEM. Se verificó que el indicador de pH del medio no se altere luego de la inoculación. Los pocillos fueron observados directamente al microscopio sin ningún tiempo de incubación ni preparación previa. El tiempo de medición empleado fue de 15 minutos para ambas alícuotas.

Protocolo de preparación de filamentos (F) y moléculas libres (m)

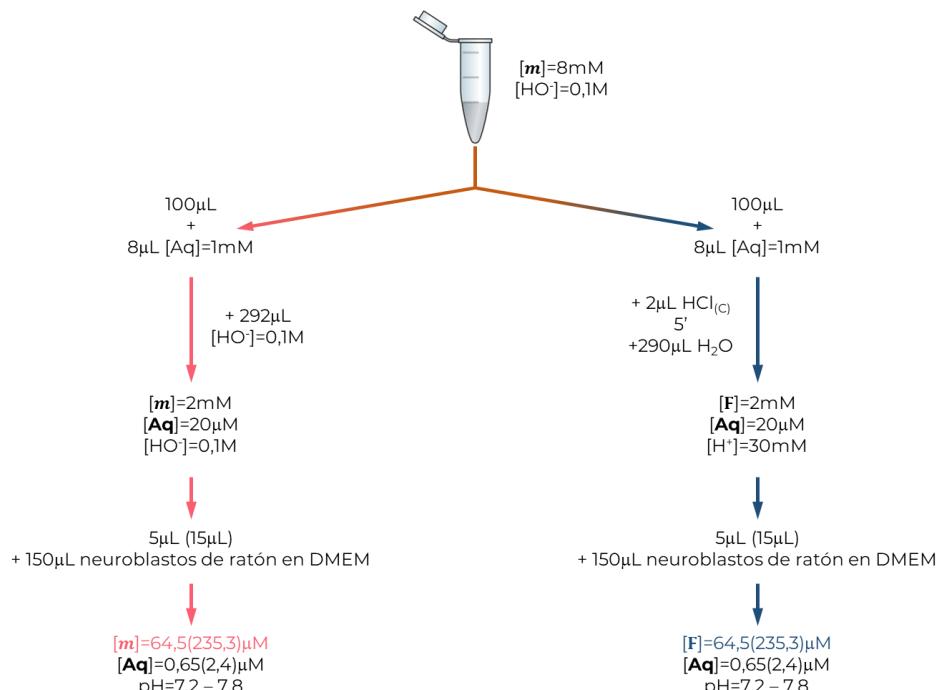


Figura 28. Esquema de trabajo para el proceso de obtención de los ensambles moleculares y las soluciones de moléculas libres empleadas durante los estudios de interacción con neuritas.

Análisis de la formación de estructuras con carácter amiloide por ratiometría empleando una sonda fluorescente sensible al entorno

Todos los estudios de cálculo de proporciones (también conocidos como ensayos *ratiométricos* por el anglicismo de la palabra “*ratio*” para referir al cálculo de proporciones en la intensidad de emisión a longitudes de onda distinta) se realizaron sobre soluciones límpidas de los compuestos. En cada caso se especifica el solvente utilizado y, cuando corresponde, la acidez de este. Para todos los experimentos se realizó el mismo protocolo de preparación de muestra que consiste en suspender una cantidad de compuesto tal que se obtuvo una concentración 50mM en 500µL de solvente, se sonicó por 5’, y se homogeneizó empleando un vortex con posterior centrifugación.

Para los experimentos realizados en medio ácido se empleó HCl 0,1M en agua como solvente. Para aquellos realizados en medio básico se empleó NaOH 0,1M en agua como solvente. Para los realizados en medio acuoso neutro se empleó agua MiliQ como solvente. Para los experimentos en medio orgánico se empleó DMSO como solvente. Para este último solvente, luego de la sonicación y antes de emplear el vortex, las muestras fueron calentadas hasta disolución total del soluto o hasta que el solvente entre en ebullición.

La evaluación de la emisión empleando una $\lambda_{exc}= 480$ nm y una región de adquisición de 510 – 840 nm se realizaron empleando un equipo lector de placas ClarioStar PLUS (Termo Fisher). Debido a que la sonda empleada presenta un máximo de emisión a 630nm en ambientes polares acuosos y un máximo de emisión alrededor de 550nm al estar en presencia de un entorno hidrofóbico,⁶⁷ se utilizaron los valores de intensidad de emisión a estas dos longitudes de onda para calcular la proporción I_{630}/I_{550} .

Protocolo para el estudio de la cinética de formación de agregados supramoleculares empleando la sonda AQui y la sonda ThT

Los experimentos de cinética de agregación empleando ThT o AQui como sondas fluorescentes se llevaron a cabo utilizando DMEM como soluciones buffer. Para ambos sets de experimentos se partió de una solución 2mM del compuesto disuelto en una solución acuosa básica (NaOH 0,1M). Para los experimentos con ThT se tomaron 5µL de esta solución y se depositaron en pocillos de una placa multiwells. En cada uno de estos pocillos se agregó 150 µL de una solución de ThT de concentración 10 µM. Para los experimentos con AQui, se tomaron 15µL de la solución madre del compuesto, agregó 4 µL de solución 1mM de la sonda y 150µL de una solución acuosa de NaOH 0,1M.

Las concentraciones finales de sonda y compuesto para cada set de experimentos fueron de [ThT]=10 µM, [Compuesto]=66,67µM para los experimentos con ThT y de [AQui]=1,8 µM y [Compuesto]=181,81 µM para los experimentos con AQui.

Las mediciones se realizaron sobre cada pocillo con una longitud de onda de excitación de 490nm y colectando la emisión a 630 nm empleando un lector de placas ClarioStar PLUS (Termo Fisher).

Glosario

Péptido Beta amiloide (A β): Es un péptido de 36 a 43 aminoácidos que se obtiene a partir de la proteína precursora amiloidea (APP). Se ha reportado como el principal componente de las **placas** que se encuentran en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer¹⁴ y en la Demencia de cuerpos de Lewy,⁸⁹ en los músculos estriados durante la miositis por cuerpos de inclusión,⁹⁰ y puede formar agregados que cubren vasos sanguíneos cerebrales en la angiopatía amiloide cerebral.⁹¹

Amiloidosis: Es un término utilizado para hacer referencia a un grupo de enfermedades que presentan como característica común el ser causadas por el depósito extracelular de **placas amiloides**.

Amilogénesis: Es como se denomina al proceso de formación de **estructuras amiloides (fibras o filamentos)**.

Actividad amilogénica: Capacidad de dar lugar a la formación de **estructuras amiloides** o, en su defecto, inducir la formación de **estructuras amiloides** en proteínas y péptidos.

Bicapa β : Es una arquitectura estructural equivalente a la **lámina β** , pero obtenida a través del ensamblaje supramolecular de moléculas individuales. Aunque presenta diferencias estructurales muy marcadas respecto a la **lámina β** , conserva su esencia laminar y la orientación excéntrica de los residuos aminoacídicos, confiriéndole así la capacidad de llevar a cabo los fenómenos de plegamiento y apilamiento requeridos para la **amilogénesis**.

Carácter amiloide: Debido a que en la bibliografía actual existe un vasto y extenso grupo de especies moleculares muy distintas entre sí para las cuales se han propuesto diversas estructuras con carácter amiloide,^{15,92,93} se vuelve extremadamente desafiante encontrar una única propiedad que describa a todas ellas y permita explicar la actividad biológica observada para cada una. Con el fin de poder encontrar una condición mínima observada universalmente en todas estas estructuras que sirva como criterio de diferenciación y clasificación, se propone cuantificar el carácter amiloide en términos de la semejanza estructural entre una dada entidad supramolecular y la estructura modelo del péptido **beta amiloide A β** . Esta arquitectura consiste principalmente de una distribución específica de planos de interacción fuerte y débil con distancias características entre sí, que al ensamblarse da lugar a la formación de sólidos longitudinales con forma de **fibra** o **filamento**.

Estructuras amiloides: Son partículas fibriformes generadas a través del ensamblado de moléculas, péptidos o proteínas que presentan estructuras supramoleculares con **características amiloides**. En el marco de este trabajo de tesis se propone la distinción entre dos tipos de estructuras amiloides distintas: aquellas que provienen del plegamiento y posterior ensamblado de péptidos y proteínas, denominadas **Fibras amiloides**, y aquellas que se generan como producto del autoensamblado de moléculas pequeñas, que se denominarán **Filamentos amiloides**.

Fibra amiloide: Son las **estructuras amiloides** generadas por el ensamblado de péptidos o proteínas. Su principal característica, y aquella que la diferencia de los **filamentos amiloides**, es que estas presentan uniones covalentes entre los monómeros que las constituyen.

Filamento amiloide: Son las **estructuras amiloides** generadas por el ensamblado de moléculas individuales. Su principal característica, y aquella que la diferencia de las **fibras amiloides**, es que estos presentan interacciones no covalentes entre los monómeros que los constituyen.

Lámina β : Es la estructura secundaria desarrollada por los péptidos o proteínas que luego se ensamblan para dar lugar a la formación de **estructuras amiloides**. Presenta una serie de características estructurales, como la orientación de los residuos aminoacídicos y la posición relativa de las porciones de la cadena principal, que la vuelven idónea para desarrollar los procesos de plegamiento y apilamiento que se producen durante la **amilogénesis**.

Placas amiloides (también conocidas como Placas neuríticas o Placas seniles): Son cúmulos de la **proteína β amiloide** que se depositan extracelularmente en la sustancia gris del cerebro. Suelen estar asociados con la degeneración de las estructuras neuronales.

Neuritas distróficas: Son procesos neuronales aberrantes que no lograron desarrollar una diferenciación completa. En muchos casos presentan un desarrollo defectuoso de los axones y dendritas o, en su defecto, una invaginación de estos. Se ha observado que algunos tipos de **Placas amiloides** presentan un núcleo de **proteína β amiloide** rodeado de neuritas distróficas.

Bibliografía

- (1) Virchow, R. On a Substance Presenting the Chemical Reaction of Cellulose, Found in the Brain and Spinal Cord of Man. *Journal of Cell Science* **1854**, s1-2 (6), 101–108. <https://doi.org/10.1242/jcs.s1-2.6.101>.
- (2) Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nature Medicine* **2004**, 10 (S7), S10–S17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- (3) Quarta, C. C.; Kruger, J. L.; Falk, R. H. Cardiac Amyloidosis. *Circulation* **2012**, 126 (12), e178–e182. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069195>.
- (4) Rowe, K.; Pankow, J.; Nehme, F.; Salyers, W. Gastrointestinal Amyloidosis: Review of the Literature. *Cureus* **9** (5), e1228. <https://doi.org/10.7759/cureus.1228>.
- (5) Nguyen, T. X.; Naqvi, A.; Thompson, T. L.; Wilson, R. H. Musculoskeletal Manifestations of Amyloidosis: A Focused Review. *J Surg Orthop Adv* **2018**, 27 (1), 1–5.
- (6) Garner, A. Amyloidosis of the Cornea. *Br J Ophthalmol* **1969**, 53 (2), 73–81.
- (7) Dember, L. M. Amyloidosis-Associated Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **2006**, 17 (12), 3458. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050460>.
- (8) Ebert, E. C.; Nagar, M. Gastrointestinal Manifestations of Amyloidosis. *Official journal of the American College of Gastroenterology / ACG* **2008**, 103 (3), 776.
- (9) Morley, J. E.; Farr, S. A. The Role of Amyloid-Beta in the Regulation of Memory. *Biochemical Pharmacology* **2014**, 88 (4), 479–485. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>.
- (10) Esteban, J. A. Living with the Enemy: A Physiological Role for the β -Amyloid Peptide. *Trends in Neurosciences* **2004**, 27 (1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.10.008>.
- (11) Brothers, H. M.; Gosztyla, M. L.; Robinson, S. R. The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2018**, 10.
- (12) Cirrito, J. R.; Yamada, K. A.; Finn, M. B.; Sloviter, R. S.; Bales, K. R.; May, P. C.; Schoepp, D. D.; Paul, S. M.; Mennerick, S.; Holtzman, D. M. Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- β Levels In Vivo. *Neuron* **2005**, 48 (6), 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.028>.
- (13) Coelfen, H.; Antonietti, M. *Mesocrystals and Nonclassical Crystallization*; Wiley: Chichester, England ; Hoboken, NJ, 2008.
- (14) Hamley, I. W. The Amyloid Beta Peptide: A Chemist's Perspective. Role in Alzheimer's and Fibrillization. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (10), 5147–5192. <https://doi.org/10.1021/cr3000994>.
- (15) Shaham-Niv, S.; Adler-Abramovich, L.; Schnaider, L.; Gazit, E. Extension of the Generic Amyloid Hypothesis to Nonproteinaceous Metabolite Assemblies. *Science Advances* **2015**, 1 (7), e1500137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500137>.
- (16) Beach, T. G. A History of Senile Plaques: From Alzheimer to Amyloid Imaging. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **2022**, 81 (6), 387–413. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlac030>.
- (17) Buxbaum, J. N.; Linke, R. P. A Molecular History of the Amyloidoses. *Journal of Molecular Biology* **2012**, 421 (2), 142–159. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.024>.
- (18) Yakupova, E. I.; Bobyleva, L. G.; Vikhlyantsev, I. M.; Bobylev, A. G. Congo Red and Amyloids: History and Relationship. *Bioscience Reports* **2019**, 39 (1), BSR20181415. <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>.

- (19) Girych, M.; Gorbenko, G.; Maliyov, I.; Trusova, V.; Mizuguchi, C.; Saito, H.; Kinnunen, P. Combined Thioflavin T-Congo Red Fluorescence Assay for Amyloid Fibril Detection. *Methods Appl. Fluoresc.* **2016**, *4* (3), 034010. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/3/034010>.
- (20) Hiramatsu, T.; Yamamoto, N.; Ha, S.; Masuda, Y.; Yasuda, M.; Ishigaki, M.; Yuzu, K.; Ozaki, Y.; Chatani, E. Iodine Staining as a Useful Probe for Distinguishing Insulin Amyloid Polymorphs. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 16741. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73460-y>.
- (21) Noormägi, A.; Primar, K.; Tõugu, V.; Palumaa, P. Interference of Low-Molecular Substances with the Thioflavin-T Fluorescence Assay of Amyloid Fibrils. *J Pept Sci* **2012**, *18* (1), 59–64. <https://doi.org/10.1002/psc.1416>.
- (22) Howie, A. J. Origins of a Pervasive, Erroneous Idea: The “Green Birefringence” of Congo Red-Stained Amyloid. *International Journal of Experimental Pathology* **2019**, *100* (4), 208–221. <https://doi.org/10.1111/iep.12330>.
- (23) Fowler, D. M.; Koulov, A. V.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. Functional Amyloid – from Bacteria to Humans. *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, *32* (5), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>.
- (24) Jahn, T. R.; Makin, O. S.; Morris, K. L.; Marshall, K. E.; Tian, P.; Sikorski, P.; Serpell, L. C. The Common Architecture of Cross- β Amyloid. *Journal of Molecular Biology* **2010**, *395* (4), 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.039>.
- (25) Serpell, L. C. Alzheimer’s Amyloid Fibrils: Structure and Assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2000**, *1502* (1), 16–30. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00029-6).
- (26) Diaz-Avalos, R.; Long, C.; Fontano, E.; Balbirnie, M.; Grothe, R.; Eisenberg, D.; Caspar, D. L. D. Cross-Beta Order and Diversity in Nanocrystals of an Amyloid-Forming Peptide. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *330* (5), 1165–1175. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00659-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00659-4).
- (27) Balbirnie, M.; Grothe, R.; Eisenberg, D. S. An Amyloid-Forming Peptide from the Yeast Prion Sup35 Reveals a Dehydrated β -Sheet Structure for Amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (5), 2375–2380. <https://doi.org/10.1073/pnas.041617698>.
- (28) Garti, N.; Somasundaran, P.; Mezzenga, R. *Self-Assembled Supramolecular Architectures: Lyotropic Liquid Crystals*; John Wiley & Sons, 2012.
- (29) Goossens, K.; Lava, K.; Bielawski, C. W.; Binnemans, K. Ionic Liquid Crystals: Versatile Materials. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (8), 4643–4807. <https://doi.org/10.1021/cr400334b>.
- (30) Wincure, B.; Rey, A. D. Growth and Structure of Nematic Spherulites under Shallow Thermal Quenches. *Continuum Mech. Thermodyn.* **2007**, *19* (1), 37–58. <https://doi.org/10.1007/s00161-007-0043-z>.
- (31) Woo, E. M.; Lugito, G. Cracks in Polymer Spherulites: Phenomenological Mechanisms in Correlation with Ring Bands. *Polymers* **2016**, *8* (9), 329. <https://doi.org/10.3390/polym8090329>.
- (32) Hutter, J. L.; Bechhoefer, J. Banded Spherulitic Growth in a Liquid Crystal. *Journal of Crystal Growth* **2000**, *217* (3), 332–343. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(00\)00479-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(00)00479-6).
- (33) Sears, G. W. THE ORIGIN OF SPHERULITES. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65* (10), 1738–1741. <https://doi.org/10.1021/j100827a015>.
- (34) Nehring, J.; Saupe, A. On the Schlieren Texture in Nematic and Smectic Liquid Crystals. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1972**, *68* (0), 1–15. <https://doi.org/10.1039/F29726800001>.

- (35) Braun, H.-G.; Meyer, E. Structure Formation of Ultrathin PEO Films at Solid Interfaces—Complex Pattern Formation by Dewetting and Crystallization. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14* (2), 3254–3264. <https://doi.org/10.3390/ijms14023254>.
- (36) *Crystals Photographed with Polarization Microscopy - The Canadian Nature Photographer.* https://www.canadiannaturephotographer.com/crystals_polarizedlight.html (accessed 2024-01-31).
- (37) *Atlas de Mineralogía Óptica.* <https://www.ehu.eus/mineralogiaoptica/> (accessed 2024-01-31).
- (38) Jin, L.-W.; Claborn, K. A.; Kurimoto, M.; Geday, M. A.; Maezawa, I.; Sohraby, F.; Estrada, M.; Kaminsky, W.; Kahr, B. Imaging Linear Birefringence and Dichroism in Cerebral Amyloid Pathologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (26), 15294–15298. <https://doi.org/10.1073/pnas.2534647100>.
- (39) Crist, B.; Schultz, J. M. Polymer Spherulites: A Critical Review. *Progress in Polymer Science* **2016**, *56*, 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.11.006>.
- (40) Lee, J.-H.; Kamal, T.; V. Roth, S.; Zhang, P.; Park, S.-Y. Structures and Alignment of Anisotropic Liquid Crystal Particles in a Liquid Crystal Cell. *RSC Advances* **2014**, *4* (76), 40617–40625. <https://doi.org/10.1039/C4RA06221C>.
- (41) Turner, M. J.; Thomas, S. P.; Shi, M. W.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. Energy Frameworks: Insights into Interaction Anisotropy and the Mechanical Properties of Molecular Crystals. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (18), 3735–3738. <https://doi.org/10.1039/C4CC09074H>.
- (42) Zaguri, D.; Shaham-Niv, S.; Chakraborty, P.; Arnon, Z.; Makam, P.; Bera, S.; Rencus-Lazar, S.; Stoddart, P. R.; Gazit, E.; Reynolds, N. P. Nanomechanical Properties and Phase Behavior of Phenylalanine Amyloid Ribbon Assemblies and Amorphous Self-Healing Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (19), 21992–22001. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c01574>.
- (43) Uyaver, S.; Hernandez, H. W.; Habiboglu, M. G. Self-Assembly of Aromatic Amino Acids: A Molecular Dynamics Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (48), 30525–30536. <https://doi.org/10.1039/C8CP06239K>.
- (44) Mossou, E.; Teixeira, S. C. M.; Mitchell, E. P.; Mason, S. A.; Adler-Abramovich, L.; Gazit, E.; Forsyth, V. T. The Self-Assembling Zwitterionic Form of l-Phenyl-alanine at Neutral pH. *Acta Cryst C* **2014**, *70* (3), 326–331. <https://doi.org/10.1107/S2053229614002563>.
- (45) Richardson, J. S.; Richardson, D. C. Natural β -Sheet Proteins Use Negative Design to Avoid Edge-to-Edge Aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (5), 2754–2759. <https://doi.org/10.1073/pnas.052706099>.
- (46) Lührs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Döbeli, H.; Schubert, D.; Riek, R. 3D Structure of Alzheimer's Amyloid- β (1–42) Fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (48), 17342–17347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506723102>.
- (47) Kirschner, D. A.; Abraham, C.; Selkoe, D. J. X-Ray Diffraction from Intraneuronal Paired Helical Filaments and Extraneuronal Amyloid Fibers in Alzheimer Disease Indicates Cross-Beta Conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83* (2), 503–507. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.2.503>.
- (48) Balbach, J. J.; Petkova, A. T.; Oyler, N. A.; Antzutkin, O. N.; Gordon, D. J.; Meredith, S. C.; Tycko, R. Supramolecular Structure in Full-Length Alzheimer's β -Amyloid Fibrils: Evidence for a Parallel β -Sheet Organization from Solid-State Nuclear

- Magnetic Resonance. *Biophysical Journal* **2002**, *83* (2), 1205–1216.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75244-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75244-2).
- (49) Adler-Abramovich, L.; Vaks, L.; Carny, O.; Trudler, D.; Magno, A.; Caflisch, A.; Frenkel, D.; Gazit, E. Phenylalanine Assembly into Toxic Fibrils Suggests Amyloid Etiology in Phenylketonuria. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (8), 701–706.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.1002>.
- (50) Adamcik, J.; Berquand, A.; Mezzenga, R. Single-Step Direct Measurement of Amyloid Fibrils Stiffness by Peak Force Quantitative Nanomechanical Atomic Force Microscopy. *Applied Physics Letters* **2011**, *98* (19), 193701.
<https://doi.org/10.1063/1.3589369>.
- (51) Gilbert, J.; Charnley, M.; Cheng, C.; Reynolds, N. P.; Jones, O. G. Quantifying Young's Moduli of Protein Fibrils and Particles with Bimodal Force Spectroscopy. *Biointerphases* **2017**, *12* (4), 041001. <https://doi.org/10.1116/1.4996447>.
- (52) Ménard-Moyon, C.; Venkatesh, V.; Krishna, K. V.; Bonachera, F.; Verma, S.; Bianco, A. Self-Assembly of Tyrosine into Controlled Supramolecular Nanostructures. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (33), 11681–11686. <https://doi.org/10.1002/chem.201502076>.
- (53) Movilla, F.; Rey, J. M.; Huck-Iriart, C.; Di Salvo, F. Amine-Derivatized L-Phenylalanine and L-Tyrosine as Versatile Self-Assembled Platforms of Diverse Supramolecular Architectures: From Mesocrystals to Organogels. *Crystal Growth & Design* **2021**, *21* (6), 3487–3499. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00274>.
- (54) Anand, B. G.; Prajapati, K. P.; Shekhawat, D. S.; Kar, K. Tyrosine-Generated Nanostructures Initiate Amyloid Cross-Seeding in Proteins Leading to a Lethal Aggregation Trap. *Biochemistry* **2018**, *57* (35), 5202–5209.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00472>.
- (55) Xue, W.-F.; Hellewell, A. L.; Gosai, W. S.; Homans, S. W.; Hewitt, E. W.; Radford, S. E. Fibril Fragmentation Enhances Amyloid Cytotoxicity * ♦. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (49), 34272–34282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.049809>.
- (56) Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. Amyloid- β Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat Med* **2008**, *14* (8), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>.
- (57) Campbell, A. β -Amyloid: Friend or Foe. *Medical Hypotheses* **2001**, *56* (3), 388–391.
<https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1212>.
- (58) Lee, H.; Casadesus, G.; Zhu, X.; Joseph, J. A.; Perry, G.; Smith, M. A. Perspectives on the Amyloid- β Cascade Hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease* **2004**, *6* (2), 137–145. <https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6205>.
- (59) Singh, V.; Rai, R. K.; Arora, A.; Sinha, N.; Thakur, A. K. Therapeutic Implication of L-Phenylalanine Aggregation Mechanism and Its Modulation by D-Phenylalanine in Phenylketonuria. *Scientific Reports* **2014**, *4* (1), 3875.
<https://doi.org/10.1038/srep03875>.
- (60) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting. (57th : 2001: Rome, I. *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*; World Health Organization, 2002. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42501> (accessed 2023-07-31).
- (61) Gschwend, G.; Jenkins, C.; Jones, A.; Kelso, C.; Morgan, J. A Wide Range of Flavoring-Carrier Fluid Adducts Form in E-Cigarette Liquids. *Chem. Res. Toxicol.* **2023**, *36* (1), 14–22. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00200>.
- (62) Gennes, P. G. de; Prost, J. *The Physics of Liquid Crystals*; Clarendon Press, 1993.

- (63) Grunwald, M. A.; Hagenlocher, S. E.; Turkanovic, L.; Bauch, S. M.; Wachsmann, S. B.; Altevogt, L. A.; Ebert, M.; Knöller, J. A.; Raab, A. R.; Schulz, F.; Kolmangadi, M. A.; Zens, A.; Huber, P.; Schönhals, A.; Bilitiewski, U.; Laschat, S. Does Thermotropic Liquid Crystalline Self-Assembly Control Biological Activity in Amphiphilic Amino Acids? – Tyrosine ILCs as a Case Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, 25 (26), 17639–17656. <https://doi.org/10.1039/D3CP00485F>.
- (64) Huang, Z.; Zhang, J.; Liu, Y.; Song, A.; Hao, J. Phenylalanine-Based Ionic Liquid Crystals with Water-Induced Phase Transition Behaviors. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, 301, 112399. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112399>.
- (65) Clark, T.; Murray, J. S.; Lane, P.; Politzer, P. Why Are Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfone Such Good Solvents? *J Mol Model* **2008**, 14 (8), 689–697. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0279-y>.
- (66) Roos, N. Entropic Forces in Brownian Motion. *American Journal of Physics* **2014**, 82 (12), 1161–1166. <https://doi.org/10.1119/1.4894381>.
- (67) Fueyo-González, F.; González-Vera, J. A.; Alkorta, I.; Infantes, L.; Jimeno, M. L.; Aranda, P.; Acuña-Castroviejo, D.; Ruiz-Arias, A.; Orte, A.; Herranz, R. Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation In Vitro and in Zebrafish. *ACS Sens.* **2020**, 5 (9), 2792–2799. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00587>.
- (68) Yeasmin Khusbu, F.; Zhou, X.; Chen, H.; Ma, C.; Wang, K. Thioflavin T as a Fluorescence Probe for Biosensing Applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, 109, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.013>.
- (69) Sancataldo, G.; Anselmo, S.; Vetrici, V. Phasor-FLIM Analysis of Thioflavin T Self-Quenching in Concanavalin Amyloid Fibrils. *Microscopy Research and Technique* **2020**, 83 (7), 811–816. <https://doi.org/10.1002/jemt.23472>.
- (70) Synaptic Vesicle. *Wikipedia*; 2023.
- (71) Brückner, B. R.; Janshoff, A. Importance of Integrity of Cell-Cell Junctions for the Mechanics of Confluent MDCK II Cells. *Sci Rep* **2018**, 8 (1), 14117. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32421-2>.
- (72) Bronfman, F. C.; Fernandez, H. L.; Inestrosa, N. C. Amyloid Precursor Protein Fragment and Acetylcholinesterase Increase with Cell Confluence and Differentiation in a Neuronal Cell Line. *Experimental Cell Research* **1996**, 229 (1), 93–99. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0347>.
- (73) Bueno, C.; Martínez-Morga, M.; García-Bernal, D.; Moraleda, J. M.; Martínez, S. Differentiation of Human Adult-Derived Stem Cells towards a Neural Lineage Involves a Dedifferentiation Event Prior to Differentiation to Neural Phenotypes. *Sci Rep* **2021**, 11 (1), 12034. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91566-9>.
- (74) Dashinimaev, E. B.; Artyuhov, A. S.; Bolshakov, A. P.; Vorotelyak, E. A.; Vasiliev, A. V. Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Patients with Down Syndrome Reproduce Early Stages of Alzheimer’s Disease Type Pathology in Vitro. *Journal of Alzheimer’s Disease* **2017**, 56 (2), 835–847. <https://doi.org/10.3233/JAD-160945>.
- (75) Santama, N.; Dotti, C. G.; Lamond, A. I. Neuronal Differentiation in the Rat Hippocampus Involves a Stage-Specific Reorganization of Subnuclear Structure Both In Vivo and In Vitro. *European Journal of Neuroscience* **1996**, 8 (5), 892–905. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01576.x>.
- (76) Warashina, M.; Min, K. H.; Kuwabara, T.; Huynh, A.; Gage, F. H.; Schultz, P. G.; Ding, S. A Synthetic Small Molecule That Induces Neuronal Differentiation of Adult Hippocampal Neural Progenitor Cells. *Angewandte Chemie* **2006**, 118 (4), 605–607. <https://doi.org/10.1002/ange.200503089>.

- (77) Kim, G.-H.; Halder, D.; Park, J.; Namkung, W.; Shin, I. Imidazole-Based Small Molecules That Promote Neurogenesis in Pluripotent Cells. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (35), 9425–9428. <https://doi.org/10.1002/ange.201404871>.
- (78) Lou, S.; Huang, T.; Qi, J.; Zhang, T.; Gao, J.; Cui, S. Discovery of (2-Phenylthiazol-4-Yl)Urea Derivatives That Induce Neuronal Differentiation from Mesenchymal Stem Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2022**, *69*, 128798. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128798>.
- (79) Li, X.; Zuo, X.; Jing, J.; Ma, Y.; Wang, J.; Liu, D.; Zhu, J.; Du, X.; Xiong, L.; Du, Y.; Xu, J.; Xiao, X.; Wang, J.; Chai, Z.; Zhao, Y.; Deng, H. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell* **2015**, *17* (2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.003>.
- (80) Ninomiya, I.; Koyama, A.; Otsu, Y.; Onodera, O.; Kanazawa, M. Regeneration of the Cerebral Cortex by Direct Chemical Reprogramming of Macrophages into Neuronal Cells in Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2023**, *17*.
- (81) Gao, L.; Guan, W.; Wang, M.; Wang, H.; Yu, J.; Liu, Q.; Qiu, B.; Yu, Y.; Ping, Y.; Bian, X.; Shen, L.; Pei, G. Direct Generation of Human Neuronal Cells from Adult Astrocytes by Small Molecules. *Stem Cell Reports* **2017**, *8* (3), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.014>.
- (82) Kim, E.; Tae, G. Direct Reprogramming and Biomaterials for Controlling Cell Fate. *Biomaterials Research* **2016**, *20* (1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40824-016-0086-y>.
- (83) Wurdak, H.; Zhu, S.; Min, K. H.; Aimone, L.; Lairson, L. L.; Watson, J.; Chopiuk, G.; Demas, J.; Charette, B.; Halder, R.; Weerapana, E.; Cravatt, B. F.; Cline, H. T.; Peters, E. C.; Zhang, J.; Walker, J. R.; Wu, C.; Chang, J.; Tuntland, T.; Cho, C. Y.; Schultz, P. G. A Small Molecule Accelerates Neuronal Differentiation in the Adult Rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (38), 16542–16547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010300107>.
- (84) An, J.; Chen, B.; Tian, D.; Guo, Y.; Yan, Y.; Yang, H. Regulation of Neurogenesis and Neuronal Differentiation by Natural Compounds. *Current Stem Cell Research & Therapy* **2022**, *17* (8), 756–771. <https://doi.org/10.2174/1574888X16666210907141447>.
- (85) Ponuwei, G. A.; Dash, P. R. Bleb Formation in Human Fibrosarcoma HT1080 Cancer Cell Line Is Positively Regulated by the Lipid Signalling Phospholipase D2 (PLD2). *Achievements in the Life Sciences* **2016**, *10* (2), 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.001>.
- (86) Freude, K. K.; Penjwini, M.; Davis, J. L.; LaFerla, F. M.; Blurton-Jones, M. Soluble Amyloid Precursor Protein Induces Rapid Neural Differentiation of Human Embryonic Stem Cells *. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (27), 24264–24274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227421>.
- (87) Chasseigneaux, S.; Dinc, L.; Rose, C.; Chabret, C.; Couplier, F.; Topilko, P.; Mauger, G.; Allinquant, B. Secreted Amyloid Precursor Protein β and Secreted Amyloid Precursor Protein α Induce Axon Outgrowth In Vitro through Egr1 Signaling Pathway. *PLOS ONE* **2011**, *6* (1), e16301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016301>.
- (88) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- (89) Siderowf, A.; Aarsland, D.; Mollenhauer, B.; Goldman, J. G.; Ravina, B. Biomarkers for Cognitive Impairment in Lewy Body Disorders: Status and Relevance for Clinical Trials. *Movement Disorders* **2018**, *33* (4), 528–536. <https://doi.org/10.1002/mds.27355>.

- (90) Kitazawa, M.; Vasilevko, V.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M. Immunization with Amyloid- β Attenuates Inclusion Body Myositis-Like Myopathology and Motor Impairment in a Transgenic Mouse Model. *J. Neurosci.* **2009**, 29 (19), 6132–6141. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1150-09.2009>.
- (91) Verbeek, M. M.; Waal, R. M. de; Vinters, H. V. *Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer's Disease and Related Disorders*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (92) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75 (1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
- (93) Sawaya, M. R.; Hughes, M. P.; Rodriguez, J. A.; Riek, R.; Eisenberg, D. S. The Expanding Amyloid Family: Structure, Stability, Function, and Pathogenesis. *Cell* **2021**, 184 (19), 4857–4873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.013>.

"Buscar algo es creer en sus posibilidades"

J.

Capítulo VI

Propiedades mecánicas y ópticas
de materiales cristalinos
bioinspirados

ÍNDICE DEL CAPÍTULO VI

Introducción	350
Ingeniería cristalina para el diseño de biomateriales innovadores	350
Formas cristalinas y métodos de selección experimental	356
Adenina.....	356
Guanina.....	357
Cafeína.....	359
Resultados y Discusión	362
Análisis de las estructuras cristalinas reportadas para adenina, guanina y cafeína	362
Incidencia de aparición de las distintas formas cristalinas ..	362
Estudio de las propiedades estructurales y mecánicas de las estructuras cristalinas reportadas	363
Materiales basados en adenina, guanina y cafeína	369
Síntesis y caracterización estructural	369
Estudio de propiedades mecánicas	374
Síntesis de materiales híbridos bioinspirados	376
Herramientas para la predicción de la capacidad de albergar moléculas exógenas emparentadas estructuralmente	376
Estudio de las propiedades mecánicas de los materiales híbridos.....	383
Estudio de las propiedades ópticas en los materiales híbridos	386
Conclusiones y perspectivas	393
Experimental.....	395
Instrumentación	395
Síntesis de los materiales cristalinos	397
Medidas de la propiedad de guiado de ondas.....	398
Medidas de elasticidad.....	398
Información suplementaria del capítulo VI.....	400
Publicaciones y presentaciones de los resultados de este capítulo	404

Bibliografía.....	405
-------------------	-----

Introducción

Ingeniería cristalina para el diseño de biomateriales innovadores

La meta principal de la ingeniería cristalina es poder diseñar materiales de forma tal de controlar sus propiedades finales. Pero, para que esto suceda, es necesario contar con información adecuada sobre la estructura y los factores que gobiernan el empaquetamiento cristalino. Por este motivo, resulta esencial disponer de herramientas experimentales y estrategias de síntesis que permitan controlar de manera precisa la topología del material obtenido.

De todas las propiedades que se desean controlar en un material, las mecánicas son una de las que mayor impacto tienen sobre sus posibles aplicaciones tecnológicas. Estas propiedades están directamente relacionadas con el movimiento molecular frente a estímulos externos. Tanto la plasticidad, como la elasticidad y la fragilidad implican la migración de los bloques de construcción del material respecto de sus posiciones de equilibrio.¹ Otros casos más extremos como los llamados “cristales saltarines” (del inglés “*jumping crystals*”), donde la transformación de energía térmica o lumínica en mecánica, también se fundamentan en la misma necesidad de migración molecular.²

Para comprender las distintas respuestas mecánicas observadas en los materiales cristalinos podemos pensar a estos en términos de un arreglo de regiones de respuesta colectiva y zonas de amortiguación.

Las regiones de respuesta colectiva son conjuntos de bloques de construcción (moléculas, iones o átomos) que se encuentran interactuando con una intensidad tal, que alterar la posición de uno de sus componentes conlleva a traccionar la totalidad del conjunto. La fuerza aplicada sobre uno de los componentes de esta región es trasladada a todos los del conjunto a través de las interacciones que los conectan, dando lugar a la generación de una respuesta mecánica colectiva.

Por otro lado, las zonas de amortiguación son aquellas regiones dentro de la estructura cristalina donde esta distribución isotrópica de interacciones entre bloques se ve interrumpida. Esto independiza a estas regiones de cualquier estímulo mecánico y las vuelve capaces de tolerar una alteración de las posiciones de los bloques de construcción que las rodea, debido a que no están unidas fuertemente a estos. Esta tolerancia se interrumpe cuando los bloques se encuentran tan próximos que disparan la acción de una fuerza restitutiva.

La naturaleza, distribución y orientación relativa de estas regiones dentro de la estructura permite predecir la respuesta mecánica de un cristal único al ser sometido a cierto tipo de deformación (Figura 1).

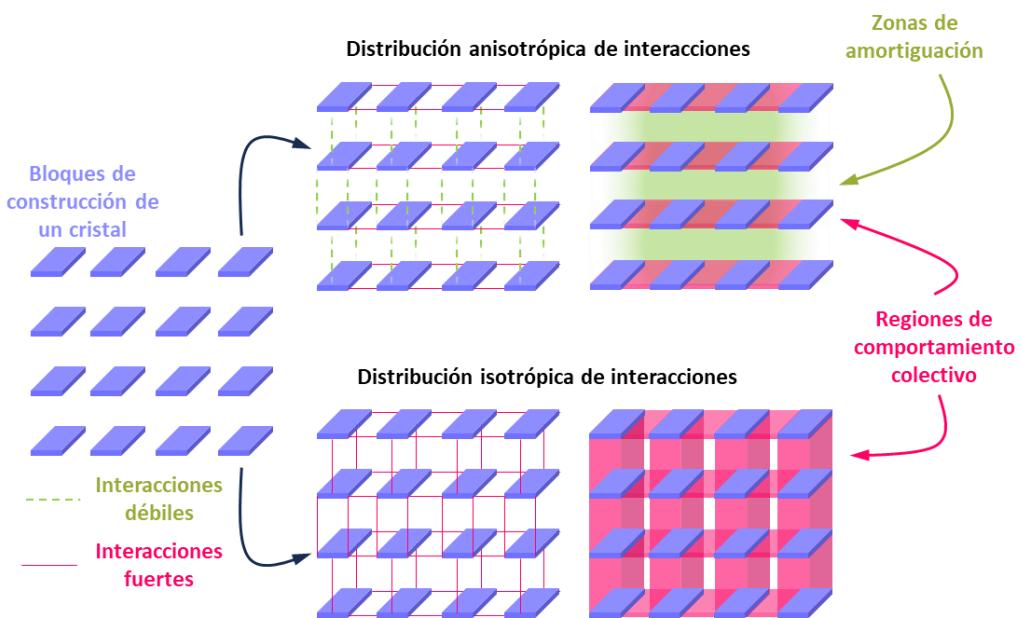


Figura 1. Esquema de la distribución de zonas de amortiguación y regiones de respuesta colectiva en cristales únicos con distribuciones isotrópicas y anisotrópicas de interacciones.

Una de las principales diferencias que surge entre las sales y los sistemas neutros bajo este modelo es la capacidad de tolerar un corrimiento en las distancias de equilibrio de sus constituyentes. Aunque ambos sistemas están estabilizados por la acción conjunta de fuerzas repulsivas y atractivas, la dependencia con la distancia de los potenciales de acción de las fuerzas que los equilibran es muy distinta.

Los compuestos neutros están estabilizados, principalmente, por la interacción dispersiva que se desarrolla entre las nubes electrónicas de sus componentes, o a través de interacciones electroestáticas si estas se generan entre los dipolos permanentes de sus moléculas. Esta interacción tiene un potencial que depende de la inversa del cubo de la distancia entre los dipolos ($U \propto (\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2)/\Delta r^3$) y su naturaleza atractiva o repulsiva está dada por la orientación relativa entre ellos. Por el contrario, los sistemas iónicos se estabilizan gracias a la interacción electroestática entre partículas de carga neta. La dependencia del potencial de esta interacción con la distancia entre partículas es inversamente proporcional a la distancia ($U \propto (q_+ \cdot q_-)/\Delta r$) y tiene un carácter estrictamente isotrópico. En un modelo simplificado se va a cumplir que dos partículas de carga opuesta se atraerán siempre, sin importar la orientación relativa entre ellas.³ Comparando ambos potenciales de interacción en el vacío podemos observar que, frente a una variación equivalente en las posiciones de equilibrio de ambos sistemas, la energía restitutiva desarrollada debido a la repulsión será mayor para aquellos sistemas modulados por la interacción electroestática (Figura 2).

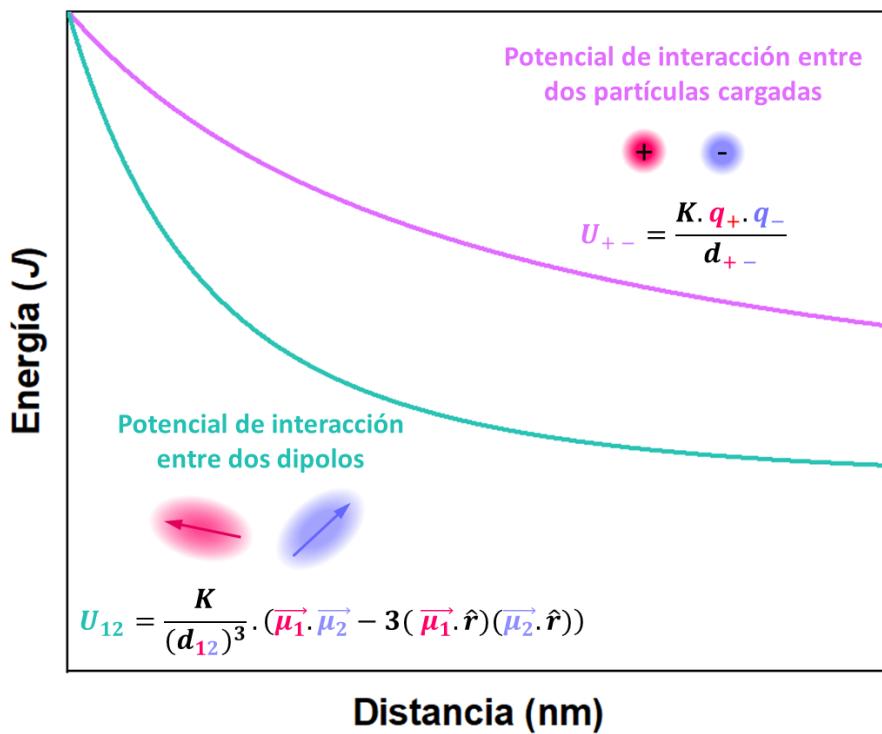


Figura 2. Potenciales de interacción entre partículas cargadas y entre partículas con momento dipolar permanente. Este modelo simplificado será empleado para establecer las herramientas de análisis empleadas en el estudio de las propiedades mecánicas en sólidos cristalinos.

Para obtener una respuesta mecánica elástica en un material cristalino necesitamos contar con una distribución anisotrópica de fuerzas de interacción entre los bloques de construcción que dé lugar a una compensación parcial del efecto reconstitutivo de estas. Mientras que las regiones de comportamiento colectivo son capaces de desplazarse para hacer frente a la deformación sin incurrir en la rotura del material, las zonas de amortiguación toleran este desplazamiento hasta que la repulsión generada por la proximidad entre bloques equilibre la fuerza aplicada. Si esta fuerza desaparece, la propia repulsión desarrollada actuará como una especie de “resorte que fue comprimido”, desplazando las regiones de respuesta colectiva con el fin de relajar la estructura y “reacomodar” los bloques en sus posiciones de equilibrio, recuperando así las posiciones originales. Al mismo tiempo, estas interacciones repulsivas estarán fuertemente asistidas por las interacciones atractivas que también harán su aporte para recuperar las posiciones de equilibrio.

La clave del desarrollo de una respuesta elástica reside entonces en la orientación relativa entre estas dos regiones respecto al estímulo aplicado. Si el estímulo es aplicado en el mismo eje en que las zonas de amortiguación son capaces de generar una respuesta resistente, la alteración generada se verá rápidamente compensada y el material actuará de manera rígida. Sin embargo, si el estímulo se aplica en un ángulo respecto a este eje de amortiguación, las regiones de respuesta colectiva se desplazarán una dada distancia hasta que se “activen” las repulsiones y se desarrolle la respuesta restitutiva de las zonas de amortiguación (Figura 3.b).

Si un material cristalino carece de regiones de amortiguación o, por el contrario, cuenta con una distribución isotrópica de las mismas, se desarrollarán respuestas

mecánicas muy distintas frente al mismo estímulo. Por un lado, carecer de zonas de amortiguación implica que no existirá en la estructura una región capaz de dar lugar a la generación de una fuerza restitutiva. Esto significa que el material tendrá la capacidad de tolerar las deformaciones, pero no así de reacomodar la estructura luego de haber sido deformada. El tipo de respuesta mecánica observada podrá ser tanto del tipo flexible o rígida, según la orientación en la que se aplique el estímulo externo (Figura 3.a).

Por otro lado, la presencia de una distribución isotrópica de zonas de amortiguación dará como resultado una respuesta rígida en todas las direcciones en la que se la intente deformar, debido a que es capaz de desarrollar repulsiones en todas las direcciones, aún frente a desplazamientos muy pequeños de sus regiones de respuesta colectiva (Figura 3.c).

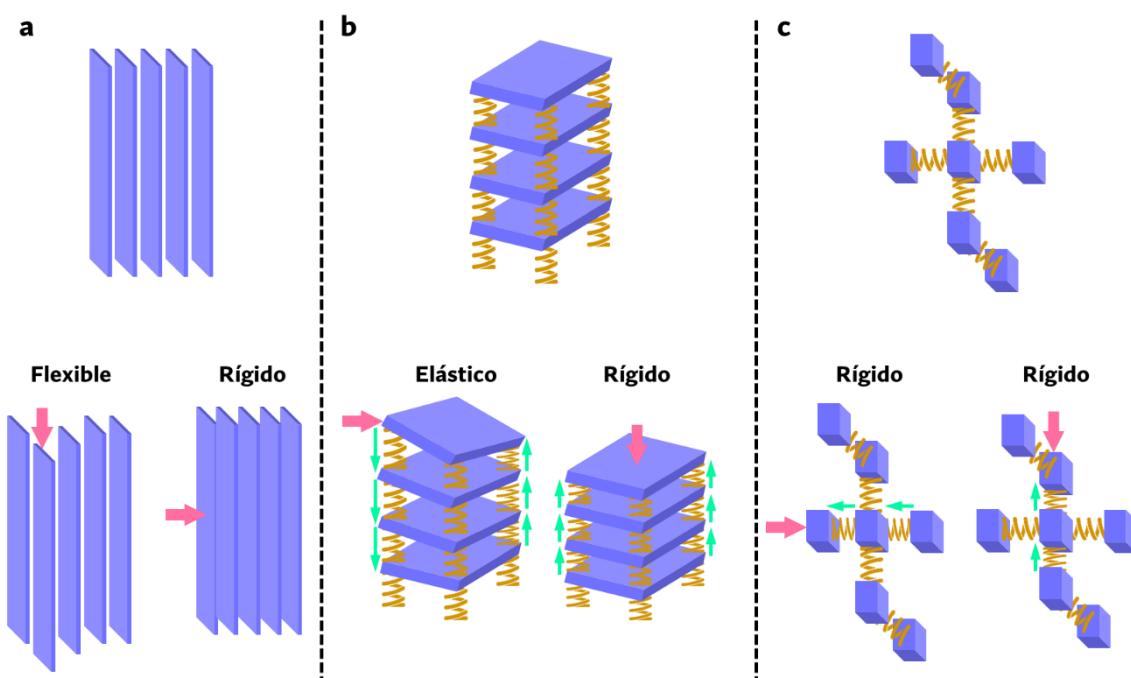


Figura 3. Distintas distribuciones posibles de regiones de respuesta colectiva (bloques azules) y zonas de amortiguación (resortes amarillos): (a) Material sin zonas de amortiguación, (b) Material con una distribución anisotrópica de ambas zonas, (c) Material con una distribución isotrópica de ambas zonas. En rosa se representa la acción de una fuerza externa y las posibles respuestas que puede desarrollar cada material. En flechas verdes se representa la acción de las fuerzas reconstitutivas.

Los monocrstales orgánicos son un tipo de material que presenta una amplia gama de propiedades muy interesantes, entre las que se destacan aquellas vinculadas a tecnologías ópticas u optoelectrónicas. Por ejemplo, se han propuesto como posibles guías de onda,⁴⁻⁶ matrices sólidas para el desarrollo de láseres,^{7,8} y fotodiodos, entre otras.⁹⁻¹¹ Adicionalmente, algunos de ellos han presentado una respuesta mecánica flexible, lo que abrió la posibilidad de pensar nuevas aplicaciones para estos materiales.^{12,13} Recientemente, el diseño y la obtención de monocrstales orgánicos con una respuesta flexible reversible y propiedades ópticas u optoelectrónicas específicas, ha despertado un gran interés para su aplicación en la miniaturización de nuevas tecnologías. Los primeros materiales elásticos basados en monocrstales orgánicos reportados fueron sintetizados

por Ghosh y Reddy en 2012, quienes reportaron la obtención de co-cristales de cafeína, un derivado del ácido benzoico, e hidróxido de sodio, con una morfología elongada y que podían deformarse reversiblemente luego de ser flexionados.¹⁴

Desde que se tuvo registro por primera vez de esta propiedad de elasticidad asociada a materiales cristalinos, se han reportado varios tipos distintos de cristales únicos elásticos que incluyen sistemas dopados,¹⁵ compuestos de coordinación flexibles,¹⁶ y cristales biogénicos.¹⁷ Hasta se ha encontrado un caso de una sal orgánica, el cloruro de clofazimina, generada espontáneamente en sistemas biológicos que presentó esta respuesta mecánica tan peculiar.¹⁷ Más allá del enorme interés que han despertado este tipo de materiales, la cantidad de cristales elásticos reportados en bibliografía sigue siendo aún muy limitada. Además, varias interrogantes respecto a la correlación que existe entre su estructura cristalina y sus propiedades mecánicas siguen sin ser contestadas. Por lo tanto, más allá de que esta escueta cantidad de ejemplos impone ciertas limitaciones a la hora de diseñar materiales semejantes, también pone de manifiesto la necesidad de una comprensión más profunda de la naturaleza de esta relación para facilitar el diseño racional de nuevos materiales con una respuesta mecánica similar.

Esencialmente, predecir las capacidades de respuesta mecánica frente a la deformación para sistemas cristalinos implica una tarea dual. Por un lado, debemos entender en detalle cómo está organizada la red supramolecular de interacciones entre los bloques de construcción para detectar anisotropías y, por otro lado, debemos tener la capacidad de predecir cómo será el hábito cristalino de los cristales desarrollados, para poder ubicar la red de interacciones estudiada en relación a las caras mayores y menores del cristal. La morfología adquirida por el hábito cristalino impone algunas restricciones a la distribución de tensiones en el material y canaliza las fuerzas generadas por la deformación en ciertas regiones específicas. Esto se debe a que las deformaciones sufridas por un cuerpo tridimensional están directamente relacionadas con los momentos de inercia que se generan al aplicarle una fuerza.¹⁸ Estudiar cómo se aplica esta red de momento iniciales sobre las regiones de respuesta colectiva de la estructura nos permite predecir como será la respuesta mecánica total observada.

A modo de ejemplo, si pensamos en un hábito cristalino con forma de prisma elongado, este será más susceptible a la deformación por doblado que aquellos hábitos con un factor de forma menor, como los ocurre con los cúbicos o esféricos. Esto sucederá independientemente de la identidad del material que estemos deformando. La relación entre la longitud total, tomando como referencia la dirección de mayor extensión, el área transversal y la fuerza máxima aplicada en el punto de fractura, permiten calcular el estrés máximo tolerado (σ) (Figura 4). En resumen, predecir la capacidad de desarrollar estructuras cristalinas flexibles implica estudiar simultáneamente la anisotropía de distribución de interacciones de la estructura y de morfología del hábito cristalino.

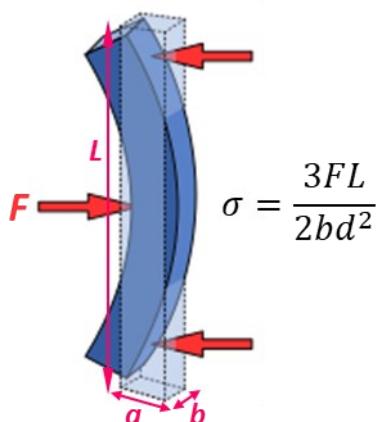


Figura 4. Estrés máximo tolerado para el doblado de una barra rectangular. Este esquema es aplicable al caso de un cristal con morfología de prisma extendido.

Las purinas son una familia de biomoléculas que incluyen bases nitrogenadas, como la adenina y la guanina, productos metabólicos de degradación, como la hipoxantina, la xantina y el ácido úrico, y algunos alcaloides biológicamente activos como la cafeína, la teofilina y la teobromina (Figura 5).¹⁹ Su relación estructural con una gran cantidad de compuestos biológicos las ha vuelto muy atractivas para el desarrollo de nuevos compuestos farmacológicamente activos como las drogas oncológicas tioguanina y el pentostatin,²⁰ drogas antitumorales como la vidarabina,²¹ antivirales como el aciclovir, ganciclovir y penciclovir,²² y drogas de inmunosupresión como la azatiprina.²³

Por otro lado, los sistemas basados en purinas también tienen una labor estructural en la naturaleza. Por ejemplo, se ha reportado que la guanina cumple un rol fundamental como bloque de construcción de varios materiales cristalinos asociados a fenómenos de coloración estructural en seres vivos.^{24,25} Además, estos sistemas presentan la posibilidad de modular sus propiedades ópticas a través de la inclusión de ciertas moléculas en su estructura, lo que los vuelve aún más atractivos para el diseño de nuevos materiales bioinspirados con aplicación tecnológica.²⁶

Considerando sus propiedades supramoleculares, los materiales biogénicos que ya se han reportado para estas moléculas, la factibilidad de ser adquiridas comercialmente como sólidos cristalinos de alta pureza, su biocompatibilidad intrínseca, y el hecho de que presentan diversas formas cristalinas, como polimorfos, hidratos y sales, que pueden ser obtenidas mediante protocolos experimentales accesibles, de todas las purinas de relevancia biológica, se han seleccionado la **Adenina**, la **Guanina** y la **Cafeína** como bloques de construcción para el desarrollo de los nuevos materiales sintetizados durante este trabajo de tesis (Figura 5).

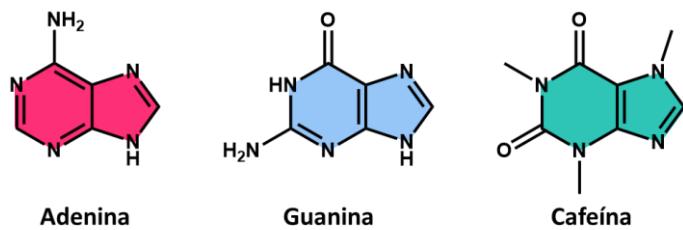


Figura 5. Estructura molecular la Adenina, la Guanina y la Cafeína.

Como se discutirá en el apartado correspondiente más adelante, las diferentes funcionalidades supramoleculares presentes en estas tres moléculas permiten obtener diversas formas cristalinas para cada una de ellas. No obstante, durante este trabajo de tesis se pondrá el foco en la síntesis de materiales cristalinos con respuestas mecánicas específicas, como la elasticidad y la plasticidad, con el fin de estudiar cuál es la correlación que existe entre estas y la estructura cristalina que las genera. En los tres casos se pondrá de manifiesto la estrecha relación que existe entre las propiedades mecánicas observadas, la facilidad de adquirir carga, dado que se trabajará con especies neutras y protonadas, y la capacidad de desarrollar sales cristalinas.

Formas cristalinas y métodos de selección experimental

Adenina

Actualmente existen reportadas en bibliografía tres formas cristalinas distintas para la adenina neutra: El polimorfo anhidro 1,²⁷ el polimorfo anhidro 2,²⁸ y la adenina trihidrato.²⁹ Respecto a sus sales, se encuentran reportados el cloruro de adeninio monohidratado,³⁰ y el dicloruro de adeninio.³¹ Las formas anhidras se sintetizan a partir de soluciones acuosas neutras, mientras que las sales son cristalizadas a partir de soluciones ácidas y en presencia de aniones cloruro. Todos estos materiales pueden identificarse y caracterizarse analizando sus patrones de difracción de rayos X de polvos (Figura 6).

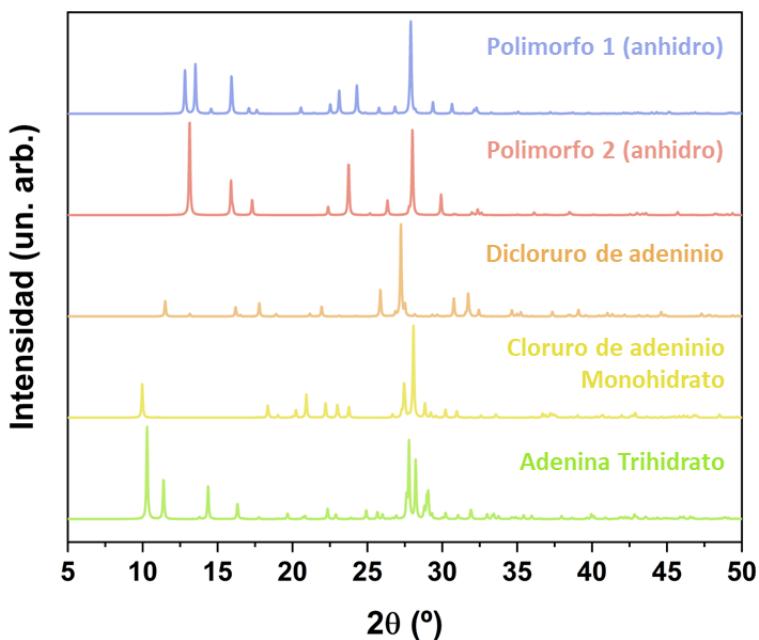


Figura 6. Formas sólidas reportadas en bibliografía para la adenina y sus sales de cloruro.

Guanina

Los cristales biogénicos de guanina están entre los materiales cristalinos orgánicos más comunes que se pueden encontrar en los organismos vivos.²⁴ Estos cristales están asociados a muchos de los colores más brillantes y atractivos que se pueden apreciar en la naturaleza, como el color blanco mate en algunos peces,²⁵ el color plateado iridiscente de algunas especies de arañas,²⁵ y hasta el cambio de color de ciertos camaleones.³² La presencia de estos cristales en diversas especies del reino animal es un hecho que se conoce desde hace varios años,²⁴ y hasta se ha reportado la producción de guanina biogénica en microorganismos, tanto eucariotas como procariotas.^{33,34} El primer trabajo en donde se evidenció la producción de guanina a partir de bacterias de la familia *Aeromonas* fue en colaboración con nuestro grupo.

Se ha determinado experimentalmente que algunas formas cristalinas de la guanina tienen un índice de refracción extremadamente alto ($n > 1,83$) cuando este es medido perpendicular a la dirección de apilamiento de los cristales.³⁵ Esta característica, junto con la capacidad de alternar distintas capas de láminas de cristales de guanina anhidra entre citoplasma, o guanina amorfa, para formar reflectores interferométricos, está propuesta como una de las principales razones por las cuales este tipo de materiales son tan frecuentemente utilizados para diferentes mecanismos mediados por sistemas de color estructural en organismos superiores, como pueden ser el camuflaje,^{36,37} el cortejo sexual^{38,39} y la visión.^{40,41} Con esta idea en mente, algunos trabajos proponen que las propiedades ópticas de estos reflectores interferométricos pueden ser moduladas por la orientación y la distancia entre cristales de guanina,²⁴ o alternativamente, empleando moléculas emparentadas estructuralmente, como xantina e hipoxantina, que podrían estar presentes naturalmente en el mismo compartimiento donde las moléculas de guanina son almacenadas en las células. Estas moléculas podrían actuar como “dopantes”

intracristalinos” o como “solutos en una solución sólida cristalina”, según su concentración en el material.⁴²

En el reciente trabajo de Palmer y colaboradores se estudia la composición de siete cristales biogénicos de guanina con diferentes morfologías y se llega a la conclusión de que muchos de ellos no están compuestos exclusivamente de guanina, sino que se pueden describir como “aleaciones moleculares” que incluyen porcentajes de xantina e hipoxantina en su estructura.⁴² En algunos casos se llegan a observar porcentajes de hasta un 20% de otras purinas ocultas en las estructuras, sin que esto genere cambios apreciables la estructura cristalina del material. El hecho de que no hayan podido encontrar una correlación directa entre la morfología de los cristales biogénicos y el contenido de otras xantinas en la estructura les permitió a los autores concluir que estos materiales exógenos no parecen estar influenciando la morfología cristalina. Los porcentajes excepcionalmente altos de moléculas exógenas que estas matrices cristalinas fueron capaces de tolerar sin alterar su estructura sirve de inspiración para el diseño de nuevos materiales mixtos que permitan usufructuar las propiedades mecánicas y ópticas de estos materiales basados en guanina, junto con las posibles propiedades de interés introducidas por el agente intercalado.

Actualmente existen reportadas en bibliografía tres formas cristalinas distintas para la guanina: el polimorfo anhidro α ,⁴³ el polimorfo anhidro β ,²⁴ y la guanina monohidrato.⁴⁴ Se conocen, además, tres formas sólidas distintas para la sal de cloruro de la guanina protonada: el cloruro de guaninio monohidrato,⁴⁵ el cloruro de guaninio dihidrato,⁴⁶ y el dicloruro de guaninio.⁴⁷ De forma similar a lo que se describe para adenina, las fases anhidras se sintetizan a partir de soluciones acuosas neutras o básicas mientras que las sales son cristalizadas a partir de soluciones ácidas y en presencia de aniones cloruro. Todos estos materiales pueden distinguirse y caracterizarse comparando sus patrones de difracción de rayos X de polvos (Figura 7).

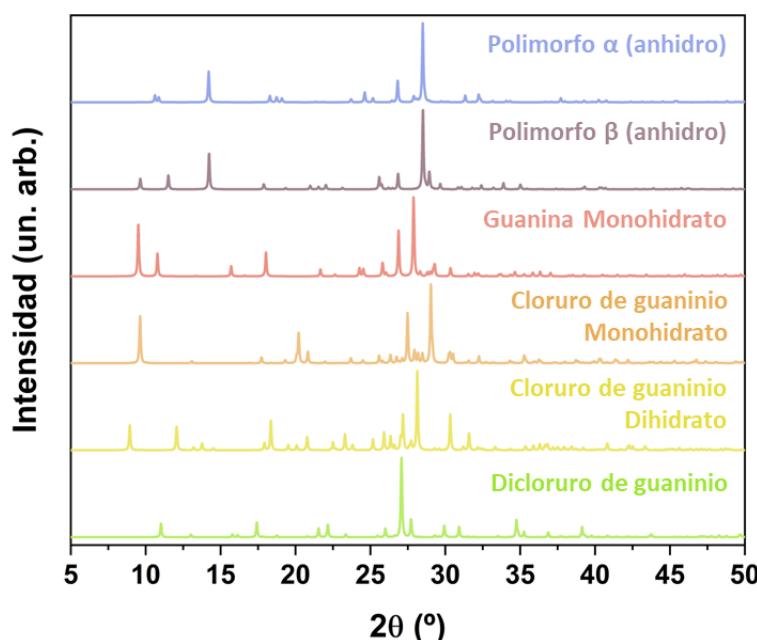


Figura 7. Formas sólidas reportadas en bibliografía para la guanina y sus sales de cloruro.

Respecto a los hábitos cristalinos de estos compuestos, las formas anhidras de la guanina suelen presentarse como pequeños hexágonos planos cuya morfología discoide facilita mucho el desarrollo de arreglos periódicos apilados. Cuando estos están equiespaciados, con una frecuencia que es específica de acuerdo al material que los separa, son los que dan lugar al desarrollo de la propiedad fotónica anteriormente descrita.^{24,25,32} Por otro lado, las dos sales de guaninio presentan hábitos elongados de aspecto agujiforme y morfología prismática, muy similares entre sí. El desarrollo de este tipo de hábitos longitudinalmente elongados no parece ser el indicado para facilitar el apilamiento entre cristales y podría ser uno de los principales motivos por los cuales estos materiales no desarrollan espontáneamente color estructural.

Es importante notar que, aunque ambas fases anhidras exhiben una morfología similar para sus hábitos cristalinos (ambas desarrollan hábitos en placas hexagonales), todos los casos reportados de cristales biogénicos de guanina se presentan con el polimorfo β .²⁴ El polimorfo α ha sido reportado únicamente *in vitro*.⁴³

Cafeína

Debido a su uso como ingrediente farmacéutico activo (IFA), y en la industria alimenticia, la cafeína ha sido ampliamente estudiada desde hace mucho tiempo. Particularmente, en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de sales y co-cristales de este IFA con el fin de mejorar el perfil de solubilidad del activo, estabilidad y respuestas frente a los distintos procesos de manufacturación de medicamentos. También se emplea para el desarrollo de nuevos materiales cristalinos. A modo de ejemplo, el primer cristal molecular flexible y elástico reportado corresponde al solvato de un co-cristal de cafeína y ácido fluoro-nitrobenzoico.¹⁴ Sin embargo, a pesar de su gran popularidad, la estructura cristalina de las diversas formas sólida de la cafeína permanece, al menos parcialmente, no del todo esclarecida luego de casi 50 años de investigación.

Es sabido que existen al menos una forma hidratada y tres variedades polimórficas de su forma anhidra. En bibliografía se encuentran reportados tres polimorfos de la fase anhidra, denominados Polimorfo anhidro I,⁴⁸ Polimorfo anhidro II,^{49,50} y Polimorfo anhidro III,⁵¹ y la cafeína neutra como monohidrato (denominado cafeína monohidrato).⁴⁹ Este último contiene un total de 0,8 moléculas de agua por cada una de cafeína, aunque en la bibliografía actual se sigue refiriendo a este como monohidrato u forma hidratada.

La estructura cristalina de la forma hidratada fue determinada hace más de 65 años por Sutor⁵² y luego fue confirmada por Edwards en 1997.⁴⁹ Este monohidrato se obtiene por cristalización desde soluciones acuosas, pero pierde rápidamente sus aguas si se deja expuesta a un entorno con una humedad relativa porcentual menor al 60% para dar lugar a la obtención del Polimorfo anhidro II. Este proceso de deshidratación fue estudiado exhaustivamente y se han propuesto dos mecanismos posibles para su desarrollo, que implican tanto la utilización de los canales estructurales como vía de escape del solvente,⁵³ como la disolución y re obtención de manera local de los núcleos de crecimiento cristalino de la fase anhidra correspondiente.⁵⁴ En ambos casos el resultado final es la pérdida total

o parcial de la cristalinidad del material. Esto llevó a que se discutiera por mucho tiempo la existencia de una fase cristalina para la cafeína anhidra.⁵⁵

Debido a las dificultades que implica poder obtener una única forma sólida pura para este material, el estudio riguroso de sus propiedades fisicoquímicas es muy desafiante. A modo de ejemplo, la cafeína obtenida comercialmente se transforma por completo al Polimorfo anhidro I luego de ser calentada hasta 153 °C y esta se mantiene metaestable luego de ser enfriada, siempre que sea almacenada en condiciones herméticas. No obstante, se ha reportado que las alteraciones mecánicas sobre este polimorfo pueden desencadenar la transformación desde el Polimorfo anhidro I hacia el Polimorfo anhidro II.⁵⁶

Se encuentra también reportado en bibliografía un tercer polimorfo para la cafeína anhidra, denominado Polimorfo anhidro III,⁵¹ pero los datos de su patrón de difracción de rayos X de polvos no están disponibles.

Por otro lado, existen también dos polimorfos para el cloruro de cafeíno, denominados tipo I⁵⁷ y tipo II,⁵⁸ y el cloruro de cafeíno dihidrato.⁵⁹

Respecto a la síntesis, las formas anhidras se obtienen a partir de soluciones acuosas neutras o básicas, mientras que las sales son cristalizadas a partir de soluciones ácidas y en presencia de aniones cloruro. De la misma manera que se describió para los compuestos anteriores, todos estos los sólidos mencionados derivados de la cafeína pueden distinguirse y caracterizarse comparando sus patrones de difracción de rayos X de polvos (Figura 8).

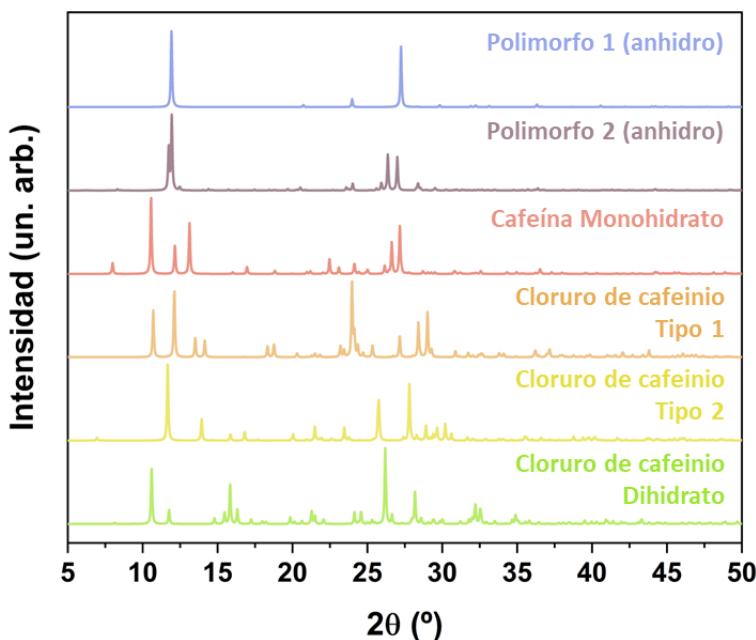


Figura 8. Formas sólidas reportadas en bibliografía para la cafeína y sus sales de cloruro.

Teniendo en cuenta la facilidad con la que es posible seleccionar experimentalmente las formas cristalinas reportadas para la adenina, la guanina y la cafeína, la similitud que existe entre sus estructuras moleculares, y las diferentes propiedades supramoleculares y ácido-base que presentan, estas sustancias resultan

modelos atractivos para estudiar la relación entre las estructuras cristalinas y las respuestas mecánicas desarrolladas. Además, considerando el rol que tienen todas estas purinas en el diseño y la fabricación de nuevos materiales bioinspirados para su potencial aplicación tecnológica, contar con la capacidad de predecir la respuesta mecánica de sus formas cristalinas en base a sus estructuras, sería esencial para garantizar un desarrollo eficaz de estos nuevos materiales. Adicionalmente, la biocompatibilidad intrínseca a estos bloques de construcción puede otorgar un valor agregado extraordinario al diseño de nuevos materiales para su aplicación en tecnologías amigables con el medioambiente.⁶⁰

En este capítulo se presentan un conjunto de condiciones experimentales optimizadas para realizar una síntesis reproducible de material cristalino de dicloruro de adeninio, cloruro de guaninio dihidrato y cafeína monohidrato. Cada uno de estos materiales presenta una morfología y una respuesta mecánica característica, la cual es estudiada en términos de sus redes de energía de interacción y la anisotropía de forma del hábito cristalino. Para todos estos materiales se estudió su capacidad de actuar como huéspedes de moléculas exógenas utilizando como modelo el intercalador de ADN naranja de acridina. La inclusión de forma intracristalina de este colorante en los materiales no alteró la estructura cristalina de ninguno de ellos de manera apreciable, pero sí se vieron afectadas las propiedades mecánicas y ópticas. Estos resultados proveen una nueva estrategia para modular las propiedades físicas de los materiales bioinspirados basados en purinas, y representan un posible modelo para explicar el desarrollo de materiales cristalinos híbridos basados en esta familia de moléculas en sistemas vivos como los ya descritos.

Resultados y Discusión

Análisis de las estructuras cristalinas reportadas para adenina, guanina y cafeína

Incidencia de aparición de las distintas formas cristalinas

Más allá de la intensa investigación que se ha desarrollado en torno a estas purinas en los últimos años, si estudiamos la distribución estadística de sus formas cristalinas en las bases de datos cristalográficas podemos observar la baja incidencia de estructuras puras (especie neutra anhidra), solvatos y sales simples, en comparación con la gran cantidad de co-cristales y compuestos de coordinación reportados para todas ellas.⁶¹⁻⁶⁴ A modo de ejemplo, realizar una búsqueda de la estructura de la guanina en la base abierta de datos estructurales cristalográficos (COD)⁶⁵ devuelve 153 resultados diferentes, mientras que para cafeína arroja 123 resultados y, para adenina, 55. Todos estos son, en su inmensa mayoría, estructuras de co-cristales con otros ingredientes farmacológicamente activos o compuestos de coordinación.

Para poder realizar una búsqueda que permita discriminar entre cada una de las formas cristalinas reportadas empleamos las funcionalidades de acceso a estructuras de la base de datos de Cambridge.⁶⁶ Enfocando la búsqueda en estructuras que únicamente contengan las purinas, sus solvatos o las sales de cloruro, y descartando todas aquellas entradas provenientes de co-cristales o compuestos de coordinación se obtienen los siguientes resultados que se presentan en la Figura 9.

Para la adenina podemos encontrar un solo set de datos correspondiente a la estructura de la adenina anhidra (KOBFUD). No hay reportadas estructuras mono o dihidratadas de esta especie hasta el momento, pero existe una estructura cristalina trihidratada neutra, FUSVAQ01. Una búsqueda similar sobre las sales de adeninio arroja 4 resultados que contienen datos estructurales del cloruro de adeninio monohidrato (ADENCH00-03) y otros 3 que contienen los datos del dcloruro de adeninio (ADENDH00-03). En ambos casos todas las entradas se corresponden con re-determinaciones y actualizaciones de datos estructurales, por lo que sólo se considera una entrada por estructura.

Para guanina aparecen dos estructuras anhidras (KEMDOW y KEMDOW01) y una estructura de guanina monohidrato (GUANMH10). Al estudiar la incidencia de los cloruros de guaninio, la base de datos cristalográfica cuenta con 2 set de datos estructurales que se corresponden el cloruro de guaninio monohidrato (GUANCH y GUANCH01), otros 2 asociados al cloruro de guaninio dihidrato (GUANCD y GUANCD01) y uno solo para la estructura cristalina del dcloruro de guaninio (GODYUT). Teniendo en cuenta que tanto GUANCH01 como GUANCD01 son datos actualizados de las primeras estructuras reportadas, quedan únicamente tres entradas para los cloruros.

Para la cafeína se obtienen 2 set de datos estructurales correspondientes a la cafeína monohidrato (CAFINE y CAFINE01) y 4 entradas con datos estructurales de la

cafeína anhidra (NIWFEE01–03). Considerando que CAFINE01 es una redeterminación estructural de CAFINE, y descartando aquellas entradas que no tienen coordenadas explícitas (NIWFEE y NIWFEE01), solo quedan 3 entradas estructuralmente relevantes para los compuestos de cafeína neutra. Realizando un análisis similar con las sales de cafeína encontramos que hay únicamente 3 estructuras reportadas para los cloruros. Dos polimorfos del cloruro de cafeína anhidro (XAYGUB y XAYGUB01) y una sal de cloruro dihidratada (CAFFCD).

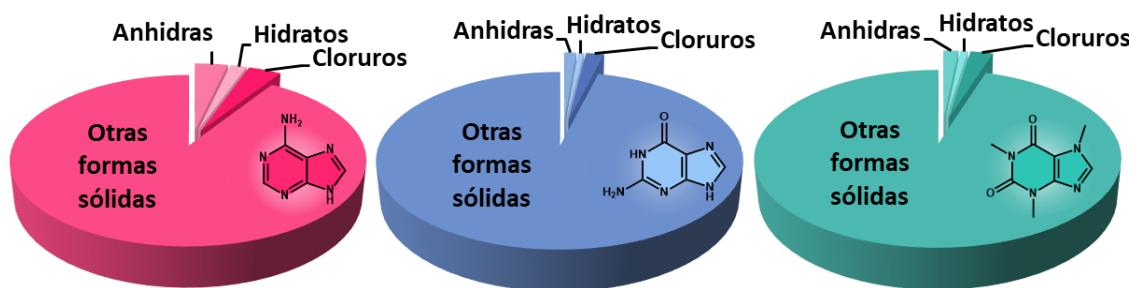


Figura 9. Distribución estadística de las distintas estructuras cristalinas de los compuestos de adenina (rosa), guanina (celeste) y cafeína (verde) reportadas en la base de datos cristalográfica de Cambridge.

Esta baja incidencia porcentual (9,1% para adenina, 3,9% para guanina y 4,9% para cafeína) de este tipo de formas sólidas en comparación con las estructuras reportadas para los co-cristales u otros compuestos de interés farmacológico ilustra claramente cómo el estudio de la química en solución y su aplicación en farmacología ha postergado el estudio de estas formas sólidas y su potencial uso para el diseño de nuevos materiales.

Estudio de las propiedades estructurales y mecánicas de las estructuras cristalinas reportadas

Con el objetivo de obtener información que permita predecir el hábito cristalino, lo cual es necesario para estudiar la anisotropía morfológica y de distribución de energías de interacción en un cristal, se utilizaron los datos correspondientes a las estructuras reportadas en la CCDC. El objetivo principal de este análisis es poder establecer la naturaleza y la orientación de las interacciones presentes en cada estructura respecto a las direcciones de empaquetamiento, y correlacionarla con la morfología cristalina.

En todos aquellos casos en que las estructuras presentaran alguna incompletitud, o no tuvieran correctamente identificado la posición de los hidrógenos, estos fueron agregados en las posiciones calculadas geométricamente considerando la distancia y ángulo de enlace característica de cada átomo parental y luego optimizadas utilizando un campo de fuerza universal⁶⁷ luego de 500 pasos de optimización, empleando el algoritmo de descenso pronunciado⁶⁸ con una tolerancia de convergencia de 10^{-10} kJ/mol entre los pasos. Por último, la distancia de enlace de todos los hidrógenos presentes en la estructura se normalizó de acuerdo con los valores obtenidos por difracción de neutrones antes de realizar los cálculos de redes de energía. La predicción del hábito cristalino se realizó empleando el método de Bravais–Friedel–Donnay–Harker (BFDH), el cual se basa en

utilizar los parámetros de red y la simetría estructural para obtener una lista de posibles caras cristalinas y sus tasas de crecimiento.^{69,70}

En líneas generales, podemos observar que todas las formas sólidas provenientes de las moléculas neutras anhidras, o sus hidratos, presentan redes de energía basadas en interacciones estrictamente atractivas. No se observan interacciones de carácter repulsivo que estén por encima de los 14kJ/mol. De todos estos compuestos neutros, resultan particularmente interesantes los casos de la cafeína en sus formas anhidras y monohidrato.

Ambas estructuras presentan redes de interacción mayoritariamente atractivas cuyos ejes principales de atracción se encuentran alineados al eje mayor de crecimiento del cristal (Figura 12). Esta alineación entre el eje principal de interacción y el eje elongado del hábito cristalino es consistente con el desarrollo de una respuesta mecánica flexible producto de la anisotropía de forma y de distribución de interacciones. Si se dobla este material sobre su eje mayor, esta deformación se trasladará al eje principal de interacciones, garantizando una respuesta colectiva y proporcional de todos los bloques de construcción. Sin embargo, al carecer de fuerzas restitutivas más allá de la propia interacción atractiva, es probable que este material no sea capaz de volver a su estado original. Esto implicaría que la respuesta flexible probablemente tenga un carácter más plástico que elástico (Figura 3.a).

El resto de los materiales basados en formas anhidras o hidratadas presentan sus ejes o planos de interacción principal perpendiculares o alabeados respecto a los ejes mayoritarios del hábito cristalino y, por lo tanto, es probable que no desarrollen una respuesta flexible debido a la compensación que se produce entre la resistencia estructural y la geometría del hábito cristalino.

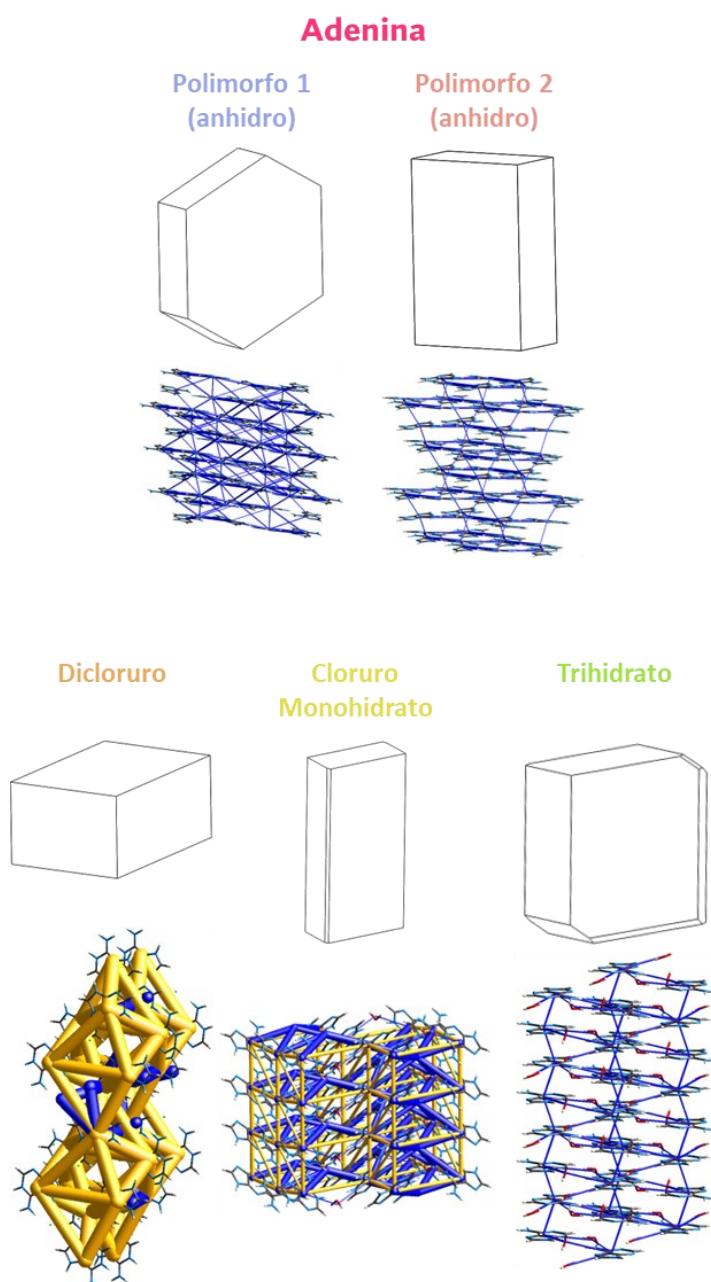


Figura 10. Hábitos cristalinos predichos por la metodología BFDH y redes de energía calculadas para cada forma sólida reportada de la adenina y las sales de cloruro de las especies protonadas. En cilindros amarillos se representan las interacciones repulsivas y en color azul la suma se las interacciones atractivas electroestáticas y dispersivas.

Por otro lado, las sales de todas estas sustancias presentan interacciones atractivas y repulsivas intensas, y comparables entre sí. Sin embargo, no todas las estructuras dieron lugar a una distribución anisotrópica de estas interacciones, condición necesaria para desarrollar una respuesta mecánica elástica (Figura 3.b).

Por ejemplo, el cloruro de adeninio monohidrato (Figura 10) mostró una red de interacciones electroestáticas repulsivas muy isotrópica y con aportes en todas las direcciones. Algo similar sucede con la sal de cloruro monohidrato y el dicloruro de guaninio, y con todas las sales de la cafeína. En todos estos casos, sin importar la anisotropía morfológica del hábito cristalino, es poco probable que estos materiales

desarrollen una respuesta flexible frente a la deformación debido a la gran isotropía de sus redes de interacción. Si la desarrollaran, esta sería únicamente producto de su anisotropía de forma y sería mucho menos intensa que aquella cuyo origen es estructural.

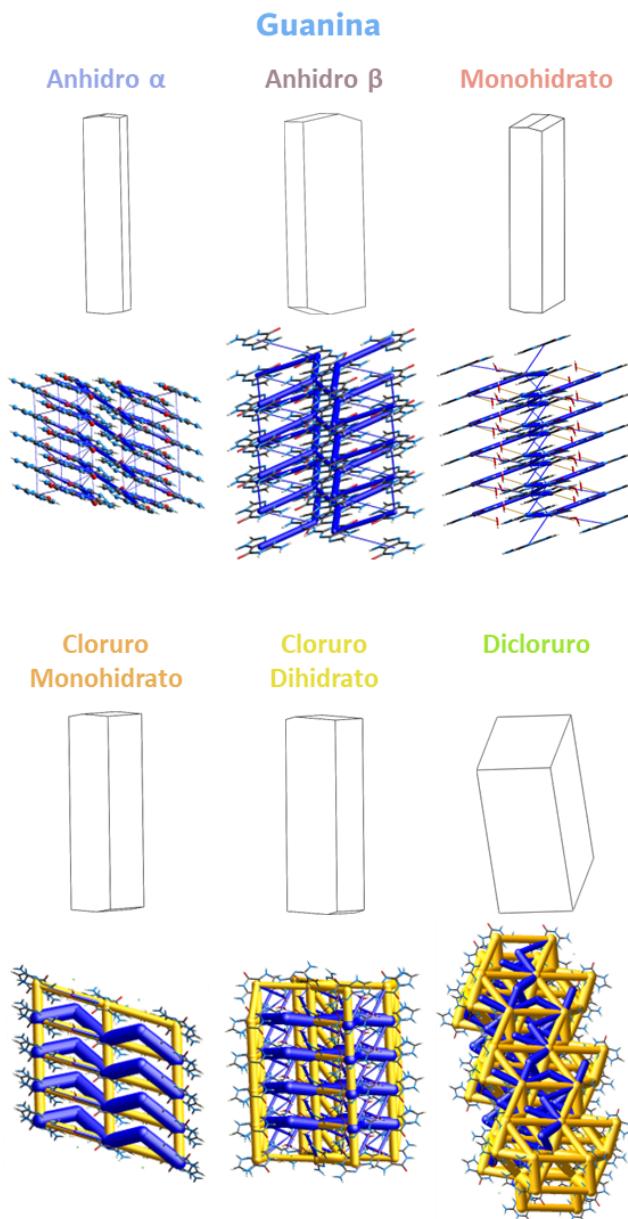


Figura 11. Hábitos cristalinos predichos por la metodología BFDH y redes de energía calculadas para cada forma sólida reportada de la guanina y las sales de cloruro de las especies protonadas. En cilindros amarillos se representan las interacciones repulsivas y en color azul la suma se las interacciones atractivas electroestáticas y dispersivas.

Para el cloruro de guaninio dihidrato, la red de interacciones repulsivas y atractivas se dispone en forma de capas cuya orientación es perpendicular al eje mayor del hábito cristalino (Figura 11). Esta distribución sí es consistente con la formación de planos de interacción atractiva intensa, capaces de actuar como regiones de respuesta colectiva. Por el contrario, el dicloruro de guaninio agrega un cloro más a la estructura, lo cual no solamente incrementa la densidad de interacciones atractivas y repulsivas en el sistema, sino que, además, debido a la necesidad de alojar una partícula más con carga negativa,

distribuye de manera más homogénea estas interacciones y aumenta la isotropía de la red de energía.

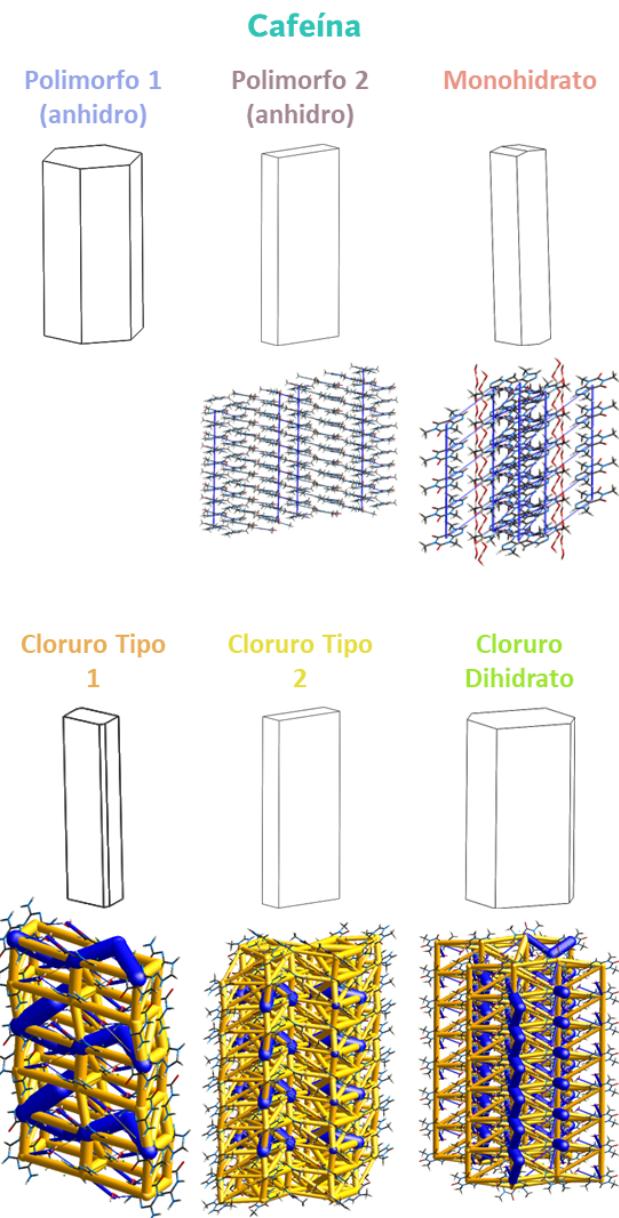


Figura 12. Hábitos cristalinos predichos por la metodología BFDH y redes de energía calculadas para cada forma sólida reportada de la cafeína y las sales de cloruro de sus especies protonadas. En cilindros amarillos se representan las interacciones repulsivas y en color azul la suma se las interacciones atractivas electroestáticas y dispersivas.

Como se discutió en la introducción, si pensamos todas estas estructuras en términos de regiones de respuesta colectiva y zonas de amortiguación, estas últimas se pueden entender estructuralmente como “pequeños resortes” adheridos a bloques sólidos que representan las regiones de respuesta colectiva. Estos resortes permiten absorber y distribuir homogéneamente por toda la estructura la fuerza aplicada (Figura 13).

De manera análoga a lo planteado en la introducción pero para sistemas estrictamente orgánicos, el autor Desiraju emplea el término “zona buffer” para hacer referencia a regiones de la estructura cristalina que son capaces de actuar absorbiendo la

deformación generada al aplicar una fuerza sobre el cristal a través de la ruptura y regeneración de interacciones débiles.⁷¹ Sin embargo, este modelo propone como condición necesaria la existencia de arreglos moleculares apilados conformando planos con una estructura en zigzag, para dar lugar a un “encastre” entre planos que permite desarrollar una resistencia al arrastre similar a lo que sucede con el rozamiento entre dos sólidos en contacto directo. Esta interpenetración entre bloques apilados actúa como fuerza restitutiva y permite desarrollar la respuesta elástica en estos materiales.⁷¹

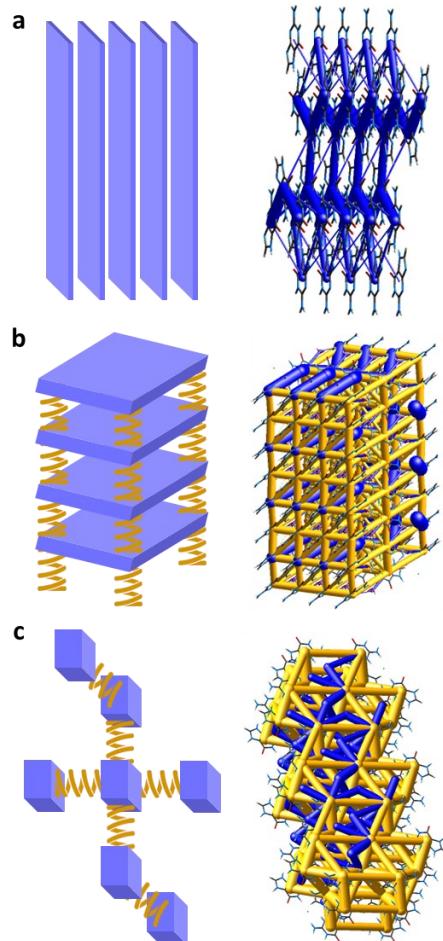


Figura 13. Esquema de representación de las redes de energía en términos de planos y resortes para las estructuras de guanina anhidra polimorfo β (a), cloruro de guaninio dihidrato (b) y dicloruro de guaninio (c). En cilindros amarillos se representan las interacciones repulsivas y en color azul la suma se las interacciones electroestáticas y dispersivas.

Entender estas estructuras en términos de “resortes” y “bloques rígidos” es una gran ayuda para ilustrar lo que sucede al agregar un ion cloruro más en el dicloruro de guaninio, en comparación con la red en capas del cloruro monohidrato. Esta última puede pensarse como una serie de “tablones sostenidos sobre resortes”. Al aplicar una fuerza perpendicular al eje de los resortes, algunos de estos se estirarán y otros se comprimirán, generando una fuerza opuesta a la deformación que busca restituir la posición de equilibrio (Figura 3.b). Por lo tanto, podemos entender a este como un sistema “amortiguado” frente a las deformaciones y esperar que presente una respuesta elástica.

Si, por el contrario, se adicionan “resortes” posicionados perpendicularmente a los bloques rígidos, el sistema pasará a comportarse como una especie de cubo sostenido por todas sus caras. Si la constante de elasticidad de estos resortes es similar entre sí, estos distribuirán la fuerza aplicada sobre toda la estructura y generarán una red isotrópica de fuerzas restitutivas. Esto deviene en un comportamiento colectivo global equivalente al de cualquier red isotrópica (Figura 3.c). El exceso de zonas de amortiguación resulta ser contraproducente para el desarrollo de una respuesta mecánica flexible. Un ejemplo de este tipo de estructuras “super–amortiguadas” se puede observar para el caso del dicloruro de adeninio.

Por último, el caso de los sistemas anhidros e hidratos, los cuales no presentan interacciones repulsivas, pueden entenderse como una especie de sistemas “sub–amortiguados”, donde la única fuerza que se opone a la deformación es la interacción atractiva entre dipolos o, en un caso extremo, la repulsión a la interpenetración de las propias nubes electrónicas atómicas (Figura 3.a).

Con el fin de corroborar si este análisis de correlación entre la estructura, el hábito cristalino y la respuesta mecánica es observable experimentalmente, se sintetizó el dicloruro de adeninio, el cloruro de guaninio dihidrato y el monohidrato de la cafeína. Estas tres estructuras fueron elegidas como representativas de los sistemas “super–amortiguados”, “amortiguados” y “sub–amortiguados” (Figura 14).

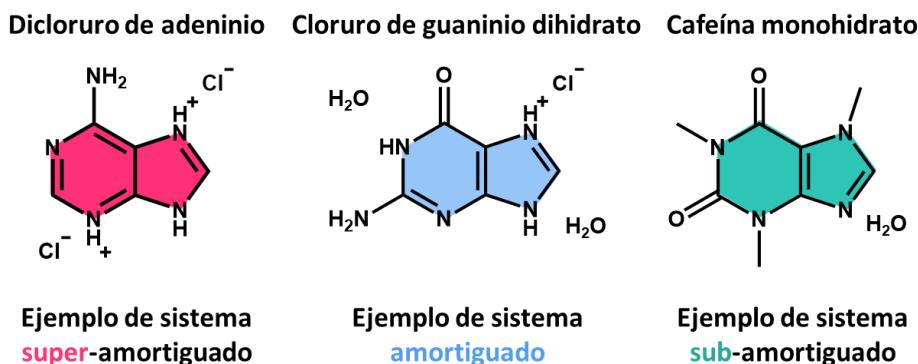


Figura 14. Esquema de los sistemas cristalinos que serán utilizados a lo largo de este capítulo.

Materiales basados en adenina, guanina y cafeína

Síntesis y caracterización estructural

Todas las síntesis llevadas a cabo para la obtención de estos tres materiales se basaron en protocolos reportados previamente y se encuentran detallados en el apartado experimental. La identidad de las fases cristalinas obtenidas en cada caso se corroboró por comparación de los difractogramas de rayos X de polvos contra los correspondientes patrones simulados a partir de las estructuras cristalinas determinadas por DRX de monocristal reportadas. En los casos en que no fue posible obtener la estructura cristalina por DRX de monocristal se emplearon datos bibliográficos de DRX de polvos publicados (Figura 13). Cuando fue posible, se llevaron a cabo estudios de DRX de monocristal sobre los materiales obtenidos.

En el caso de los derivados de adenina, debido a que no fue posible obtener material cristalino del tamaño y la calidad necesario para realizar experimentos de difracción de rayos X de monocrystal, los análisis estructurales se realizaron utilizando las estructuras reportadas en la base de datos. Tanto para el cloruro de guaninio dihidrato como para la cafeína monohidrato se obtuvo material monocrystalino apto para realizar experimentos de resolución estructural por difracción de rayos X (Figura 15). Sin embargo, debido a la velocidad de secado, y el subsecuente deterioro de los cristales de la cafeína monohidrato, la adquisición de un set de datos completos a partir de este material fue muy desafiante y sólo fue posible realizarlo empleando las facilidades del laboratorio de luz sincrotrón en la línea MANACÁ de Sirius.

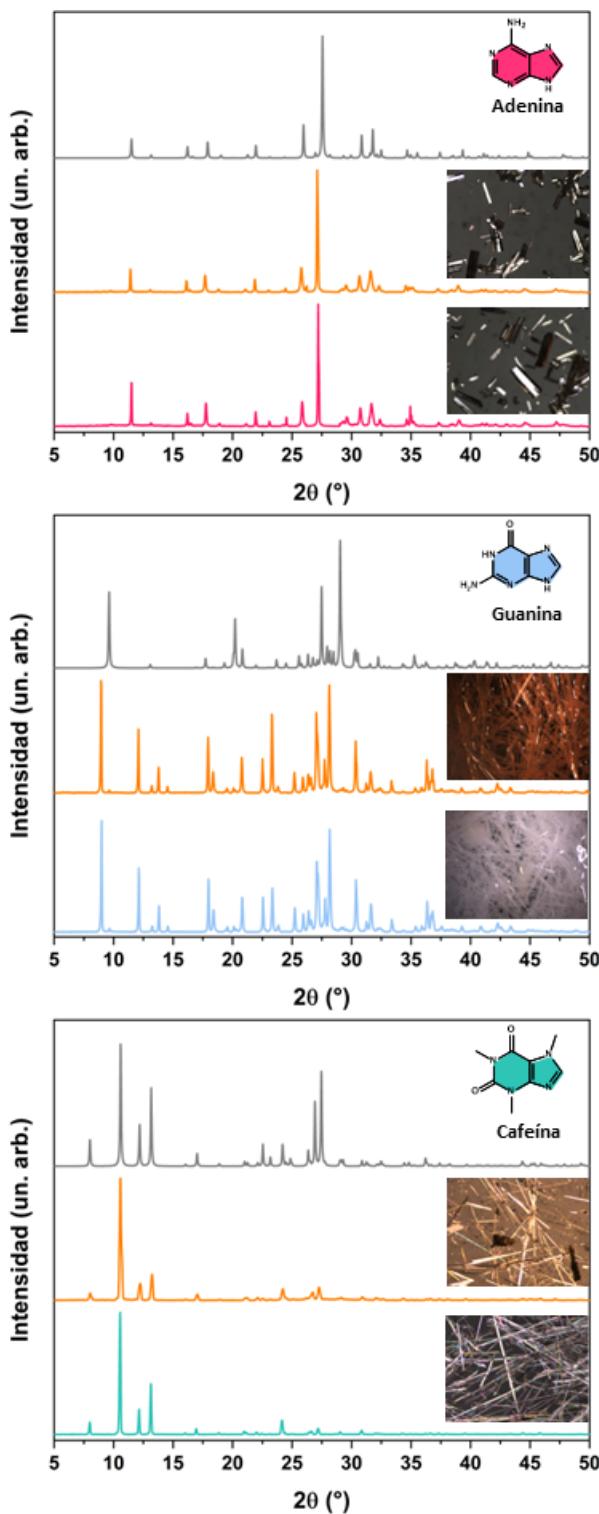


Figura 15. Difractogramas de rayos X de los materiales policristalinos obtenidos para el dicloruro de adeninio (rosa), cloruro de guaninio dihidrato (celeste) y cafeína monohidrato (verde), y los materiales híbridos obtenidos a partir de las correspondientes purinas con la intercalación de naranja de acridina (naranja). En todos los casos se informa el difractograma calculado a partir de la estructura resuelta por difracción de rayos X de monocristal.

Estudiando en detalle las estructuras cristalinas resultas por difracción de rayos X de cristal único de estos materiales podemos observar que, para el cloruro de guaninio dihidrato, puede definirse una entidad supramolecular mínima compuesta por un par de

iones guaninio interactuando a través de puentes de hidrógeno. Además de las interacciones entre los cationes, estos interactúan también con las aguas y los iones cloruros. Estos dímeros se posicionan tridimensionalmente para dar lugar a formación de un agregado con aspecto de cinta ondulada, similar a los planos en zig-zag descriptos por Desiraju al estudiar los arreglos estructurales necesarios para desarrollar una respuesta elástica.

Si observamos el empaquetamiento a través del plano *bc* podemos notar como estas cintas se alinean en paralelo para dar lugar a la formación de un arreglo molecular con el aspecto de un plano corrugado. Este plano se corresponde con la región de comportamiento colectivo descripta en la Figura 13.b. El apilamiento de estos planos corrugados da lugar a la formación de la red tridimensional (Figura 16).

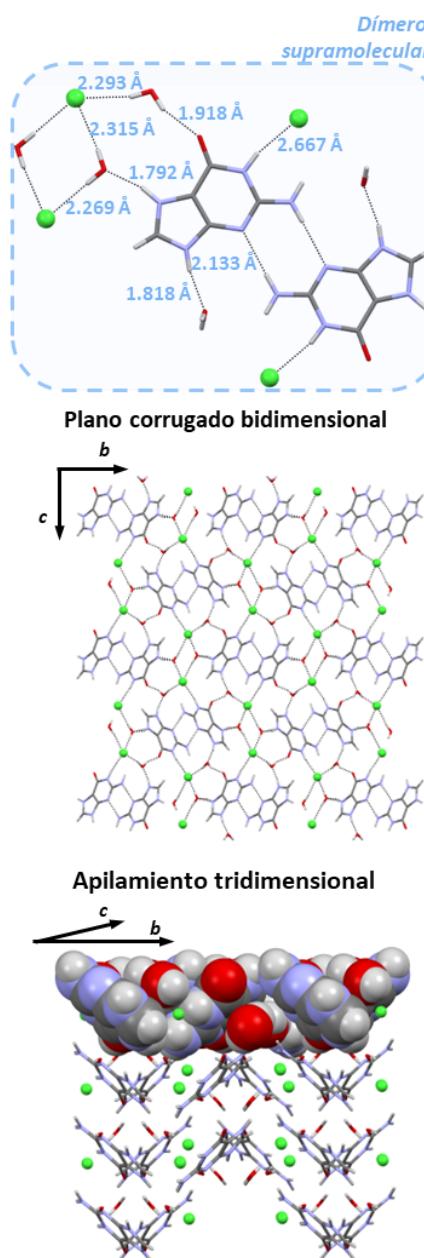


Figura 16. Detalle de la estructura cristalina del cloruro de guanino dihidrato.

Al realizar un análisis similar sobre las estructuras de la cafeína monohidrato y el dicloruro de adeninio podemos observar que estas carecen de un sintón supramolecular dimérico como el observado para el cloruro de guaninio dihidrato. No obstante, ambas estructuras sí presentan los arreglos supramoleculares extendidos bidimensionalmente en forma de planos, como los que se observaron en la sal de guanina (Figura 17). En estos casos los planos también se apilan para dar lugar a la formación de la red tridimensional.

Un análisis detallado de la estructura de la cafeína monohidrato permite observar la presencia de los túneles ocupados por el agua descriptos en bibliografía. Estos espacios están propuestos como una de las vías de escape del agua estructural y se sugiere que son uno de los motivos por lo que este material es tan susceptible a la deshidratación. Esta característica no solamente limita las condiciones experimentales en que los experimentos vinculados a esta fase pueden ser llevados a cabo, sino que impone una clara restricción en el número de aplicaciones que pueden desarrollarse para este material.

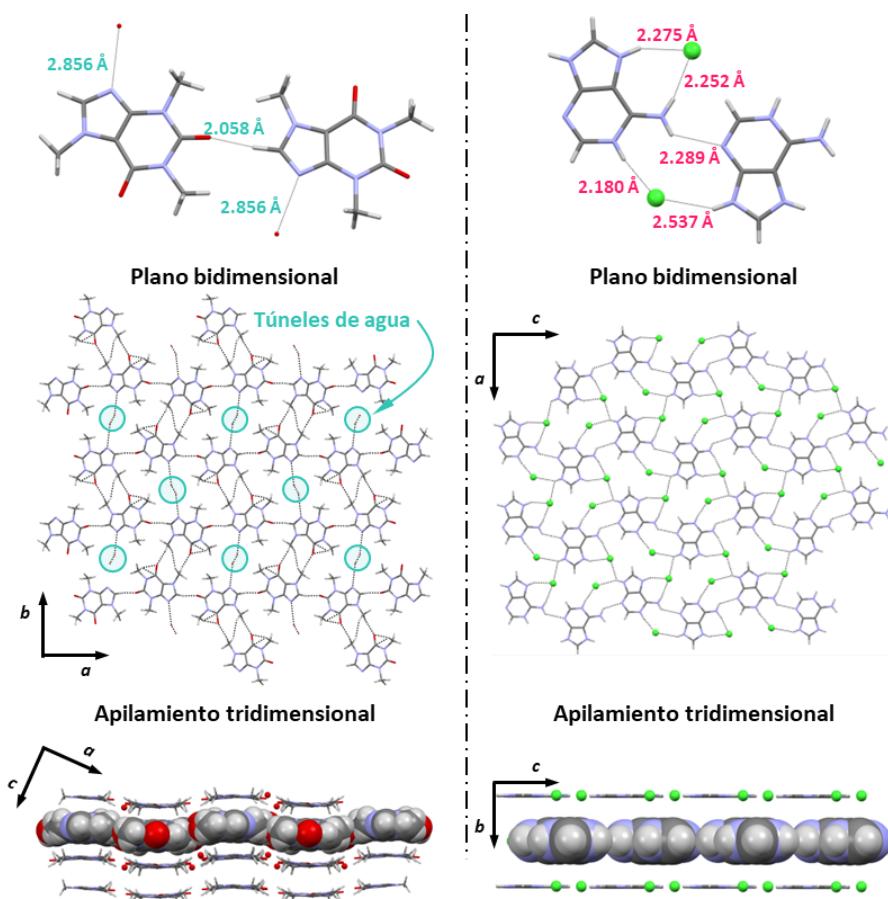


Figura 17. Detalle de la estructura cristalina de cafeína monohidrato (izquierda) y el dicloruro de adeninio (derecha). En esta imagen para la sal de adenina se muestra un bloque de construcción representativo elegido arbitrariamente y no el contenido de la unidad asimétrica completa.

El hecho de que las tres estructuras cristalinas sean tan similares estructuralmente, y que todas puedan ser descriptas en términos de arreglos bidimensionales extendidos y apilados, ilustra de manera clara que un análisis basado únicamente en el aspecto topológico de los bloques de construcción supramolecular puede no ser suficiente para

entender la respuesta mecánica de un sistema material. Esta observación proviene del análisis que se llevó a cabo en el apartado anterior, en el que los resultados de los cálculos de las redes de energía y la predicción de la morfología de cada cristal permitió clasificar a cada uno de los sólidos propuestos para ser estudiados en tres categorías distintas en relación con la respuesta mecánica esperada. Estos ejemplos ilustran la necesidad de complementar el análisis descriptivo del empaquetamiento con herramientas que describan la calidad y distribución de las energías de interacción en la estructura, así como la morfología de su hábito cristalino.

Por último, es importante notar que estos materiales ilustran de manera clara las restricciones que enfrenta el modelo de Desiraju al ser extendido más allá de los sistemas analizados para su desarrollo. En su modelo, el autor destaca que es esencial observar dos características estructurales particulares para garantizar el desarrollo de una respuesta mecánica elástica en cristales orgánicos flexibles: la existencia de regiones de amortiguación capaces de romper y regenerar fácilmente interacciones intermoleculares que faciliten el reacomodamiento de los bloques de construcción, y un ordenamiento de estos bloques en términos de planos corrugados apilados que actúe a modo de “juntas de bisagras” para inhibir el deslizamiento entre planos y evite que se desarrolle una respuesta plástica frente a la deformación.⁷¹ Cabe aclarar que el autor establece este modelo a partir de un análisis cualitativo, empleando datos experimentales estructurales y de respuesta mecánica y del empaquetamiento cristalino de una serie de cristales neutros. Además, muchos de ellos corresponden a sistemas mixtos como son los co-cristales. Por lo tanto, es esperable que el modelo extraído de este set de observaciones no sea extrapolable a sistemas que no presenten características similares.

Las dos características establecidas por el modelo de Desiraju están presentes en la estructura cristalina de la cafeína monohidrato (Figura 17), lo cual implica que este material debería de desarrollar una respuesta elástica frente a la deformación. Al mismo tiempo, basados en el rol que cumple el arreglo en planos corrugados en la inhibición del deslizamiento entre planos, deberíamos de esperar que el dicitrío de adeninio presente una respuesta estrictamente plástica, en tanto su estructura se compone de un apilamiento de planos sin ningún tipo de entrelazamiento o traba estructural entre sí. Estos dos resultados son antagónicos a los esperados según el modelo de “amortiguación” introducido en este trabajo, el cual indica que sería esperable una respuesta rígida para el material propuesto como super-amortiguado (el dicitrío de adeninio) y plástica, para el sub-amortiguado (la cafeína monohidrato).

En el próximo apartado se discuten las propiedades mecánicas observadas para estos tres materiales, lo cual permitirá contrastar ambos modelos.

Estudio de propiedades mecánicas

Los ensayos de respuesta mecánica se realizaron sobre cristales únicos empleando un dispositivo diseñado en el laboratorio, el cual consiste en dos puntos de anclaje y una apertura adaptada al tamaño medio de los monocristales estudiados para cada sustancia. La fuerza de deformación se aplicó empleando una aguja de acupuntura con la punta adaptada, y la elasticidad se midió empleando la metodología del módulo elástico de Young

para barras rectangulares (ver sección Experimental para más detalles de la metodología y ecuaciones empleadas). Previamente, la cristalinidad de cada partícula se verificó ensayando su birrefringencia empleando un sistema de polarizadores cruzados (Figura 18).

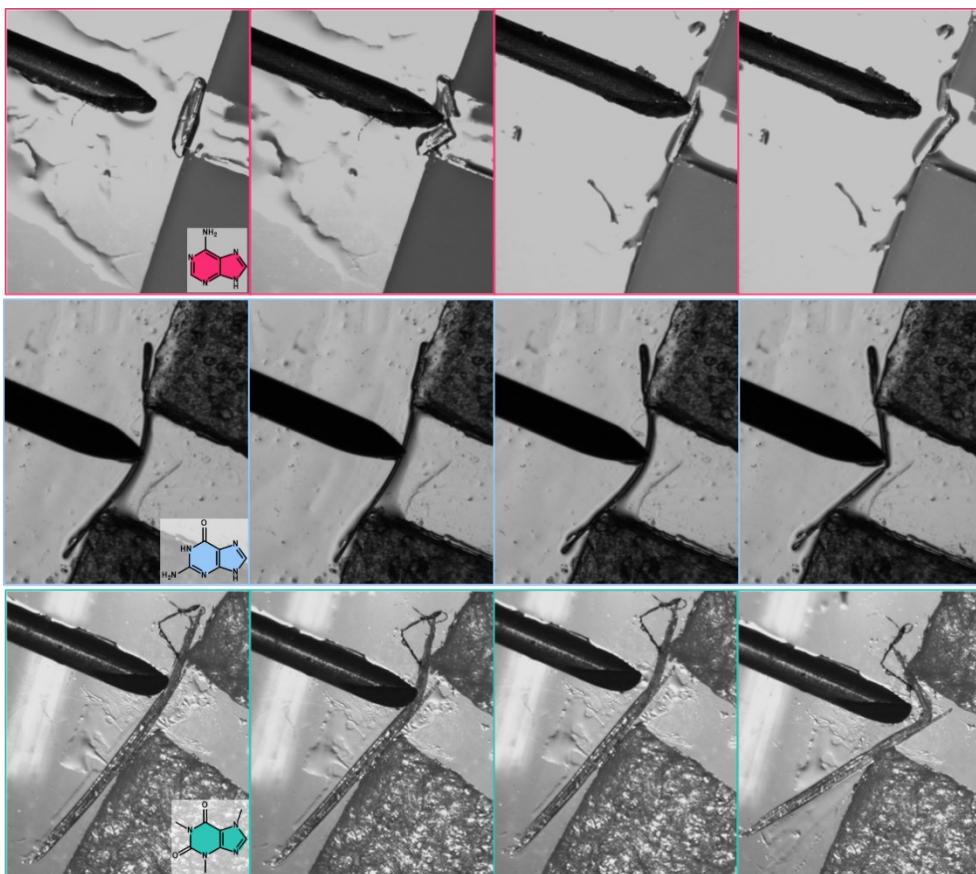


Figura 18. Ensayos de respuesta mecánica sobre cristalitos de dicitróculo de adenino (arriba en recuadros rosas), cloruro de guaninio dihidrato (medio en recuadros azules) y cafeína monohidrato (abajo en recuadros verdes).

Al estudiar las morfologías de los cristales obtenidos podemos observar que estas se corresponden en gran medida con lo predicho por el análisis BFDH (Figura 10 para adenina y sus sales, Figura 11 para guanina y sus sales, Figura 12 para cafeína y sus sales).

Para el caso de los cristales de dicitróculo de adenino se obtuvieron valores de largo y ancho promedio de $424,5 \times 47,5 \mu\text{m}$, lo que da un factor de forma de 8,95. Para el caso de los cristales de cloruro de guaninio dihidrato, el valor de largo y ancho promedio fue de $1722,5 \times 55,1 \mu\text{m}$, con un factor de forma de 31,2. Por último, para el caso de los cristales de cafeína poder determinar un valor preciso de largo y ancho fue particularmente desafiante debido a que su forma elongada y angosta que, junto con su flexibilidad, facilita mucho el apilamiento entre las partículas. Aun así, se pudo determinar un largo y ancho medio de $1470,7 \times 18,3 \mu\text{m}$, lo que establece un factor de forma de 80,5.

El hecho de que el dicitróculo de adenino presente el menor de los tres factores de forma se corresponde con la morfología mucho más regular y apreciablemente isotrópica predicha por el análisis BFDH (Figura 10). Al mismo tiempo, factores de forma grandes para el cloruro de guaninio dihidrato y para la cafeína monohidrato también son consistentes con las morfologías alargas y anisotrópicas predichas (Figura 11 y Figura 12).

Es importante aclarar que la metodología BFDH, al ser meramente teórica, es incapaz de tener en cuenta la multiplicidad de fenómenos experimentales que pueden alterar el hábito cristalino a medida que se desarrolla. Por este motivo el análisis comparativo se realiza en términos de factores de forma y anisotropías morfológicas, y no tanto en virtud del aspecto geométrico o valores absolutos de aristas.

Finalmente, se observa que la respuesta mecánica de estos materiales se corresponde con lo predicho por el análisis de las redes de energía de sus estructuras cristalinas y el modelo de “amortiguación”, y no por lo esperado en base al modelo de planos corrugados de Desiraju.⁷¹

Mientras que el dicloruro de adeninio se comporta como un material duro y quebradizo frente a la flexión, tanto el cloruro de guaninio dihidrato como la cafeína monohidrato desarrollaron una respuesta flexible. Sin embargo, ambos materiales presentaron una clara diferencia respecto a la capacidad de revertir la deformación sufrida. Se observa claramente que, mientras que el cloruro de guaninio dihidrato presentó una respuesta elástica, la cafeína monohidrato fue incapaz de revertir la deformación, dando lugar a una respuesta plástica. En particular, la respuesta elástica del cloruro de guaninio dihidrato pudo ser caracterizada con una mejor estadística, y se obtuvo un valor de elasticidad porcentual promedio de 1,05 %. Finalmente, se demuestra experimentalmente lo predicho por el modelo propuesto, estos tres tipos de respuesta mecánica diferente se corresponden con lo esperado para sistemas super-amortiguados (duros y quebradizos, Figura 13.c), amortiguados (elásticos, Figura 13.b) y sub-amortiguados (plásticos, Figura 13.a).

Síntesis de materiales híbridos bioinspirados

Herramientas para la predicción de la capacidad de albergar moléculas exógenas emparentadas estructuralmente

La respuesta mecánica que presentaron los sistemas estudiados los vuelve muy atractivos para el diseño de nuevos materiales. El carácter cristalino de un material suele ser una propiedad muypreciada debido a que implica usualmente contar con una pureza muy alta. Pero, generalmente, el uso de materiales cristalinos se encuentra postergado a los materiales policristalinos debido a que las partículas de mayor tamaño suelen muy difíciles de obtener y su respuesta mecánica es muy pobre. Generalmente son frágiles y quebradizas, o extremadamente duras. Por este motivo es que el desarrollo de una respuesta flexible sin pérdida de cristalinidad es un valor agregado muypreciado en un material. Adicionalmente, si a esta respuesta mecánica adaptativa pudiéramos incluirle alguna propiedad óptica de interés, el sistema pasaría a tener una enorme relevancia en el diseño de materiales ópticos con aplicación en diversos campos.

Como se mencionó anteriormente, en un trabajo realizado por nuestro grupo en colaboración se evidenció la presencia de una especie exógena (la melanina) intercalada estructuralmente en los cristales de guanina monohidrato sintetizados por algunas bacterias.³⁴ A modo de prueba de concepto, y con el fin de emular la síntesis del material biogénico, en el laboratorio se sintetizaron cristales de cloruro de guaninio dihidrato que contenían melanina incorporada de forma intracristalina. Los estudios cristalográficos

confirmaron, tanto en el material biogénico como en el sintetizado en el laboratorio, que la melanina se encontraba alojada dentro de la estructura y no adsorbida superficialmente. No obstante, la presencia del dopante no alteró apreciablemente la estructura cristalina de ninguno de los dos materiales.

El rol fundamental que la evolución le ha asignado a los materiales basados en guanina para desarrollar la coloración estructural en los seres vivos hace que estudiar la capacidad que tienen estos para alojar moléculas exógenas, también denominadas intercaladores o huéspedes, con diversas propiedades ópticas se vuelva particularmente relevante. Entender el rol de estos sistemas cristalinos como anfitriones de diversas moléculas estructuralmente emparentadas se vuelve esencial cuando las propiedades fotónicas no parecen ser suficientes para justificar la coloración observada en ciertos organismos superiores, como sucede en el caso de la iridiscencia del gecko *Pachydactylus rangei*.⁹⁹

Como se describió en la introducción, recientemente se han estudiado varios casos de materiales biogénicos de guanina generados en retículos donde se alojan otras purinas, como la hipoxantina.⁴² Sin embargo, según nuestro conocimiento, a la fecha se han reportado únicamente tres estudios de materiales cristalinos híbridos bioinspirados basados en guanina que presentan la inclusión intracristalina de otras especies. Uno de ellos es el trabajo de Guo y colaboradores, publicado en 2023, en el que muestran que cristales de guanina anhidra β pueden doparse con el colorante Nile red (NR) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).⁷² Los otros trabajos fueron realizados por nuestro grupo, el ya mencionado³⁴ y otro recientemente publicado, el cual es parte del presente capítulo.²⁶

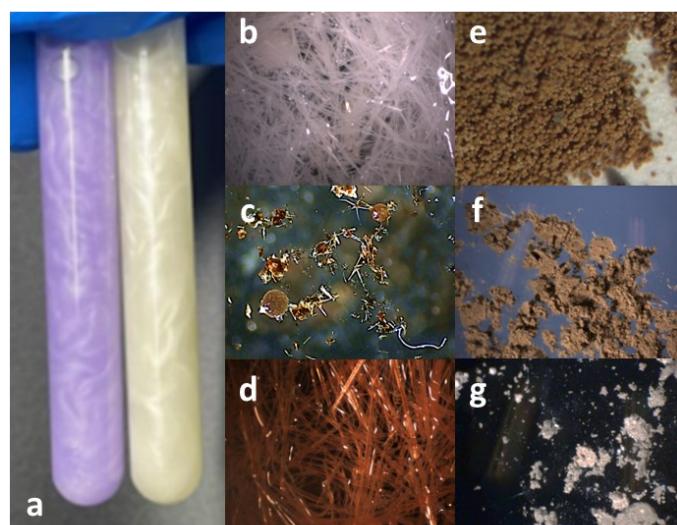


Figura 19. Materiales sólidos obtenidos a partir de guanina empleando diversos agentes dopantes:
(a) Polimorfo β (anhidro) de la guanina dopado con Nile Red (violeta) e isotiocianato de fluoresceína (amarillo), (b) Cloruro de guaninio dihidrato sin dopar, (c) Cloruro de guaninio dihidrato con melanina intercalada, (d) Cloruro de guaninio dihidrato con naranja de acridina intercalada, (e) cristales biogénicos de guanina monohidrato sintetizados por la bacteria *A. salmonicida* subespecie *pechinolytica* cepa 34mel^T, (f) Polimorfo β (anhidro) de la guanina con melanina intercalada y (g) Polimorfo α (anhidro) de la guanina con melanina intercalada. La imagen del panel (a) fue adaptada del trabajo de Gur y colaboradores.⁷²

Para que un proceso de intercalación como los reportados se puedan llevar a cabo,^{26,34,72} es imprescindible que se cumplan ciertas condiciones que garanticen la “intercambiabilidad” entre distintas especies.

Por un lado, es necesario que haya cierto grado de parentesco estructural entre el intercalador y la molécula a reemplazar. La morfología estructural, en términos de regiones de planaridad, zonas estéricamente impedidas, tamaño, y número y orientación de los principales grupos funcionales encargados de la interacción con los otros bloques de la red, deberían ser similares en ambas estructuras.

Por otro lado, la estructura en la que el compuesto exógeno se va a intercalar tiene que ser capaz de tolerar la distorsión producida por el intercambio. Sistemas extremadamente rígidos, como es el caso de las estructuras super-amortiguadas, no serán capaces de ceder para dar lugar a la inclusión de moléculas huésped, salvo que estas presenten una gran similitud volumétrica y morfológica. Al contrario, aquellas estructuras que no cuenten con zonas de amortiguación y donde no haya ningún componente estructural capaz de desarrollar una fuerza que se oponga a la distorsión de la red, serán susceptibles a tolerar potenciales intercambios.

Para testear la capacidad de alojar moléculas exógenas en las formas cristalinas de adenina, guanina y cafeína sintetizadas se empleó el colorante naranja de acridina (NA) como especie huésped modelo. Este colorante es utilizado frecuentemente como sonda para estudiar los fenómenos de intercalación en la doble hebra de ADN debido a su morfología plana, su complementariedad supramolecular con las bases nitrogenadas y su capacidad de adquirir carga positiva, lo cual le permite interactuar atractivamente con el esqueleto fosfatado.^{73,74} Adicionalmente, este colorante presenta la capacidad de fluorescer únicamente cuando se encuentra intercalado, lo que permite utilizarlo como una sonda de inclusión intracristalina.⁷⁵

Para sintetizar los sólidos con el colorante intercalado se realizaron cambios a los protocolos de síntesis previamente reportados para cada una de ellas (ver sección Experimental). En los tres casos se pudo obtener material cristalino cuya morfología era idéntica a la del material sin colorante, pero cuyo color naranja evidenciaba la presencia de naranja de acridina en la estructura. La caracterización estructural por difracción de rayos X de polvos mostró que los compuestos con y sin coloración eran isoestructurales tanto entre sí, como con la estructura resuelta por los experimentos de cristal único mediante la comparación con los correspondientes patrones simulados. Por lo tanto, se pudo verificar que los sólidos intercalados no mostraron alteraciones en la estructura general, ni en la cristalinidad del material resultante (Figura 15).

Para cada uno de los materiales híbridos sintetizados se cuantificó la cantidad de naranja de acridina retenida por unidad de purina en la estructura mediante espectroscopía de absorción UV-Vis. Esto se llevó a cabo construyendo una curva de calibración de naranja de acridina en solución acuosa ácida y midiendo la absorbancia de cantidades conocidas de muestra disueltas en soluciones acuosas de ácido clorhídrico. Este ensayo permitió estimar la proporción de moléculas/iones de purina respecto a las moléculas/iones de naranja de acridina en cada material, obteniéndose valores de 3.000 cafeínas por cada 1 moléculas de naranja de acridina, 5.400 guaninios cada 1 molécula de

naranja de acridina y 23.000 adeninios cada 1 molécula de naranja de acridina. El estado de ionización de cada especie se establece por el resultado obtenido mediante DRX de monocrystal (ver Figura 16 y Figura 17). Efectivamente, como predijo el modelo de sistemas “amortiguados”, el dicloruro de adeninio fue mucho menos tolerante a la inclusión de moléculas exógenas que los sistemas amortiguados (cloruro de guaninio dihidrato) y sub-amortiguados (cafeína monohidrato).

Para estudiar la capacidad de la naranja de acridina de ocupar un lugar en la red cristalina de cada una de estas formas sólidas, se realizó un cálculo de optimización geométrica empleando la teoría del funcional de la densidad sobre ensambles supramoleculares compuestos por tres iones o moléculas de purina, según corresponda, y por agregados construidos por dos moléculas o iones de purina y una de naranja de acridina intercalada. En todos los casos, las posiciones y orientaciones iniciales se construyeron empleando los datos que presentan estas especies en su estructura cristalina determinada por DRX de monocrystal. La naranja de acridina se ubicó de forma tal de reemplazar la molécula/ion de purina central de su posición estructural, respetando la orientación de sus zonas de carga y la coplanaridad entre las regiones aromáticas de todas las moléculas/iones que conforman el arreglo. La comparación directa de las distancias y posiciones relativas de los bloques de construcción de estos ensambles optimizados respecto a sus porciones equivalentes en las estructuras cristalinas podría dar una idea de la factibilidad de que un ion de colorante reemplace una molécula o ion de la estructura cristalina sin generar alteraciones apreciables en la misma.

En todos los casos las estructuras de partida se construyeron empleando al colorante en su estado protonado debido a que esta será la especie mayoritaria presente en las soluciones empleadas durante la síntesis (pK_a de la naranja de acridina=10,4,⁷⁶ pH de la solución empleada ≈0.3). El estado de carga de la naranja de acridina en diversas condiciones experimentales es un fenómeno ampliamente estudiado en la literatura, debido a que la capacidad de adquirir el estado catiónico aún en condiciones fisiológicas es una de las principales fuerzas impulsoras de su interacción con el ADN.^{77,78} Por lo tanto, está demostrado que este colorante tiene la particularidad de establecer cationes en soluciones de solventes próticos, aún a pH básico, los cuales se estabilizan parcialmente a través de la formación de dímeros.⁷⁹ Estos dímeros se han observado tanto en sólido como en solución,⁸⁰ a pesar de que ambos componentes del ensamble se encuentran en estado catiónico. La adquisición de un estado de carga neta y la formación de dímeros supramoleculares en solución⁸¹ genera cambios en los espectros de absorción y emisión de luz y puede evidenciarse experimentalmente estudiando la presencia de bandas de absorción a 492nm para el monómero protonado, y un hombro a 465nm para el dímero dicatiónico, y bandas de emisión a 532nm para el monómero protonado y 650nm para el dímero dicatiónico en agua ácida.⁷⁸ Las bandas de absorción y emisión del cloruro de guaninio dihidrato dopado con naranja de acridina en estado sólido muestran bandas muy cercanas a los valores reportados ($\lambda_{Abs}=475\text{nm}$, hombro. $\lambda_{Abs}=520\text{nm}$, banda. $\lambda_{Emi}=548\text{nm}$, banda. $\lambda_{Emi}=582\text{nm}$, hombro, Figura 20), especialmente si se considera el efecto que puede llegar a tener la matriz sólida en ambos espectros.

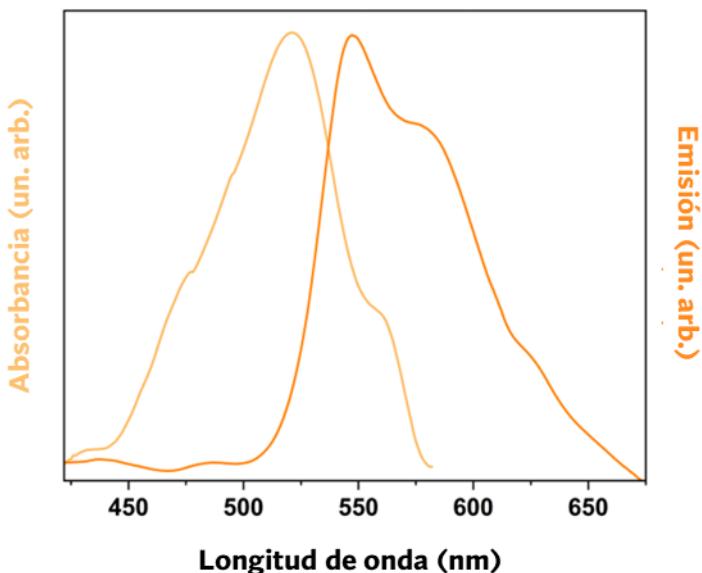


Figura 20. Espectro de absorción y emisión de luz ($\lambda_{\text{Exc}}=405\text{nm}$) en estado sólido del cloruro de guaninio dihidrato intercalado con naranja de acridina.

Aunque la caracterización espectroscópica de la naranja de acridina en los otros dos materiales híbridos se está llevando a cabo actualmente, en vista de los resultados presentados y los datos reportados en bibliografía consideramos que la naranja de acridina se encontrará protonada en todas estas especies. En aquellos dos casos en que la naranja de acridina no presenta el mismo estado de carga que los iones o moléculas que reemplaza en la estructura, esta será considerada como un dopante, tanto del tipo *p* como del tipo *n*, que produce una alteración tolerable en la distribución de cargas en el sistema. No obstante, el estudio de la factibilidad de la intercalación de un agente con una carga neta distinta a la esperada en una red de interacciones electroestáticas es considerado en los cálculos de optimización geométrica y ocupa una parte central de la discusión que se expone a continuación.

Todos los cálculos convergieron a un mínimo local de energía el cual fue corroborado por la ausencia de frecuencias negativas de vibración molecular en sus espectros infrarrojos. En todos los casos se observó que el agregado supramolecular conformado por las purinas y la naranja de acridina respete orientación coplanar propuesta en la estructura de partida, aunque se vieran alteradas levemente las orientaciones rotacionales.

Comparando la distancia entre los bloques de construcción apilados en las estructuras cristalinas y su contraparte en el agregado supramolecular optimizado, encontramos que, en todos los casos, el agregado de la especie exógena disminuye la distancia entre los planos moleculares. Esta compresión puede estar relacionada con la presencia de nuevas interacciones intermoleculares que podrían implicar una mejora del empaquetamiento.

Calculando la variación porcentual entre el valor de la distancia interplanar en la estructura cristalina, obtenido experimentalmente, y la determinada para los ensambles intercalados optimizados computacionalmente, podemos ver que la mayor compresión se genera para la cafeína monohidrato (-4,53%), seguido por el dicloruro de adeninio (-2,60%)

y el cloruro de guaninio dihidrato ($-1,46\%$). Este resultado, aunque puede parecer inicialmente “anti intuitivo” si se piensa únicamente en la repulsión electroestática sufrida por las especies cargadas, resulta ser análogo a lo que sucede para los homodímeros de naranja de acridina y los heterodímeros formados con otras acridinas en solución.⁷⁹ Como predice el modelo de sistemas amortiguados, el material menos amortiguado de todos coincide con ser el más susceptible a un cambio estructural, lo cual deja en evidencia el rol fundamental que cumplen las zonas de amortiguación para compensar las alteraciones estructurales.

Sin embargo, más allá de que esta tendencia condice con lo planteado en la hipótesis de este trabajo, es esencial considerar que esta compresión podría provenir también de la ausencia de los contraíones en el cálculo de optimización geométrica. La presencia de estas entidades cargadas en la cercanía de los ensambles alteraría la red de interacciones atractivas y repulsivas y daría lugar a que se encuentren distintas posiciones de equilibrio en todos estos agregados. El hecho de querer representar un sólido periódico y extendido empleando una porción finita del espacio es una de las principales limitaciones a la hora de emplear este tipo de modelos.

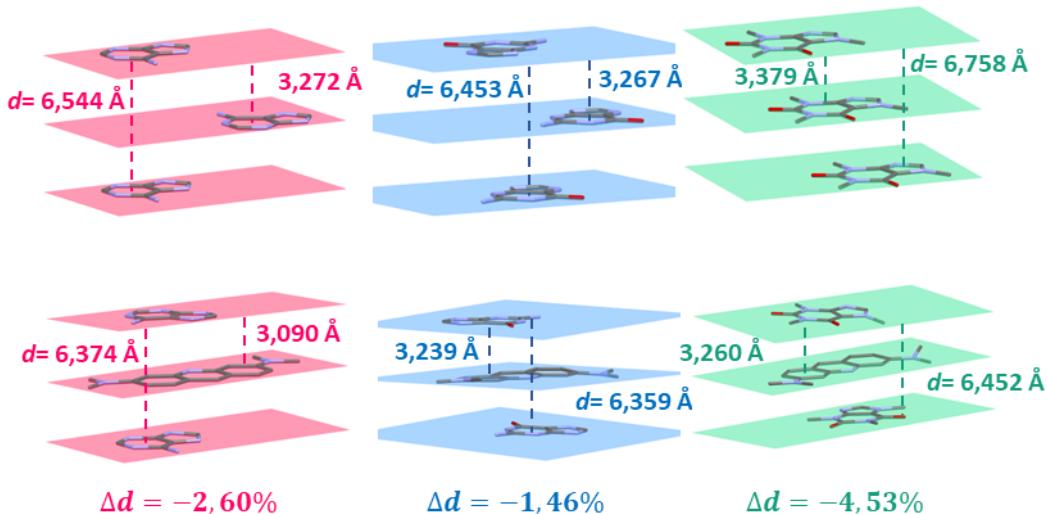


Figura 21. Distancia interplanar determinada para las distintas especies de purinas en el dicloruro de adeninio (rosa), el cloruro de guaninio dihidrato (celeste) y la cafeína monohidrato (verde) y para sus correspondientes agregados en los cuales la especie central fue reemplazada por un ion de naranja de acridina. Debajo de cada grupo se presenta la diferencia porcentual para el cambio de la distancia interplanar observada.

Para estudiar con mayor detalle este fenómeno de contracción a pesar de la repulsión electroestática es necesario investigar cómo se distribuyen las cargas en cada una de estas especies. Esto permitirá conocer si existe una complementariedad en la heterogeneidad con que se distribuye la densidad de carga entre especies aledañas. Al estudiar las superficies de energía potencial calculadas para cada una de las especies individuales en cada agregado supramolecular podemos observar que, en todos los casos, el colorante parece orientarse de forma tal de alinear sus regiones positivas y negativas con las de las purinas que las rodean, casi simulando el rol que hubiera tenido una molécula de purina en la misma locación estructural (Figura 22).

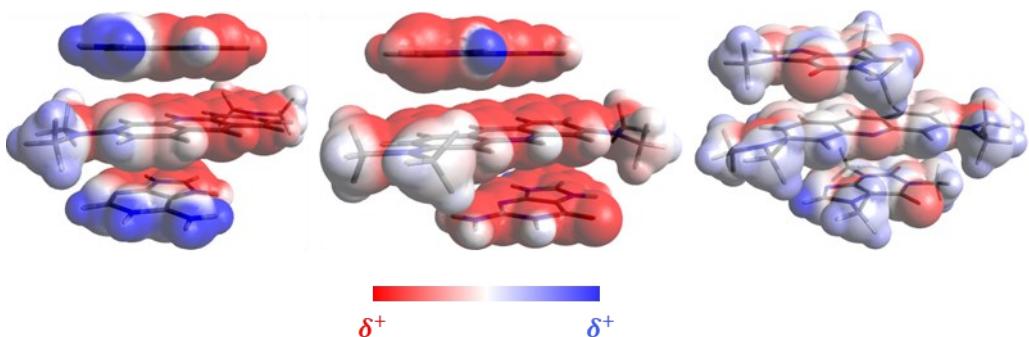


Figura 22. Superficies de energía potencial calculadas para las moléculas/iones individuales de las distintas purinas y la naranja de acridina en los ensambles supramoleculares optimizados por DFT.

De izquierdo a derecha: Adenina, Guanina y Cafeína.

Este resultado es consistente con el hecho de que la naranja de acridina esté reemplazando la posición estructural de una purina en la estructura cristalina, lo cual requiere que la molécula entrante no solamente ocupe una orientación espacial específica, sino también que “imite” de la mejor manera posible la distribución de cargas en la estructura. Este arreglo de planos aromáticos apilados con las densidades de carga positiva y negativa alternadas es una característica típicamente asociada al dímero tipo H que suele desarrollar la naranja de acridina.⁸² La especie exógena no solamente parece estar acomodándose a la estructura para simular la unidad reemplazada, sino que, además, adquiere un tipo de arreglo molecular que la favorece y le permite interactuar muy eficazmente con su entorno. Este comportamiento sinérgico entre la matriz y huésped podría estar compensando la repulsión electroestática y actuando como una de las potenciales fuerzas impulsoras del fenómeno de intercalación.

Esta capacidad de poder intercambiar partículas protonadas por neutras sin alterar apreciablemente su estructura cristalina es una prueba más de la capacidad de adaptarse a las distorsiones estructurales que presentan este tipo de materiales. Sin embargo, es importante considerar que la relación estequiométrica de la especie dopante es muy baja, lo cual es consistente también con el grado tan pequeño de alteración estructural observado.

Como prueba de concepto del impacto que tienen las interacciones del intercalante en la estructura cristalina y, consecuentemente, en las propiedades ópticas y mecánicas del sistema resultante, se sintetizaron una serie de materiales híbridos basados en cloruro de guaninio dihidrato empleando distintas cantidades de naranja de acridina en las soluciones de partida (ver sección Experimental y Figura 23). Empleando la cuantificación por espectrofotometría discutida anteriormente se determinó una relación matriz:dopante que varía desde las 2400 a 10300 unidades de guaninio por cada una de naranja de acridina en el sólido. Estas cantidades se corresponden con porcentajes en moles de colorante 0,0097%, 0,014%, 0,018%, 0,026% y 0,041%.

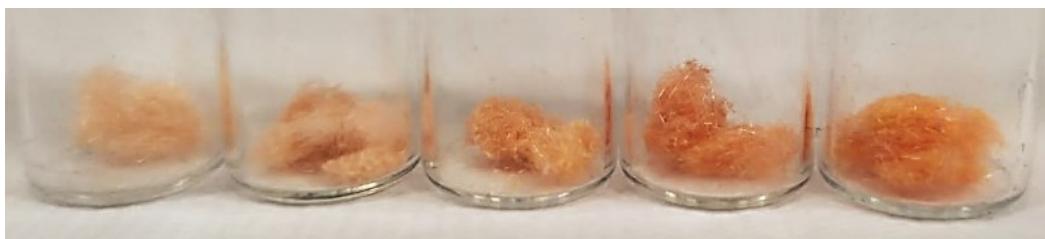


Figura 23. Material cristalino sintetizado empleando distintas cantidades de naranja de acridina en las soluciones de partida. De izquierda a derecha, los materiales presentan un porcentaje en moles de colorante de 0,0097%, 0,014%, 0,018%, 0,026% y 0,041%.

Estudio de las propiedades mecánicas de los materiales híbridos

La disminución en la distancia interplanar observada en el modelo construido a partir de los agregados supramoleculares empleado para los cálculos de optimización por DFT sugiere que podría existir un posible impacto en las propiedades mecánicas de estos materiales al agregar el intercalador. Un acercamiento de todos los bloques de construcción en la estructura podría afectar de manera directa y generalizada a todas las fuerzas de interacción presentes en el sistema, tanto las atractivas como las repulsivas. Esto podría dar como resultado un aumento general de la dureza de este tipo de materiales. Para el caso particular de los materiales elásticos, como el cloruro de guaninio dihidrato, un aumento de la dureza implicaría exacerbar su respuesta elástica, debido a que se vería aumentada la magnitud de las fuerzas reconstitutivas.

El modelo propuesto puede verificarse experimentalmente al realizar las determinaciones del valor de elasticidad porcentual del material obtenido para las muestras de cloruro de guaninio dihidrato con diferente cantidad de colorante intercalado. Como se muestra en la Figura 24, se obtiene una dependencia lineal entre el valor de elasticidad porcentual y la cantidad de colorante intercalado, con valores que van desde 1,15% a 1,50%. Como era esperado, todos ellos se encuentran por encima de la elasticidad porcentual determinada inicialmente para la muestra control sin dopar, que fue de 1,05%.

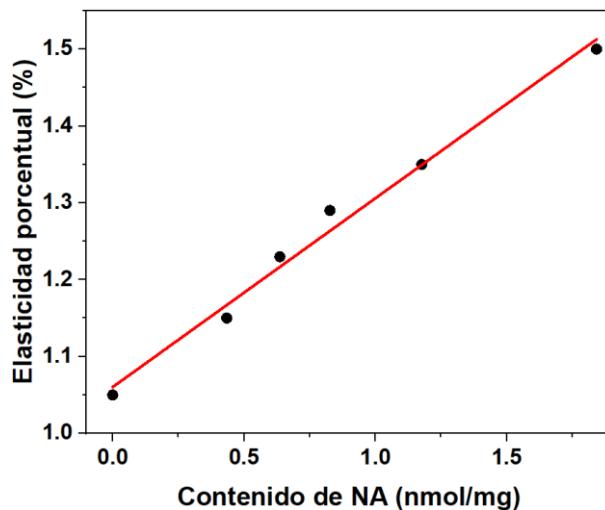


Figura 24. Elasticidad porcentual determinada en función del contenido de colorante para muestras de cloruro de guaninio dihidrato.

En vistas de este resultado, realizamos estudios de determinación estructural por DRX de monocrystal de estos materiales, con el objetivo de identificar una consecuencia experimental directa del impacto de la cantidad de naranja de acridina intercalada. Para eso, se estudió la variación de los parámetros de celda de cada una de estas muestras empleando experimentos de resolución estructural de cristal único medidos a baja temperatura realizados en las facilidades de la línea de luz MANACÁ del LNLS-Sirius, en Brasil. En la Tabla 12 se informan los valores determinados experimentalmente para los parámetros de celda de los materiales de cloruro de guaninio dihidrato sintetizados con distinto porcentaje de dopaje y la diferencia calculada entre estos parámetros y los determinados para el control sin dopaje medido en las mismas condiciones.

Tabla 12. Valores de parámetros de celda determinados para los materiales de cloruro de guaninio dihidrato con distinto porcentaje de dopaje.

Contenido de NA (%, ,10⁻²)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)
0	4,817(4)	13,282(4)	14,624(4)	94,310(4)
0,97	4,841(13)	13,234(3)	14,613(2)	94,164(15)
Cambios respecto al control	0,024(31)	-0,048(14)	-0,011(12)	-0,146(18)
1,4	4,832(3)	13,256(5)	14,613(3)	94,208(14)
Cambios respecto al control	0,015(14)	-0,026(18)	-0,011(14)	-0,102(33)
1,8	4,847(14)	13,226(3)	14,613(13)	94,157(16)
Cambios respecto al control	0,030(33)	-0,056(14)	-0,011(31)	-0,153(36)
2,6	4,849(2)	13,212(2)	14,614(18)	94,100(3)
Cambios respecto al control	0,032(12)	-0,070(12)	-0,010(39)	-0,210(14)
4,1	4,839(12)	13,233(17)	14,619(3)	94,181(9)
Cambios respecto al control	0,022(30)	-0,049(37)	-0,005(14)	-0,129(25)

Si analizamos de forma independiente cada uno de los parámetros de celda en función de la concentración de colorante intercalado en la estructura, no es posible encontrar una tendencia clara. Ninguno de los tres parámetros de longitud parece variar de manera monótona con la concentración de naranja de acridina. Sin embargo, al comparar cada uno de los experimentos respecto al control se puede observar una tendencia clara. Para todos los experimentos, sin importar la concentración de naranja de acridina presente en el material, podemos observar una disminución en los parámetros *b* y *c* y un aumento en el parámetro *a*.

Esta distribución asimétrica en la distorsión de los parámetros de celda podría estar indicando un incremento en la anisotropía de distribución de interacciones. El hecho de que los tres parámetros no se alteren proporcionalmente es un claro indicador de que la presencia del colorante está distorsionando la estructura de una manera particular, y sugiere que la naranja de acridina se encuentra localizada estructuralmente en posiciones específicas. Si la locación del colorante fuera totalmente aleatoria, la totalidad de las distorsiones debería de acumularse y dar lugar a un aumento generalizado de los

parámetros, considerando que en todos los casos el volumen del intercalante es siempre mayor que el del ion de guaninio que reemplaza. Sin embargo, esto no sucede, y se verifica una compresión sistemática en el plano cristalográfico bc , plano que se construye a través de la disposición diagonal de guaninos y a través del cual podrían maximizarse las interacciones de apilamiento aromático (Figura 25 y Figura 16).

Es importante resaltar que esta compresión en el plano bc , en complementariedad con la extensión del eje cristalográfico a , es consistente que un aumento apreciable en la flexibilidad de estos materiales. Podemos entender este fenómeno empleando las herramientas conceptuales discutidas en la introducción. Una compresión en el plano bc podría asociarse a un aumento en la atracción entre los bloques que constituyen el plano de respuesta colectiva (Figura 13.b, bloques celestes). Por otro lado, una elongación del eje a implicaría una disminución en la intensidad de la fuerza restitutiva (Figura 13, magnitud representada por los resortes amarillos), lo que permite alcanzar flexiones mayores frente a una fuerza de igual magnitud.

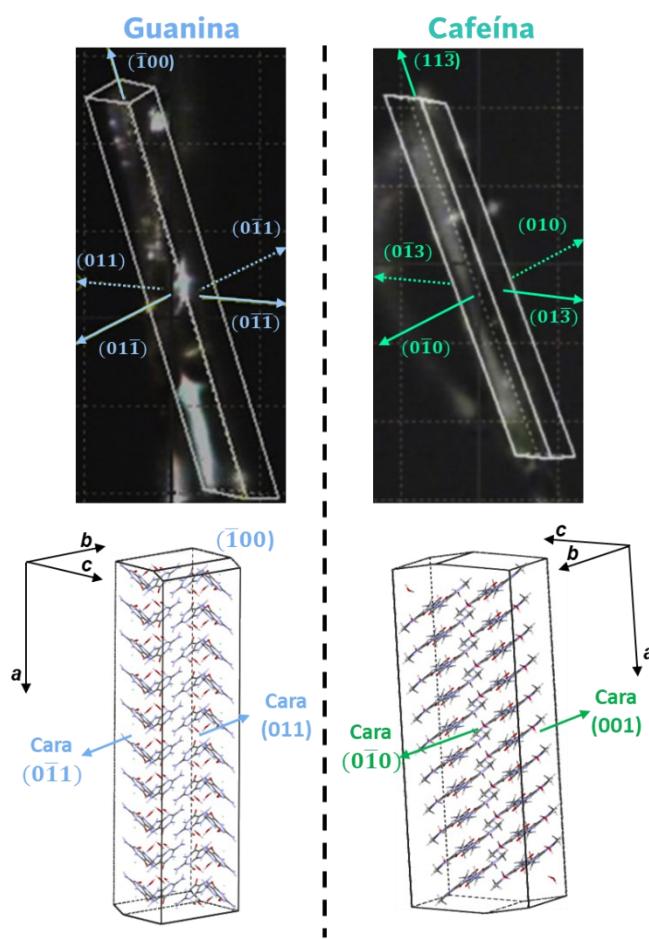


Figura 25. (Arriba) Indexado de las caras de los cristales medidos de cloruro de guaninio dihidrato y cafeína monohidrato. (Abajo) Simulación de los hábitos cristalinos empleando la teoría BFDH y representación de la estructura cristalina en su interior. Se detallan las caras principales para cada hábito.

Realizando la misma comparación entre las dos muestras de cafeína monohidrato sintetizadas (la muestra sin dopar y la muestra con 0,033 %mol de dopante) se obtienen resultados equivalentes, aunque con una diferencia notablemente menor entre ambos

materiales respecto a los observados para el cloruro de guaninio monohidrato (Tabla 13). En este caso, la compresión se observa en el plano ac , el cual corresponde al plano que se orienta de forma perpendicular al apilamiento de las purinas. Una contracción en este plano indica una disminución en la distancia media de apilamiento de estas especies. Al mismo tiempo, se observa también una elongación en el eje cristalográfico b , el cual se encuentra orientado de forma longitudinal al apilamiento (Figura 25). La elongación observada en ese eje es consistente con el alejamiento lateral de las purinas en la estructura cristalina.

Tabla 13. Valores de parámetros de celda determinados para los materiales de cafeína monohidrato con distinto porcentaje de dopaje.

Contenido de NA (%, $\times 10^{-2}$)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)
0	3,903(6)	16,636(10)	14,665(14)	97,66(4)
3,3	3,902(6)	16,638(10)	14,649(14)	97,64(4)
Cambios respecto al control	-0,001(8)	0,002(14)	-0,016(20)	-0,02(6)

De forma equivalente a lo observado para los materiales basados en guanina, es probable que esta alteración estructural propicie un aumento en la respuesta flexible plástica de este material. Sin embargo, una caracterización detallada de las propiedades mecánicas que permite verificar esta hipótesis es parte de las perspectivas a corto plazo que se desprenden de este trabajo de tesis.

Estudio de las propiedades ópticas en los materiales híbridos

Para estudiar la naturaleza de la interacción entre la naranja de acridina y el entorno cristalino se determinó el tiempo de decaimiento de fluorescencia del colorante en el dicloruro de adenina y el cloruro de guanina dihidrato. La caracterización espectroscópica tanto de la matriz de cafeína monohidrato como del colorante intercalado en su interior se está llevando a cabo actualmente debido a las limitaciones experimentales que impone la velocidad de su secado en condiciones ambientales.

Empleando la misma metodología se obtuvo el tiempo de decaimiento de la sonda en la solución acuosa ácida que se utilizó para la síntesis de los materiales (ver los detalles en la sección experimental). Adicionalmente, se determinó el tiempo de vida de fluorescencia de las matrices sin intercalador para poder sustraer cualquier aporte esporádico a los datos propios del colorante (para el cloruro de guaninio dihidrato: 2.45 ± 0.04 ns; para la cafeína monohidrato y para el dicloruro de adeninio se están llevando a cabo las determinaciones actualmente). Los perfiles de decaimiento fueron parametrizados utilizando funciones monoexponentiales para todos los casos, salvo para la muestra de dicloruro de adeninio para la cual se tuvo que utilizar una función biexponencial. Esto se debe, principalmente, a que el contenido de sonda fluorescente presente en este material es extremadamente bajo, lo que resulta en que sea muy difícil separar esta emisión de la generada por la matriz cristalina (Figura 26).

Al comparar los tiempos de decaimiento calculados para la naranja de acridina en estos dos materiales y en la solución acuosa ácida podemos observar que estos aumentan en todos los casos (NA en solución: $1,78 \pm 0,03$ ns; NA en A: $3,09 \pm 0,09$ ns; NA en G: $2,72 \pm 0,02$ ns). Este resultado es consistente tanto con la pérdida de vías de decaimiento no radiativos debido a la rigidez que impone la red cristalina, como con la formación de un ensamble supramolecular estable que altera la distribución electrónica en la especie y estabiliza los estados de energía excitados. Este aumento apreciable del tiempo de decaimiento permite descartar que la interacción entre el material y el colorante haya sido producto de una mera adhesión superficial y confirma la naturaleza intracristalina de su incorporación. Como referencia, al intercalarse en la doble hebra de ADN, la naranja de acridina adquiere un tiempo de fluorescencia de 4,7 a 5,33ns.^{75,83}

El hecho de que el tiempo de decaimiento aumente respecto de aquel determinado para la solución acuosa ácida, pero aun así sea menor que el determinado para el fenómeno de intercalación en la doble hebra de ADN podría estar indicando las diferencias en las propiedades supramoleculares entre estos dos tipos de huéspedes. Particularmente, el hecho de que el tiempo de decaimiento no alcance el valor reportado para la intercalación en ADN es consistente con la formación de agregados supramoleculares muy estables, como los observados en los resultados de optimización estructural por DFT, que facilitan los procesos de transferencia de carga que disipan energía de modos no radiativos.⁸⁴

La relación entre la estabilidad del agregado supramolecular formado y el tiempo de decaimiento observado se ilustra claramente al estudiar el caso del dicloruro de adeninio. Este material presentó valores de tiempo de decaimiento de fluorescencia de la naranja de acridina mayores a los determinados para el cloruro de guaninio dihidrato. Consistentemente, también presentó un valor de compresión estructural mayor. Ambos hechos parecen estar indicando la presencia de un agregado supramolecular muy estable entre la sonda y los iones de purina de la red cristalina.

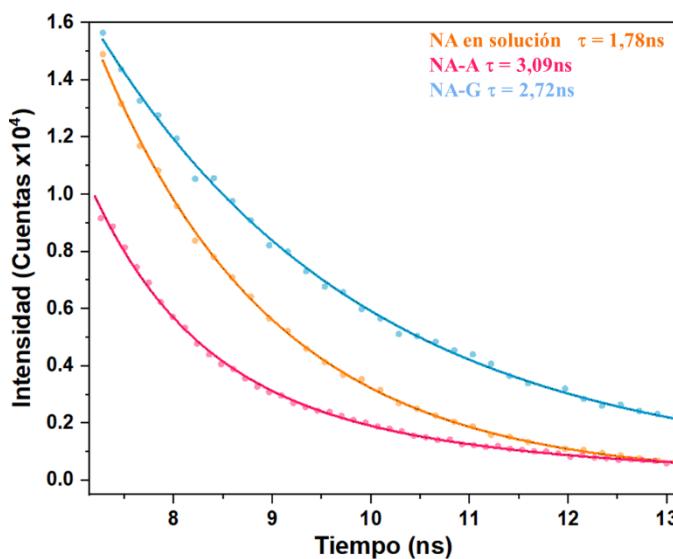


Figura 26. Perfiles de decaimiento de la fluorescencia de la naranja de acridina en solución acuosa ácida (naranja), e intercalada en dicloruro de adeninio (rosa), cloruro de guaninio dihidrato (celeste). En línea continua se representan las funciones de parametrización empleadas.

Gracias a que los materiales biogénicos basados en guanina presentan un índice de refracción elevado ($n > 1,83$),³⁵ estos pueden alcanzar fácilmente la condición de reflexión total interna requerida para actuar como guías de onda. Aunque este valor de índice de refracción está reportado para las fases anhidras, podemos esperar valores de índice de refracción mayores al del aire para materiales densos y transparentes como son los cristales únicos de cloruro de guaninio dihidrato.

Debido a la cristalinidad, el tamaño y la excelente respuesta elástica presentada por el material híbrido cloruro de guaninio dihidrato intercalado con naranja de acridina se decidió estudiar su capacidad de actuar como guía de onda, tanto en reposo como flexionado. Para cuantificar el desempeño como guía de onda de este material, y el impacto de las deformaciones mecánicas, se determinaron los coeficientes de pérdida óptica (*OLCs* por sus siglas en inglés) para un cristal único relajado y doblado empleando un láser continuo de excitación de 532nm.

Con el fin de garantizar que la luz observada en los extremos del cristal sea únicamente aquella proveniente de la fluorescencia y no corresponda a luz espuria del haz incidente este se hizo incidir de forma perpendicular al eje principal del cristal y enfocado. Bajo estas condiciones, una fracción de la luz emitida por fluorescencia se acopla a la guía de ondas y emerge en los extremos del material. La fracción de la luz que es guiada y emitida puede ser cuantificada calculando la relación entre la luz determinada en la región de irradiación y la luz emitida en los extremos del material (f_G).⁸⁵

A pesar de la pureza de la muestra estudiada, los defectos presentes en el material cristalino pueden actuar como dispersores de Rayleigh, generando que parte de la luz propagada escape de este antes de alcanzar la punta. Al mismo tiempo, los efectos de absorción pueden contribuir a la atenuación sufrida por la luz guiada. Por lo tanto, la fracción de luz guiada decae exponencialmente con la distancia entre el extremo del material de donde se colecta la luz y la posición en donde este es iluminado. Esta relación se puede modelar empleando una función de decaimiento monoexponencial como se presenta en la Ecuación 30:

Ecuación 30

$$f_G = e^{-\alpha \Delta l}$$

Empleando un modelo exponencial para ajustar los datos de f_G en función de la distancia podemos obtener un valor para el coeficiente lineal de atenuación α en unidades de μm^{-1} , el cual puede relacionarse con el coeficiente de pérdida óptica a través de la Ecuación 31:

Ecuación 31

$$OLC = \frac{10}{L} \log(f_G) = \frac{10 \cdot \alpha}{2.303}$$

Para el material con la mayor cantidad de dopante (0,041% de NA) se obtuvo un coeficiente de perdida óptica de $0,0122 \text{ dB}/\mu m$. Al realizar la misma determinación sobre un cristal flexionado se obtuvo un valor similar, de $0,0125 \text{ dB}/\mu m$.

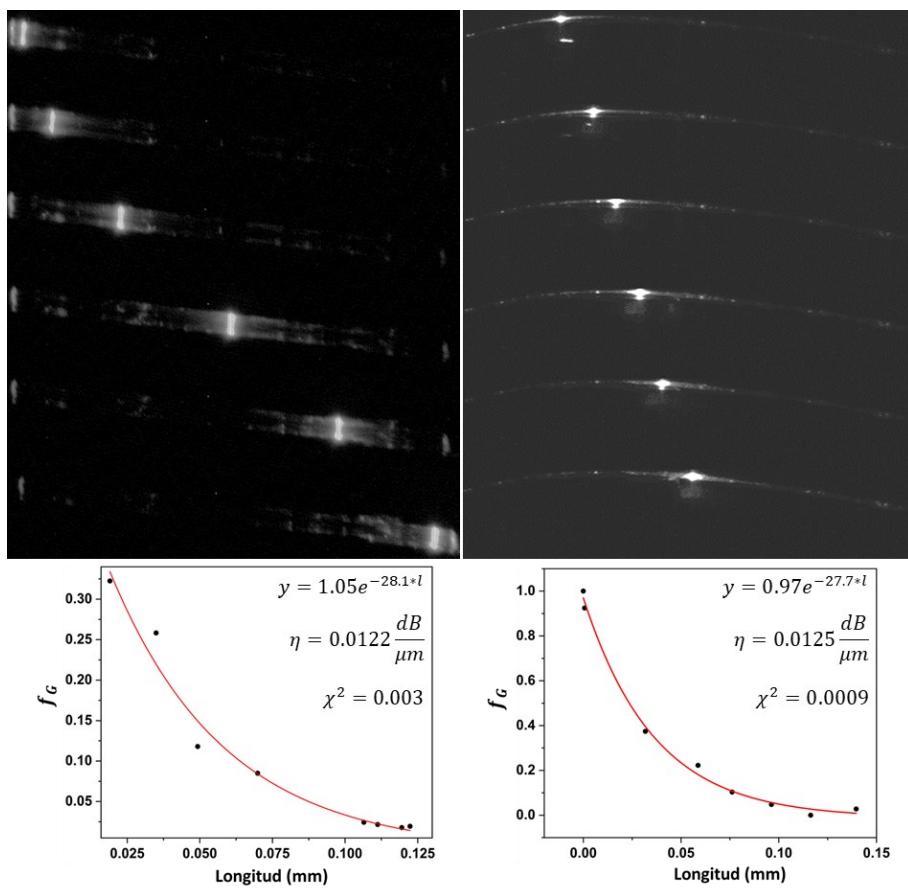


Figura 27. Arriba: Fotografías tomadas durante la determinación de f_G en cristales de cloruro de guaninio dihidrato dopado con 0,041% de naranja de acridina, relajado (izquierdo) y doblado (derecho). Abajo: Datos obtenidos para la determinación de f_G en función de la distancia. En puntos negros se representan los datos determinados experimentalmente y en línea roja continua el modelo monoexponencial empleado para la determinación del coeficiente de atenuación lineal.

Este resultado muestra que la propagación de la luz guiada en este material no parece verse afectada por la flexión, aunque pueden observarse pérdidas menores que podrían estar relacionadas con la deformación mecánica.⁸⁶ A modo de comparación, el OLC determinado para un cristal de cloruro de guaninio dihidrato sin dopar es de 0,0195 dB/ μm .

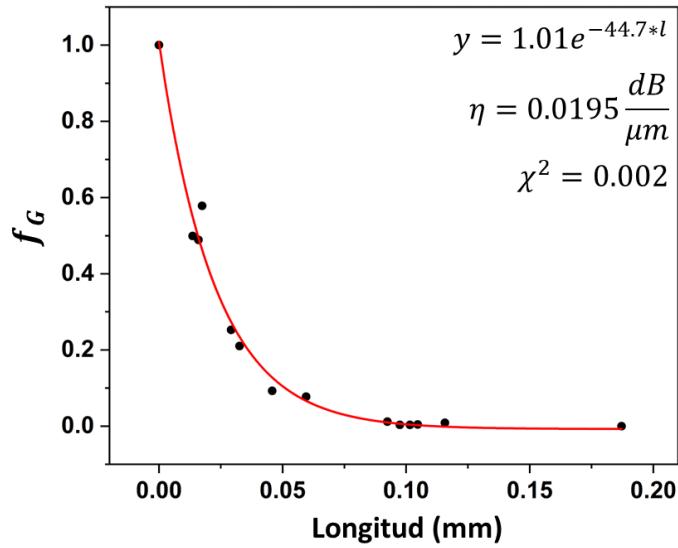


Figura 28. Datos obtenidos para la determinación de f_G en función de la distancia para un cristal de cloruro de guaninio dihidrato. En puntos negros se representan los datos determinados experimentalmente y en línea roja continua el modelo monoexponencial empleado para la determinación del coeficiente de atenuación lineal.

El hecho de que las pérdidas ópticas sean menores para el material dopado es consistente con la diferencia en la longitud de onda de la luz guiada en cada caso. La longitud de onda de la luz emitida por la fluorescencia de la naranja de acridina se encuentra corrida casi 58nm hacia el rojo respecto a la luz emitida por el cloruro de guaninio dihidrato sin dopar (Figura 29).

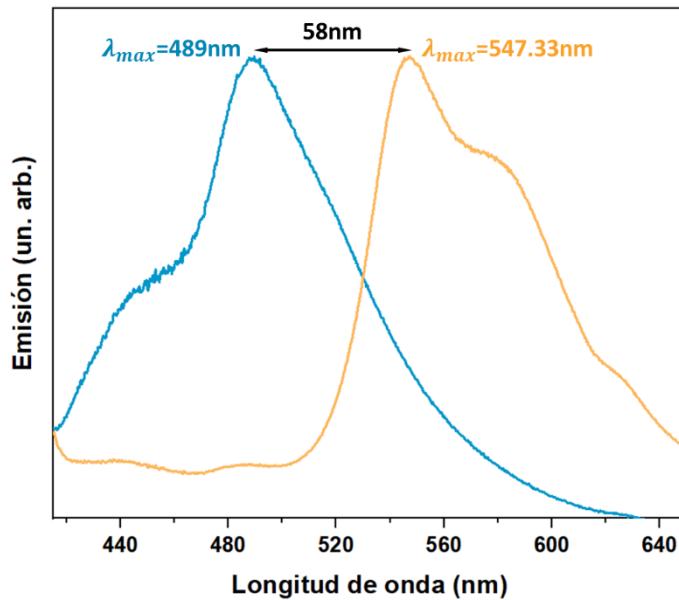


Figura 29. Espectros de emisión de fluorescencia normalizados para el cloruro de guaninio dihidrato (celeste, $\lambda_{ex}=405\text{nm}$) y el material dopado con naranja de acridina (naranja, $\lambda_{ex}=532\text{nm}$)

Por lo tanto, podemos esperar que la luz que es emitida y guiada en los cristales sin dopar se disperse con mayor intensidad debido a la dispersión Rayleigh, ya que este fenómeno escala con la cuarta potencia de la frecuencia de la luz guiada. La relación entre

las pérdidas ópticas para el material dopado y el material sin dopar debería ser proporcional a la división entre las frecuencias de emisión, a la cuarta (Ecuación 32):

Ecuación 32

$$\frac{OLC^G}{OLC^{NA}} = \left(\frac{\nu_{Max}^G}{\nu_{Max}^{NA}} \right)^4$$

Si consideramos únicamente las frecuencias en las que se produce el máximo de emisión de luz para estos dos materiales (489,00nm para el cloruro de guaninio dihidrato y 547,33nm para el material dopado), utilizando la Ecuación 32 obtenemos una proporción esperada entre los OLC de 0,63. Este valor es consistente con la relación obtenida para los OLCs determinados experimentalmente, que es de 0,625. En vistas de estos resultados podemos concluir que, en estos materiales, las pérdidas ópticas de luz están dominadas principalmente por la dispersión y no por fenómenos de absorción.

Para estudiar el impacto que tienen los fenómenos de absorción en la propiedad de guiar la luz de estos materiales se decidió realizar un experimento similar, pero iluminando la muestra sobre uno de los extremos con el haz del láser orientado de forma paralela al eje principal del cristal.

En estas condiciones se pudo observar cómo la intensidad de fluorescencia disminuye gradualmente a lo largo del cristal. Esto es consistente con una atenuación de la luz de excitación debido a la absorción generada por las moléculas del dopante (Figura 30, arriba). Esta atenuación de la luz detectada a lo largo del cristal sigue una tendencia monoexponencial acorde a lo esperado por la Ley de Lambert-Beer (Figura 30, abajo). Utilizando una función monoexponencial para modelar esta atenuación en el cristal sin flexionar se extrajo un coeficiente de absorción de $\epsilon_{532\text{nm}} \approx 2424 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este valor es menor al calculado experimentalmente para la naranja de acridina en solución acuosa ácida excitada a la misma longitud de onda, que es de $\epsilon_{532\text{nm}} \approx 6756 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La diferencia puede atribuirse, al menos parcialmente, al ambiente supramolecular establecido por la matriz cristalina alrededor del colorante. Considerando que la probabilidad de absorción de un fotón depende del ángulo relativo entre el dipolo de transición molecular y el campo eléctrico de excitación, la inmovilización de la naranja de acridina en la estructura cristalina generará que algunas moléculas puedan no quedar alineadas de manera eficaz respecto al haz incidente. Esto daría lugar a una disminución en la población de moléculas capaces de absorber luz y, por lo tanto, un valor de absorbividad por mol menor al determinado para una muestra que puede adquirir cualquier orientación posible.

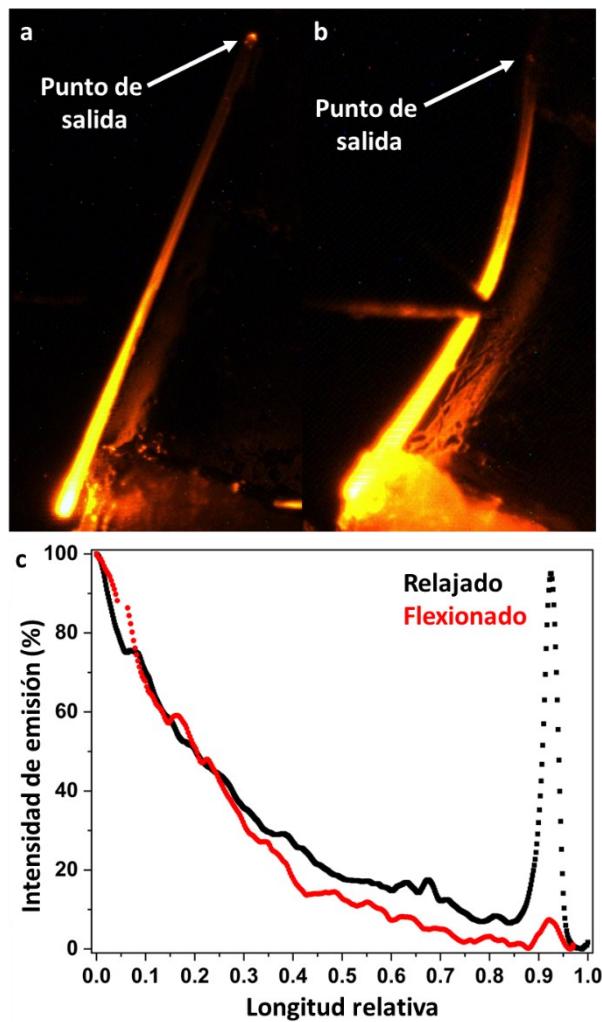


Figura 30. Fenómeno de propagación de onda en un cristal de cloruro de guanino dihidrato intercalado con naranja de acridina, relajado (a) y flexionado (b). (c) Intensidad de emisión normalizada medida a lo largo del cristal. Debido a las restricciones del ámbito dinámico lineal de la cámara empleada para tomar la fotografía, la porción de los píxeles asociados a la primera mitad del cristal estaba saturada y no fueron tomados en cuenta para la cuantificación. Los valores de emisión fueron normalizados respecto a la intensidad medida en el punto de aplicación de la deformación mecánica.

Debido a la respuesta plástica presentada por los cristales de cafeína monohidrato y su probada capacidad para albergar este mismo colorante, resulta interesante poder realizar una determinación similar sobre este material. Sin embargo, la baja estabilidad de los cristales en condiciones atmosféricas debido a la deshidratación imposibilitó la realización de estos experimentos. No obstante, no se descarta la posibilidad de realizar ensayos de este estilo en el futuro empleando un contenedor de muestra adaptado a las condiciones de humedad controlada requeridas.

Conclusiones y perspectivas

Durante este capítulo de tesis se presentó la caracterización estructural completa de tres nuevos materiales híbridos basados en sales o hidratos de purinas de interés biológico y tecnológico; el dícloruro de adeninio, el cloruro de guaninio dihidrato y la cafeína monohidrato, intercalados con el colorante naranja de acridina. Tanto su respuesta mecánica como algunas de sus propiedades ópticas fueron estudiadas, y un modelo que relaciona la estructura cristalina, las interacciones supramoleculares, y la respuesta mecánica pudo ser propuesto empleando datos experimentales y cálculos de estructura electrónica empleando DFT.

Para todas las estructuras cristalinas estudiadas en este capítulo, tanto las sintetizadas durante este trabajo de tesis como las reportadas en bibliografía, se pudo desarrollar un modelo de respuesta mecánica basado en la existencia de zonas de amortiguación, las cuales son generadas debido a la distribución anisotrópica de sus interacciones intermoleculares, y la compensación parcial que se produce entre las interacciones atractivas y repulsivas en cada una de las dimensiones del cristal. Este modelo sienta las bases para el diseño racional de nuevos bloques de construcción que permitan desarrollar materiales cristalinos flexibles, tanto elásticos como plásticos, basados en sales. Esto resultado es particularmente interesante si se tiene en consideración que sólo existen hasta ahora dos casos reportados de este tipo de materiales en bibliografía, y uno de ellos es el presentado en esta tesis para el cloruro de guaninio dihidrato. Poder sintetizar estos materiales bajo condiciones controladas en un laboratorio resulta extremadamente relevante para empezar a pensar en futuras aplicaciones tecnológicas. Adicionalmente, contar con la presencia de aniones y cationes diversifica notoriamente las posibilidades a la hora de diseñar sintones supramoleculares, y permite explorar nuevas combinaciones de propiedades que no podrían ser alcanzadas empleando únicamente solvatos o co-cristales.

El proceso de intercalación del colorante pudo ser realizado sin que se observen grandes cambios en el empaquetamiento cristalino de estos materiales respecto a sus estructuras cristalinas puras. Las propiedades mecánicas características de cada material (dureza, o flexibilidad elástica o plástica, según corresponda) no solamente se conservaron luego de la intercalación si no que, además, en los casos en que pudieron determinarse analíticamente, se vieron intensificadas. El ejemplo del cloruro de guaninio dihidrato ilustra este efecto, el cual vio alterada su elasticidad porcentual relativa de 1,06% para el material puro hasta un máximo de 1,5% para el material intercalado.

El análisis cristalográfico, en complementariedad con lo observado empleando modelos computacionales, sugiere que este incremento puede ser consecuencia de un aumento en la interacción entre el colorante y la matriz de purinas respecto a la propia interacción purina-purina. Este aumento en la afinidad de interacción se evidencia experimentalmente al comparar el tiempo de decaimiento de fluorescencia y la absorbividad molar de la naranja de acridina en estos materiales respecto a la molécula en solución acuosa ácida.

Por último, se pudo testear la capacidad de actuar como guías de ondas de los materiales híbridos basados en sales de guanina y naranja de acridina, y se estudió su comportamiento tanto en estado relajado como bajo estrés mecánico, obteniéndose resultados muy prometedores para su potencial aplicación para el desarrollo de dispositivos tecnológicos. Los resultados presentados en este capítulo de tesis revelaron que ambos materiales estudiados, el cloruro de guaninio dihidrato con y sin dopaje, gracias a su alta calidad cristalina, su gran tamaño y excelente respuesta mecánica pueden actuar como guías de onda de manera muy eficaz, aún bajo condiciones de flexión. Ambos materiales presentaron valores de coeficiente de pérdida óptica de 19,5 dB/mm y 12,2 dB/mm, respectivamente. Es importante destacar que se pudo atribuir la diferencia observada entre estos dos coeficientes de pérdida óptica al impacto que tiene la dispersión por efecto Rayleigh al cambiar la longitud de onda de la luz guiada a través del material.

Estos resultados ofrecen información valiosa que puede utilizarse para estudiar los biomateriales basados en guaninas que se han encontrado recientemente en especies como geckos, arañas, peces, y otros seres vivos, para los cuales se observó una coloración estructural asignada a la naturaleza fotónica de sus arreglos cristalinos. La capacidad de intercalar cromóforos fue propuesta previamente en otros estudios, pero sin sugerir ni identificar de forma precisa la identidad química de estas potenciales moléculas exógenas. La intercalación de naranja de acridina en las distintas redes de purinas presentadas en este trabajo ilustra de manera clara y concisa la capacidad de estos materiales y, en específico, de aquellos basados en guanina, de albergar en su interior moléculas ópticamente activas sin alterar de forma apreciable su estructura.

Dado el aparente rol funcional que la evolución parece haberle asignado a los materiales basados en guanina, es previsible un considerable aumento del interés en su estudio. Principalmente en aquellos de origen biológico, los cuales sirven de inspiración para el diseño y la fabricación de nuevos sistemas con propiedades similares. Los resultados presentados en este capítulo permiten remarcar no solamente las capacidades que tienen estas purinas de actuar como plataformas para diseñar nuevos materiales híbridos bioinspirados que pueden ser adaptados eligiendo el intercalador, sino que, además, abre la puerta a la posibilidad de pensar nuevos materiales basados en otras moléculas emparentadas estructuralmente.

Experimental

Consideraciones generales

Todos los reactivos y solventes utilizados para la síntesis de las distintas formas cristalinas fueron obtenidos comercialmente y utilizados sin acondicionamientos o purificaciones previas. Todos los materiales basados en purinas se sintetizaron adaptando procedimientos reportados en la bibliografía para las formas sólidas de la guanina, la adenina, y la cafeína.^{57,87}

Instrumentación

Los espectros UV-vis fueron medidos empleando un espectrómetro Hewlett-Packard 8453 de arreglo de diodos y cubetas de cuarzo con paso óptico de 10 y 2 mm, disponible en el laboratorio. Se utilizaron lámparas de deuterio (30 W) y wolframio (50 W). Las microscopías ópticas de luz polarizada se realizaron utilizando un microscopio triocular Nikon SMZ-745T con un sistema de iluminación Nikon Ni-150. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa MicrometricsTM SE Premium para las mediciones y el programa ImageJ⁸⁸ para el análisis.

Caracterización por difracción de rayos X de polvos

Las medidas de pDRX fueron realizadas en un difractómetro PANalytical Empyrean equipado con un tubo de rayos X con radiación Cu K α de 4-kW (K-Alpha1=1,541 Å, K-Alpha2=1,544 Å, generador de potencia regulada: 60 kV y 100 mA), filtro beta de níquel y un detector de área PIXcel3D que emplea una geometría de haz paralelo (rendijas adaptadas según cada determinación, mascara incidente 15mm). Las muestras fueron medidas sobre un portamuestra de silicio monocristalino. Para todos los experimentos de pDRX los datos fueron medidos en un intervalo 2 theta de 4° a 50° con barrido continuo, velocidad de barrido de 200 s por paso y con 0,026° por paso.

Medidas de difracción de rayos X de cristal único

Los datos cristalográficos fueron colectados a 100K empleando las facilidades de la línea de luz MANACA en el Laboratorio de Luz Sincrotrón brasiler Sirius, empleando un detector PILATUS2M (Dectris) y un haz monocromático de rayos X de $\lambda=0,670185\text{ \AA}$. Los datos fueron adquiridos en modo rotante usando una técnica de escaneo del ángulo ω con un valor máximo de $2\theta_{\text{max}} = 60^\circ$. Esto se realizó empleando el software de colección de datos MXCuBE.⁸⁹ Debido a que la línea de luz MANACA está especialmente diseñada para cristalografía de macromoléculas se debió utilizar una cabeza goniométrica mini-kappa para colectar múltiples sets de datos a distinto ángulo sobre la misma muestra y evitar la falta de completitud a ángulos distantes.⁹⁰ La reducción y posterior unión de los sets de datos se realizó empleando el software XDS⁹¹ utilizando el protocolo MANACAutoproc.⁹² Los efectos de absorción de la radiación fueron considerados y corregidos empleando el método empírico implementados en el software XDS.

Las estructuras fueron resueltas utilizando el programa Olex2⁹³ con la metodología ShelXL⁹⁴ y refinadas utilizando el programa ShelXL. Los átomos distintos de hidrógeno

fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno fueron incluidos, en su mayoría, en la posición calculada geométricamente sobre según el tipo de enlace formado y se les asignó un parámetro térmico extrapolado del calculado para su átomo parental. Los átomos de hidrógeno unidos al agua fueron localizados en los mapas de Fourier de cada estructura, y se les asignó una posición relativa fija con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

Las estructuras resueltas se encuentran subidas a la base de datos cristalográfica de Cambridge (CCDC) y pueden encontrar bajo los códigos: 2320856 para el cloruro de guaninio dihidrato dopado con 0,0410%mol de naranja de acridina, 2320857 para el dopado con 0,0260%mol, 2320858 para el dopado con 0,0180%mol, 2320859 para el dopado con 0,0140%mol, 2320860 para el dopado con 0,0097%mol, 2320861 para el cloruro de guaninio dihidrato sin dopar, 2331945 para la cafeína monohidrato dopada con 0,033%mol y 2331944 para la cafeína monohidrato sin dopar.

Los datos de indexación de las caras de los cristales de cloruro de guaninio dihidrato y cafeína monohidrato se realizaron empleando los datos cristalográficos colectados a temperatura ambiente en el difractómetro Oxford Diffraction Gemini E con radiación Mo K α ($\lambda = 0,71 \text{ \AA}$) y Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) con un monocromador de grafito, disponible en el INQUIMAE (FCEN-UBA). El software empleado para realizar la indexación fue el CrysAllis PRO de la empresa Agilent.⁹⁵

Cálculos de redes de energía

Las redes de energía fueron calculadas utilizando el programa CrystalExplorer⁹⁶ con el paquete de química computacional Gaussian09. Para realizar el cálculo se tuvieron en cuenta todas las moléculas completas contenidas total o parcialmente en una esfera de radio 3,80 Å alrededor de la molécula estudiada. En funcional y las bases utilizadas fueron especialmente utilizadas para el cálculo de redes de energía y provienen de la parametrización del funcional y las bases CE-B3LYP/6-31G(d,p). Todas las figuras fueron representadas para todas aquellas energías mayores a 13kJ/mol.

Metodología computacional

Los cálculos de estructura electrónica empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT) fueron realizados utilizando el programa ORCA.⁹⁷ El funcional utilizado fue BP86 en conjunto con un set de bases de Ahlrichs def2-SVP y una triple corrección de dispersión (DFT-D3). En todos los casos se empleó la aproximación por resolución de la identidad. Los cálculos de SCF fueron del tipo de spin polarizado y se utilizó un criterio de convergencia de 10^{-8} Eh en energía y 5.10^{-7} como elemento máximo de error tolerable en el vector de DIIS. En todos los casos la grilla de integración final fue elevada a 6 para garantizar la precisión de los valores obtenidos.

Microscopía confocal

Las imágenes de fluorescencia de los cristales fueron obtenidas empleando un portamuestra de escaneo diseñado en el laboratorio, un láser continuo de 532nm o pulsado de diodo de 515nm (500ps de ancho a media altura). Tanto la excitación como la colección de la emisión se llevó a cabo empleando el mismo objetivo de microscopio Olympus 60X de inmersión en agua con una apertura numérica de 1.2. La fluorescencia fue separada de la

excitación empleando un espejo dicroico 550DCXR de la empresa Chroma Technologies. La fluorescencia luego fue enfocada a través de un 397afeín de 100 μ m y filtrada empleando un filtro notch de 532nm. La colección se llevó a cabo empleando dos detectores de conteo fotónico por avalancha de 50 μ m luego de que el haz fuera dividido con un separador de luz polarizada. La colección de datos y el análisis se realizó empleando un programa diseñado en el laboratorio.⁹⁸

Síntesis de los materiales cristalinos

Cloruro de Guaninio Dihidrato: 20 mg de guanina comercial anhidra se suspendieron en 500 μ L de agua. Esta suspensión se acidificó agregando 200 μ L de HCl © y se calentó hasta disolución total del sólido. La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego de aproximadamente 20 minutos se observó la aparición de un precipitado cristalino agujiforme. El material resultante fue separado por centrifugación, purificado realizando lavados con agua destilada y secado al vacío. Luego de cada síntesis la pureza cristalográfica fue confirmada por difracción de rayos X de polvos de todo el material sintetizado.

Para la obtención del material intercalado con naranja de acridina se reemplazaron los 500 μ L de agua de la suspensión inicial por distintas cantidades de una solución acuosa ácida de naranja de acridina 0,2 mg/mL (100 μ L para 0.0097%, 200 μ L para 0.014%, 300 μ L para 0.018%, 400 μ L para 0.026%, y 500 μ L para 0.041%). Todas estas suspensiones fueron llevadas hasta un volumen final de 500 μ L con la cantidad necesaria de agua destilada, acidificadas mediante el agregado de 200 μ L de HCl © y calentados de la misma manera que se informó anteriormente. La solución color naranja resultante se dejó enfriar hasta aparición de un sólido cristalino agujiforme de color característico. El aislamiento, la purificación y el secado del material se realiza igual a lo informado para el material sin intercalar.

Dicloruro de Adeninio: 25 mg de adenina comercial se suspendieron en 164 μ L de agua. Esta suspensión se acidificó agregando 336 μ L de HCl © y se calentó hasta disolución total de todo el sólido. La solución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego de una hora se observó la aparición de un precipitado cristalino con forma de prisma. El material resultante fue separado por centrifugación, purificado realizando lavados con agua destilada y secado al vacío. Luego de cada síntesis la pureza cristalográfica fue confirmada por difracción de rayos X de polvos de todo el material sintetizado. Para la obtención del material intercalado con naranja de acridina se reemplazan los 164 μ L de agua de la suspensión inicial por 164 μ L de una solución acuosa ácida de naranja de acridina 0,2 mg/mL. El resto del protocolo se realizó de manera equivalente a lo informado para la fase sin intercalador.

Cafeína Monohidrato: 29,1 mg de cafeína comercial se suspendieron en 985 μ L de agua. Esta suspensión acidificó agregando 15 μ L de HCl © y se calentó hasta disolución total del sólido. La solución resultante se dejó enfriar en heladera y luego de aproximadamente 20 minutos se observó la aparición de un precipitado cristalino agujiforme. El material resultante fue separado por centrifugación, purificado realizando lavados con agua destilada y secado al vacío. Luego de cada síntesis la pureza

cristalográfica fue confirmada por difracción de rayos X de polvos de todo el material sintetizado. Para la obtención del material intercalado con naranja de acridina se reemplazaron los 985 μ L de agua de la suspensión inicial por 985 μ L de una solución acuosa ácida de naranja de acridina 0,2 mg/mL. El resto del protocolo se realiza de manera equivalente a lo informado para la fase sin intercalar.

Medidas de la propiedad de guiado de ondas

Las determinaciones de la propiedad de guía de ondas fueron realizadas sobre cristales únicos seleccionados según su tamaño y calidad cristalina. Estos fueron iluminados en dirección perpendicular al eje mayor del cristal empleando un láser continuo de 532nm. El haz colimado, de 6 mm de diámetro, fue estrechamente enfocado hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 2 μ m empleando para ello un objetivo de microscopio Leica HI Plan 10X con una apertura numérica de 0,25. La potencia del láser fue ajustada empleando filtros de densidad óptica previamente calibrados. Las fotografías de las muestras iluminadas fueron tomadas utilizando una cámara monocromática CM3-U3-31S4M-CS 1/1.8" Chameleon®3 montada sobre un microscopio Nikon C-POL 1004029, empleando una magnificación de 4X o 5X, según correspondiera para el tamaño de muestra. El tiempo de exposición, la ganancia de la cámara y la potencia del láser fueron optimizadas para cada muestra en vistas de evitar que hubiera saturación de cualquiera de los píxeles en toda la imagen.

Medidas de elasticidad

La elasticidad se determinó a través de una prueba de doblado por flexión empleando una configuración de tres puntos (Figura 31). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un *holder* diseñado en el laboratorio, el cual permitió aplicar una fuerza de deformación sobre el centro de un cristal con una aguja metálica adaptada adherida a la punta de un tornillo micrométrico. Un microscopio óptico con luz polarizada equipado con una cámara digital fue utilizado para registrar el proceso de doblado de los cristales. La elasticidad porcentual fue calculada empleando la ecuación de Euler-Bernoulli (Ecuación 33) considerando únicamente el efecto de la flexión.

Ecuación 33. Ecuación de Euler-Bernoulli

$$\varepsilon(\%) = \frac{y}{R} * 100$$

El parámetro "y" refiere a la distancia entre el plano que se estudia y el plano que se mantiene frente a la flexión, y "R" es el radio de curvatura de este plano neutral. Para todos los cálculos se consideró que los cristales tienen una sección de corte rectangular lo cual nos permitió utilizar el plano central del cristal como plano invariante. Esta suposición se verificó experimentalmente por microscopías de los cristales individuales. Al tener sección rectangular podemos asumir que las regiones que sufren la mayor tensión de compresión y elongación son las que se corresponden con los planos más cercanos y más lejanos al centro de curvatura, respectivamente. El espesor del cristal durante la flexión se calcula empleando la Ecuación 34.

Ecuación 34

$$\varepsilon(\%) = \frac{t/2}{R} * 100$$

Para calcular R se realiza la construcción geométrica que se muestra en la Figura 31 y la Ecuación 35. En el esquema, L se refiere a la longitud de separación y h_{max} al desplazamiento máximo. Para todas las mediciones realizadas se tomó como referencia el plano neutral de los cristales.

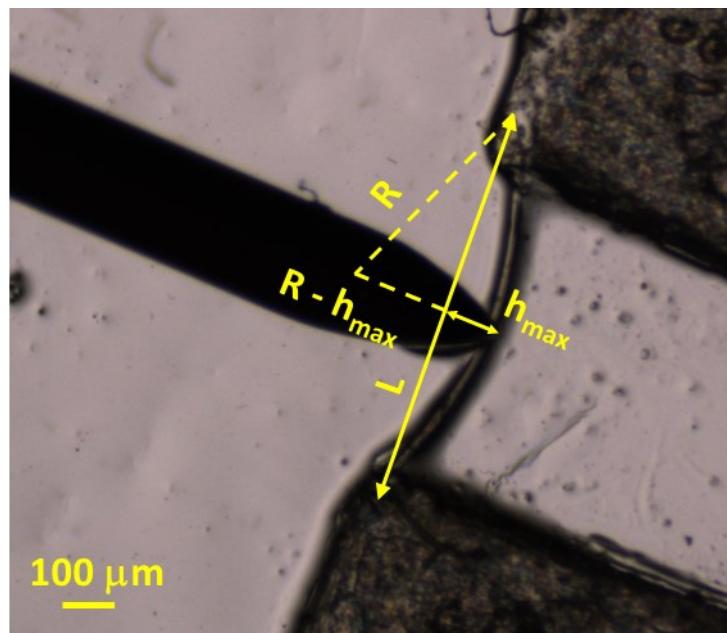


Figura 31. Esquema de la construcción geométrica utilizada para calcular los parámetros de flexión.

Ecuación 35

$$R = \frac{h_{max}^2 + \frac{L^2}{4}}{2h_{max}}$$

Información suplementaria del capítulo VI

Tablas cristalográficas

Debido a la condición hizo estructural de todas las muestras de cloruro de guaninio dihidrato estudiadas y considerando que todos los experimentos de difracción de rayos X de monocristal se realizaron de forma consecutiva para las seis muestras empleando la misma línea de luz y las mismas condiciones experimentales, las tablas de datos cristalográficos y refinamiento estructural se informan únicamente para el cloruro de guaninio dihidrato y dos muestras dopadas. De manera análoga, la tabla de distancias de puente de hidrógeno se informa únicamente para las muestras sin dopar y el máximo contenido de dopante intercalado con el fin de ilustrar las similitudes entre las redes supramoleculares desarrolladas por ambas.

Datos cristalográficos y de refinamiento estructural para los materiales basados en guanina

	Cloruro de guaninio dihidrato	Cloruro de guaninio dihidrato dopado con 0,0097%mol de naranja de acridina	Cloruro de guaninio dihidrato dopado con 0,0410%mol de naranja de acridina
Fórmula empírica	$C_5H_{10}ClN_5O_3$	$C_5H_{10}ClN_5O_3$	$C_5H_{10}ClN_5O_3$
Peso molecular	223,63	223,63	223,63
Temperatura/K	100(1)	100(1)	100(1)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$	$P2_1/c$	$P2_1/c$
a/Å	4,817(4)	4,8410(13)	4,8390(12)
b/Å	13,282(4)	13,234(3)	13,2330(17)
c/Å	14,624(4)	14,613(2)	14,619(3)
$\alpha/^\circ$	90	90	90
$\beta/^\circ$	94,31(4)	94,164(15)	94,181(9)
$\gamma/^\circ$	90	90	90
Volumen/Å³	933,0(8)	933,7(3)	933,6(3)
Z	4	4	4
$\rho_{calc}g/cm^3$	1,592	1,591	1,591
μ/mm^{-1}	0,344	0,344	0,344
F(000)	464	464	464
Radiación	Sincrotrón ($\lambda = 0,67019$)	Sincrotrón ($\lambda = 0,67019$)	Sincrotrón ($\lambda = 0,67019$)
Rango angular en 2θ empleado	3,912 a 49,984	3,92 a 60,064	3,92 a 55

durante la determinación /°			
Rango de índices	-6 ≤ h ≤ 6, -16 ≤ k ≤ 16, -18 ≤ l ≤ 18	-6 ≤ h ≤ 6, -19 ≤ k ≤ 18, -17 ≤ l ≤ 18	-6 ≤ h ≤ 6, -17 ≤ k ≤ 17, -20 ≤ l ≤ 20
Reflexiones colectadas	12550	15733	15123
Reflexiones independientes	1951 [$R_{int} = 0,0401$, $R_{sigma} = 0,0232$]	2681 [$R_{int} = 0,0526$, $R_{sigma} = 0,0343$]	2490 [$R_{int} = 0,0276$, $R_{sigma} = 0,0184$]
GOF (F^2)	1,041	1,054	1,176
R Final [$I >=2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0310$, $wR_2 = 0,0784$	$R_1 = 0,0404$, $wR_2 = 0,1077$	$R_1 = 0,0372$, $wR_2 = 0,0964$
R Final [todos los datos]	$R_1 = 0,0359$, $wR_2 = 0,0816$	$R_1 = 0,0439$, $wR_2 = 0,1113$	$R_1 = 0,0375$, $wR_2 = 0,0967$

Tabla de puentes de hidrógeno presentes en la estructura cristalina

Para simplificar la representación se indica como “Control” a la estructura de cloruro de guaninio dihidrato sin dopar y como “0,0410” a la muestra que contiene ese porcentaje en moles de dopante. En la ilustración se detalla la numeración empleada para rotular cada átomo en la estructura.

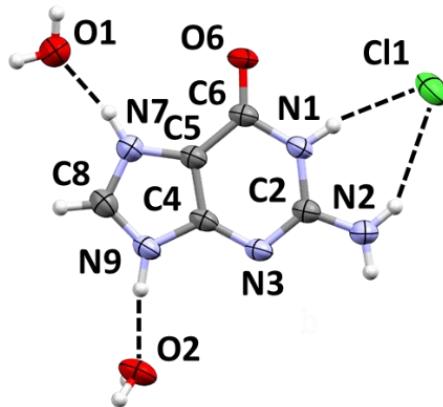


Ilustración 1. Nomenclatura empleada para la identificación atómica del cloruro de guaninio dihidrato.

D	H	A	Estructura	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
N2	H2A	N3	Control	0,88	2,13	3,01	177,8
			0,0410	0,88	2,131	3,011	177,86
N7	H7	O1	Control	0,88	1,786	2,643	164,19
			0,0410	0,88	1,788	2,645	163,94
N9	H9	O2	Control	0,88	1,816	2,687	170,12
			0,0410	0,88	1,813	2,684	170,23
O2W	H2WA	O6	Control	0,85	1,928	2,739	159,32
			0,0410	0,85	1,931	2,742	159,11
N1	H1A	Cl	Control	0,872	2,271	3,13	168,14
			0,0410	0,873	2,275	3,126	164,72

N2	H2B	Cl	Control 0,0410	0,88	2,665	3,433	146,5
O1W	H1WB	Cl	Control 0,0410	0,85	2,279	3,115	167,99
O2W	H2WB	Cl	Control 0,0410	0,85	2,299	3,128	165,11
O1W	H1WA	Cl	Control 0,0410	0,85	2,321	3,157	167,54
				0,85	2,317	3,155	168,97

1-1-x, 2-y,1-z; 2+x,+y,+z; 3-1+x,3/2-y,1/2+z; 41+x,3/2-y,1/2+z; 5-x,2-y,1-z; 61-x,-1/2+y,1/2-z

Datos cristalográficos y de refinamiento estructural para los materiales basados en cafeína

	402afeína Monohidrato	402afeína monohidrato dopada con 0.0033%mol de naranja de acridina
Fórmula empírica	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₃	C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₃
Peso molecular	212.22	212.22
Temperatura/K	100(1)	100(1)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c
a/Å	3.903(6)	3.894(4)
b/Å	16.636(10)	16.642(5)
c/Å	14.665(14)	14.659(4)
α/°	90	90
β/°	97.66(4)	97.61(4)
γ/°	90	90
Volumen/Å³	943.7(18)	941.6(10)
Z	4	4
ρ_{calc}g/cm³	1.494	1.497
μ/mm⁻¹	0.103	0.103
F(000)	448	448
Radiación	Sincrotrón ($\lambda = 0.67019$)	Sincrotrón ($\lambda = 0.67019$)
Rango angular en 2θ empleado durante la determinación /°	3.508 a 49.992	4.616 a 49.992

Rango de índices	$-4 \leq h \leq 4, -20 \leq k \leq 20, -18 \leq l \leq 18$	$-4 \leq h \leq 4, -20 \leq k \leq 20, -17 \leq l \leq 17$
Reflexiones colectadas	12404	12455
Reflexiones independientes	1963 [$R_{\text{int}} = 0.0687, R_{\text{sigma}} = 0.0433$]	1946 [$R_{\text{int}} = 0.0866, R_{\text{sigma}} = 0.0509$]
GOF (F^2)	2.359	1.15
R Final [$I >= 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.1710, wR_2 = 0.5062$	$R_1 = 0.0920, wR_2 = 0.2284$
R Final [todos los datos]	$R_1 = 0.1800, wR_2 = 0.5115$	$R_1 = 0.1033, wR_2 = 0.2348$

Tabla de puentes de hidrógeno presentes en la estructura cristalina

Para simplificar la representación se indica como “Control” a la estructura de cloruro de guaninio dihidrato sin dopar y como “0,033” a la muestra que contiene ese porcentaje en moles de dopante. En la ilustración se detalla la numeración empleada para rotular cada átomo en la estructura.

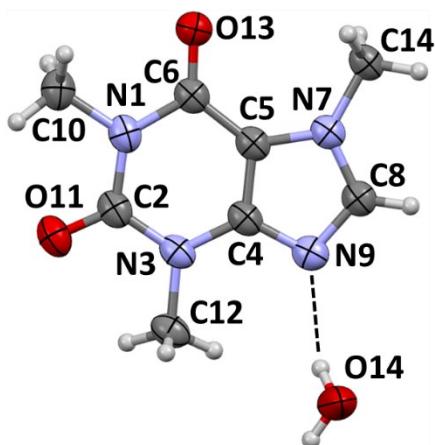


Ilustración 2. Nomenclatura empleada para la identificación atómica de la cafeína monohidrato.

D	H	A	Estructura	$d(D-H)/\text{\AA}$	$d(H-A)/\text{\AA}$	$d(D-A)/\text{\AA}$	$D-H-A/\text{\'{A}}$
O14	H14	N9 ¹	Control	0,85	2,42	2,807	108,0
			0,033	0,85	2,29	2,809	119,7

¹1-X,1-Y,1-Z

Publicaciones y presentaciones en eventos científicos de los resultados de este capítulo

Publicaciones:

1. *Elastic Guanine-Based Single Crystals with Optical Waveguiding Properties: Toward Tailored Bioinspired Materials.* Federico Movilla, José H. Hodak, and Florencia Di Salvo, *Crystal Growth & Design*, **2024**, 24 (3), 1010-1023.
2. *Guanine crystal formation by bacteria.* María Elisa Pavan, Federico Movilla, Esteban E. Pavan, Florencia Di Salvo, Nancy I. López, M. Julia Pettinari. *BMC Biol*, 21, 66 (**2023**).

Presentaciones a congresos:

1. XVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía. Noviembre de **2023** “*Diseño racional de nuevos materiales bioinspirados basados en xantinas*” Juan Manuel Rey, Federico Movilla, Antonio Requena, José Hodak y Florencia Di Salvo.
2. XVIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía. Noviembre de **2023** “*Análisis estructural y estudio de las propiedades mecánicas de materiales cristalinos derivados de cafeína*” Juan Manuel Rey, Federico Movilla, Antonio Requena, José Hodak y Florencia Di Salvo.
3. XXIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Abril de **2023** “*Estudio de las propiedades ópticas y estructurales de materiales cristalinos flexibles bioinspirados*”, Juan Manuel Rey, Federico Movilla, José H. Hodak, Florencia Di Salvo.
4. XVII Reunión Anual de la AACr. Noviembre de **2022** “*Cristales de xantinas con elasticidad y potencial aplicación como huéspedes de moléculas fotoquímicamente activas.*” Federico Movilla, Juan Manuel Rey, José H. Hodak, Florencia Di Salvo.

Bibliografía

- (1) Dove, M. T. *Structure and Dynamics: An Atomic View of Materials*; Oxford University Press, 2003; Vol. 1.
- (2) Naumov, P.; Chizik, S.; Panda, M. K.; Nath, N. K.; Boldyreva, E. Mechanically Responsive Molecular Crystals. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (22), 12440–12490. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00398>.
- (3) Jacob, N. I.; Israelachvili, N. Intermolecular and Surface Forces. *San Diego Acad.* **1992**.
- (4) Liu, H.; Lu, Z.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Zhang, H. Highly Elastic Organic Crystals for Flexible Optical Waveguides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (28), 8448–8452. <https://doi.org/10.1002/anie.201802020>.
- (5) Liu, B.; Lu, Z.; Tang, B.; Liu, H.; Liu, H.; Zhang, Z.; Ye, K.; Zhang, H. Self-Waveguide Single-Benzene Organic Crystal with Ultralow-Temperature Elasticity as a Potential Flexible Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (51), 23117–23121. <https://doi.org/10.1002/anie.202011857>.
- (6) Tang, B.; Yu, X.; Ye, K.; Zhang, H. Manifold Mechanical Deformations of Organic Crystals with Optical Waveguiding and Polarization Rotation Functions. *Adv. Opt. Mater.* **2022**, *10* (2), 2101335. <https://doi.org/10.1002/adom.202101335>.
- (7) Baronas, P.; Kreiza, G.; Adoménas, P.; Adoménienė, O.; Kazlauskas, K.; Ribierre, J.-C.; Adachi, C.; Juršėnas, S. Low-Threshold Light Amplification in Bifluorene Single Crystals: Role of the Trap States. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (3), 2768–2775. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14702>.
- (8) Zhang, W.; Yan, Y.; Gu, J.; Yao, J.; Zhao, Y. S. Low-Threshold Wavelength-Switchable Organic Nanowire Lasers Based on Excited-State Intramolecular Proton Transfer. *Angew. Chem.* **2015**, *127* (24), 7231–7235. <https://doi.org/10.1002/ange.201502684>.
- (9) Nakagawa, Y.; Kinoshita, K.; Kasuno, M.; Nishimura, R.; Morimoto, M.; Yokojima, S.; Hatakeyama, M.; Sakamoto, Y.; Nakamura, S.; Uchida, K. White Light Emission Generated by Two Stacking Patterns of a Single Organic Molecular Crystal. *Mater. Adv.* **2022**, *3* (16), 6466–6473. <https://doi.org/10.1039/D2MA00670G>.
- (10) Ding, R.; Feng, J.; Zhang, X.-L.; Zhou, W.; Fang, H.-H.; Liu, Y.-F.; Chen, Q.-D.; Wang, H.-Y.; Sun, H.-B. Fabrication and Characterization of Organic Single Crystal-Based Light-Emitting Devices with Improved Contact Between the Metallic Electrodes and Crystal. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (45), 7085–7092. <https://doi.org/10.1002/adfm.201400832>.
- (11) Ding, R.; Feng, J.; Dong, F.-X.; Zhou, W.; Liu, Y.; Zhang, X.-L.; Wang, X.-P.; Fang, H.-H.; Xu, B.; Li, X.-B.; Wang, H.-Y.; Hotta, S.; Sun, H.-B. Highly Efficient Three Primary Color Organic Single-Crystal Light-Emitting Devices with Balanced Carrier Injection and Transport. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (13), 1604659. <https://doi.org/10.1002/adfm.201604659>.
- (12) Naumov, P.; Karothu, D. P.; Ahmed, E.; Catalano, L.; Commins, P.; Mahmoud Halabi, J.; Al-Handawi, M. B.; Li, L. The Rise of the Dynamic Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (31), 13256–13272. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c05440>.
- (13) Saha, S.; Mishra, M. K.; Reddy, C. M.; Desiraju, G. R. From Molecules to Interactions to Crystal Engineering: Mechanical Properties of Organic Solids. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51* (11), 2957–2967. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00425>.

- (14) Ghosh, S.; Reddy, C. M. Elastic and Bendable Caffeine Cocrystals: Implications for the Design of Flexible Organic Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (41), 10319–10323. <https://doi.org/10.1002/anie.201204604>.
- (15) Huang, R.; Wang, C.; Wang, Y.; Zhang, H. Elastic Self-Doping Organic Single Crystals Exhibiting Flexible Optical Waveguide and Amplified Spontaneous Emission. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (21), 1800814. <https://doi.org/10.1002/adma.201800814>.
- (16) Worthy, A.; Grosjean, A.; Pfrunder, M. C.; Xu, Y.; Yan, C.; Edwards, G.; Clegg, J. K.; McMurtrie, J. C. Atomic Resolution of Structural Changes in Elastic Crystals of Copper(II) Acetylacetone. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (1), 65–69. <https://doi.org/10.1038/nchem.2848>.
- (17) Horstman, E. M.; Keswani, R. K.; Frey, B. A.; Rzeczycki, P. M.; LaLone, V.; Bertke, J. A.; Kenis, P. J. A.; Rosania, G. R. Elasticity in Macrophage-Synthesized Biocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (7), 1815–1819. <https://doi.org/10.1002/anie.201611195>.
- (18) Timoshenko, S.; MacCullough, G. H. Stresses in Beams. *Elem. Strength Mater. Van Nostrand Co. Inc N. Y. NY* **1940**.
- (19) Pozharskii, A. F.; Katritzky, A. R.; Soldatenkov, A. T. *Heterocycles in Life and Society*; Wiley Chichester, 2011.
- (20) Robak, P.; Robak, T. Older and New Purine Nucleoside Analogs for Patients with Acute Leukemias. *Cancer Treat. Rev.* **2013**, *39* (8), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.03.006>.
- (21) Hong, W.-H.; Chang, T.; Daly, R. E. Vidarabine. In *Analytical Profiles of Drug Substances*; Elsevier, 1986; Vol. 15, pp 647–672.
- (22) Freeman, S.; Gardiner, J. M. Acyclic Nucleosides as Antiviral Compounds. *Mol. Biotechnol.* **1996**, *5*, 125–137.
- (23) Scheinberg, D. A.; Jurcic, J. G. *Treatment of Leukemia and Lymphoma*; Elsevier, 2004.
- (24) Hirsch, A.; Gur, D.; Polishchuk, I.; Levy, D.; Pokroy, B.; Cruz-Cabeza, A. J.; Addadi, L.; Kronik, L.; Leiserowitz, L. “Guanigma”: The Revised Structure of Biogenic Anhydrous Guanine. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (24), 8289–8297. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b03549>.
- (25) Levy-Lior, A.; Shimoni, E.; Schwartz, O.; Gavish-Regev, E.; Oron, D.; Oxford, G.; Weiner, S.; Addadi, L. Guanine-Based Biogenic Photonic-Crystal Arrays in Fish and Spiders. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (2), 320–329. <https://doi.org/10.1002/adfm.200901437>.
- (26) Movilla, F.; Hodak, J. H.; Di Salvo, F. Elastic Guanine-Based Single Crystals with Optical Waveguiding Properties: Toward Tailored Bioinspired Materials. *Cryst. Growth Des.* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.3c01003>.
- (27) Mahapatra, S.; Nayak, S. K.; Prathapa, S. J.; Guru Row, T. N. Anhydrous Adenine: Crystallization, Structure, and Correlation with Other Nucleobases. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (4), 1223–1225. <https://doi.org/10.1021/cg700743w>.
- (28) Stolar, T.; Lukin, S.; Požar, J.; Rubčić, M.; Day, G. M.; Biljan, I.; Jung, D. Š.; Horvat, G.; Užarević, K.; Meštrović, E.; Halasz, I. Solid-State Chemistry and Polymorphism of the Nucleobase Adenine. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (6), 3262–3270. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00243>.
- (29) Tret'yak, S. M.; Mitkevich, V. t; Sukhodub, L. F. Crystal Structure of Adenine Trihydrate. *Crystallogr Rep* **1987**, *32*, 1268–1771.

- (30) Cunane, L. M.; Taylor, M. R. Experimental Charge Density and Electrostatic Potential in Adenine Hydrochloride Hemihydrate at 123 K. *Acta Crystallogr. B* **1993**, *49* (3), 524–530. <https://doi.org/10.1107/S0108768192009157>.
- (31) Kesel, A. J.; Oberthur, W.; Polborn, K. CCDC 266003: Experimental Crystal Structure Determination. **2005**. <https://doi.org/10.5517/cc8xsrp>.
- (32) Teyssier, J.; Saenko, S. V.; van der Marel, D.; Milinkovitch, M. C. Photonic Crystals Cause Active Colour Change in Chameleons. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 6368. <https://doi.org/10.1038/ncomms7368>.
- (33) Moudříková, Š.; Nedbal, L.; Solovchenko, A.; Mojzeš, P. Raman Microscopy Shows That Nitrogen-Rich Cellular Inclusions in Microalgae Are Microcrystalline Guanine. *Algal Res.* **2017**, *23*, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.009>.
- (34) Pavan, M. E.; Movilla, F.; Pavan, E. E.; Di Salvo, F.; López, N. I.; Pettinari, M. J. Guanine Crystal Formation by Bacteria. *BMC Biol.* **2023**, *21* (1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01572-8>.
- (35) Kinoshita, S.; Yoshioka, S.; Miyazaki, J. Physics of Structural Colors. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71* (7), 076401. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/71/7/076401>.
- (36) Jordan, T. M.; Partridge, J. C.; Roberts, N. W. Non-Polarizing Broadband Multilayer Reflectors in Fish. *Nat. Photonics* **2012**, *6* (11), 759–763. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.260>.
- (37) Denton, E. J. Review Lecture: On the Organization of Reflecting Surfaces in Some Marine Animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1970**, *258* (824), 285–313. <https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0037>.
- (38) Rutowski, R. L. Sexual Discrimination Using Visual Cues in the Checkered White Butterfly (*Pieris Protodice*). *Z. Für Tierpsychol.* **1981**, *55* (4), 325–334. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1981.tb01275.x>.
- (39) Ingram, A. I.; Parker, A. r. A Review of the Diversity and Evolution of Photonic Structures in Butterflies, Incorporating the Work of John Huxley (The Natural History Museum, London from 1961 to 1990). *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2008**, *363* (1502), 2465–2480. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2258>.
- (40) Land, M. F.; Nilsson, D.-E. *Animal Eyes*; OUP Oxford, 2012.
- (41) Kreysing, M.; Pusch, R.; Haverkate, D.; Landsberger, M.; Engelmann, J.; Ruiter, J.; Mora-Ferrer, C.; Ulbricht, E.; Grosche, J.; Franze, K.; Streif, S.; Schumacher, S.; Makarov, F.; Kacza, J.; Guck, J.; Wolburg, H.; Bowmaker, J. K.; von der Emde, G.; Schuster, S.; Wagner, H.-J.; Reichenbach, A.; Francke, M. Photonic Crystal Light Collectors in Fish Retina Improve Vision in Turbid Water. *Science* **2012**, *336* (6089), 1700–1703. <https://doi.org/10.1126/science.1218072>.
- (42) Pinsk, N.; Wagner, A.; Cohen, L.; Smalley, C. J. H.; Hughes, C. E.; Zhang, G.; Pavan, M. J.; Casati, N.; Jantschke, A.; Goobes, G.; Harris, K. D. M.; Palmer, B. A. Biogenic Guanine Crystals Are Solid Solutions of Guanine and Other Purine Metabolites. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (11), 5180–5189. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c00724>.
- (43) Guille, K.; Clegg, W. Anhydrous Guanine: A Synchrotron Study. *Acta Crystallogr. C* **2006**, *62* (8), o515–o517. <https://doi.org/10.1107/S0108270106026011>.
- (44) Thewalt, U.; Bugg, C. E.; Marsh, R. E. The Crystal Structure of Guanine Monohydrate. *Acta Crystallogr. B* **1971**, *27* (12), 2358–2363. <https://doi.org/10.1107/S0567740871005880>.
- (45) Maixner, J.; Zachová, J. Redetermination of the Structure of Guanine Hydrochloride Monohydrate. *Acta Crystallogr. C* **1991**, *47* (11), 2474–2476. <https://doi.org/10.1107/S0108270191005322>.

- (46) Lewis, T. C.; Tocher, D. A. Redetermination of Guaninium Chloride Dihydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2005**, *61* (4), o1023–o1025. <https://doi.org/10.1107/S160053680500752X>.
- (47) Matković-Čalogović, D.; Sanković, K. Guaninium Dichloride. *Acta Crystallogr. C* **1999**, *55* (3), 467–469. <https://doi.org/10.1107/S0108270198014607>.
- (48) Derollez, P.; Correia, N. T.; Danède, F.; Capet, F.; Affouard, F.; Lefebvre, J.; Descamps, M. Ab Initio Structure Determination of the High-Temperature Phase of Anhydrous Caffeine by X-Ray Powder Diffraction. *Acta Crystallogr. B* **2005**, *61* (3), 329–334. <https://doi.org/10.1107/S010876810500546X>.
- (49) Edwards, H. G. M.; Lawson, E.; Matas, M. de; Shields, L.; York, P. Metamorphosis of Caffeine Hydrate and Anhydrous Caffeine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, *0* (10), 1985–1990. <https://doi.org/10.1039/A702041D>.
- (50) Lehmann, C. W.; Stowasser, F. The Crystal Structure of Anhydrous β -Caffeine as Determined from X-Ray Powder-Diffraction Data. *Chem. – Eur. J.* **2007**, *13* (10), 2908–2911. <https://doi.org/10.1002/chem.200600973>.
- (51) Dichi, E.; Legendre, B.; Sghaier, M. Physico-Chemical Characterisation of a New Polymorph of Caffeine. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, *115* (2), 1551–1561. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3429-0>.
- (52) Sutor, D. J. The Structures of the Pyrimidines and Purines. VII. The Crystal Structure of Caffeine. *Acta Crystallogr.* **1958**, *11* (7), 453–458. <https://doi.org/10.1107/S0365110X58001286>.
- (53) Suzuki, E.; Shirotani, K.; Tsuda, Y.; Sekiguchi, K. Water Content and Dehydration Behavior of Crystalline Caffeine Hydrate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1985**, *33* (11), 5028–5035. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.5028>.
- (54) Griesser, U. J.; Burger, A. The Effect of Water Vapor Pressure on Desolvation Kinetics of Caffeine 4/5-Hydrate. *Int. J. Pharm.* **1995**, *120* (1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00416-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00416-3).
- (55) Carlucci, L.; Gavezzotti, A. Molecular Recognition and Crystal Energy Landscapes: An X-Ray and Computational Study of Caffeine and Other Methylxanthines. *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11* (1), 271–279. <https://doi.org/10.1002/chem.200400499>.
- (56) Pirttimäki, J.; Laine, E.; Ketolainen, J.; Paronen, P. Effects of Grinding and Compression on Crystal Structure of Anhydrous Caffeine. *Int. J. Pharm.* **1993**, *95* (1), 93–99. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90394-U](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90394-U).
- (57) Gurau, G.; Kelley, S. P.; Di Bona, K. R.; Smiglak, M.; Rogers, R. D. Anhydrous Caffeine Hydrochloride and Its Hydration. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (9), 4658–4662. <https://doi.org/10.1021/cg300878j>.
- (58) Perumalla, S. R.; Sun, C. C. Confused HCl: Hydrogen Chloride or Hydrochloric Acid? *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18* (21), 6462–6464. <https://doi.org/10.1002/chem.201103669>.
- (59) Mercer, A.; Trotter, J. Crystal and Molecular Structure of 1,3,7-Trimethyl-2,6-Purinedione Hydrochloride Dihydrate (Caffeine Hydrochloride Dihydrate). *Acta Crystallogr. B* **1978**, *34* (2), 450–453. <https://doi.org/10.1107/S0567740878003337>.
- (60) Ashby, M. F. *Materials and Sustainable Development*; Butterworth-Heinemann, 2022.
- (61) Bučar, D.-K.; Henry, R. F.; Lou, X.; Duerst, R. W.; Borchardt, T. B.; MacGillivray, L. R.; Zhang, G. G. Z. Co-Crystals of Caffeine and Hydroxy-2-Naphthoic Acids: Unusual Formation of the Carboxylic Acid Dimer in the Presence of a Heterosynthon. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (3), 339–346. <https://doi.org/10.1021/mp070004b>.
- (62) Harkins, T. R.; Freiser, H. Adenine-Metal Complexes ^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (5), 1132–1135. <https://doi.org/10.1021/ja01538a030>.

- (63) Hammud, H. H.; Nemer, G.; Sawma, W.; Touma, J.; Barnabe, P.; Bou-Mouglabey, Y.; Ghannoum, A.; El-Hajjar, J.; Usta, J. Copper–Adenine Complex, a Compound, with Multi-Biochemical Targets and Potential Anti-Cancer Effect. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *173* (2), 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.03.005>.
- (64) Trask, A. V.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W. Pharmaceutical Cocrystallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5* (3), 1013–1021. <https://doi.org/10.1021/cg0496540>.
- (65) Gražulis, S.; Daškevič, A.; Merkys, A.; Chateigner, D.; Lutterotti, L.; Quirós, M.; Serebryanaya, N. R.; Moeck, P.; Downs, R. T.; Le Bail, A. Crystallography Open Database (COD): An Open-Access Collection of Crystal Structures and Platform for World-Wide Collaboration. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (D1), D420–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr900>.
- (66) Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **2016**, *72* (2), 171–179. <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>.
- (67) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (25), 10024–10035. <https://doi.org/10.1021/ja00051a040>.
- (68) Fliege, J.; Svaiter, B. F. Steepest Descent Methods for Multicriteria Optimization. *Math. Methods Oper. Res. ZOR* **2000**, *51* (3), 479–494. <https://doi.org/10.1007/s001860000043>.
- (69) Hartman, P.; Perdok, W. G. On the Relations between Structure and Morphology of Crystals. I. *Acta Crystallogr.* **1955**, *8* (1), 49–52.
- (70) Donnay, J. H.; Harker, D. A New Law of Crystal Morphology Extending the Law of Bravais. *Am. Mineral. J. Earth Planet. Mater.* **1937**, *22* (5), 446–467.
- (71) Ghosh, S.; Mishra, M. K.; Kadambi, S. B.; Ramamurty, U.; Desiraju, G. R. Designing Elastic Organic Crystals: Highly Flexible Polyhalogenated N-Benzylideneanilines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (9), 2674–2678. <https://doi.org/10.1002/anie.201410730>.
- (72) Guo, D.; Zhang, Y.; Hao, J.; Ren, Y.; Hou, X.; Gao, J.; Ma, Y. Biomimetic Synthesis of Organic Molecular-Doped Fluorescent Guanine Crystals with Pearlescence. *Chem. – Eur. J.* **2023**, *29* (31), e202300004. <https://doi.org/10.1002/chem.202300004>.
- (73) Kapuscinski, J.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M. R. Luminescence of the Solid Complexes of Acridine Orange with RNA. *Cytometry* **2005**, *2* (4), 201–211. <https://doi.org/10.1002/cyto.990020402>.
- (74) Nafisi, S.; Saboury, A. A.; Keramat, N.; Neault, J.-F.; Tajmir-Riahi, H.-A. Stability and Structural Features of DNA Intercalation with Ethidium Bromide, Acridine Orange and Methylene Blue. *J. Mol. Struct.* **2007**, *827* (1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.004>.
- (75) Sengupta, C.; Basu, S. A Spectroscopic Study to Decipher the Mode of Interaction of Some Common Acridine Derivatives with CT DNA within Nanosecond and Femtosecond Time Domains. *RSC Adv.* **2015**, *5* (95), 78160–78171. <https://doi.org/10.1039/C5RA13035B>.
- (76) Falcone, R. D.; Correa, N. M.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J. The Use of Acridine Orange Base (AOB) as Molecular Probe to Characterize Nonaqueous AOT Reverse Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296* (1), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.08.049>.

- (77) Ferguson, J.; Mau, A. W. H. Absorption Studies of Acid-Base Equilibria of Dye Solutions. *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *17* (4), 543–546. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(72\)85101-7](https://doi.org/10.1016/0009-2614(72)85101-7).
- (78) Falcone, R. D.; Correa, N. M.; Biasutti, M. A.; Silber, J. J. Acid-Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in N-Heptane/AOT/Water Reverse Micelles. *Langmuir* **2002**, *18* (6), 2039–2047. <https://doi.org/10.1021/la011411b>.
- (79) Shenderovich, I. G. The Partner Does Matter: The Structure of Heteroaggregates of Acridine Orange in Water. *Molecules* **2019**, *24* (15), 2816. <https://doi.org/10.3390/molecules24152816>.
- (80) Obendorf, S. K.; Glusker, J. P.; Hansen, P. R.; Berman, H. M.; Carrell, H. L. Aggregation of Acridine Orange: Crystal Structure of Acridine Orange Tetrachlorozincate $2\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\cdot 2\text{HCl}\cdot \text{ZnCl}_2\cdot \text{CH}_3\text{COOH}$. *Bioinorg. Chem.* **1976**, *6* (1), 29–44. [https://doi.org/10.1016/S0006-3061\(00\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3061(00)80048-4).
- (81) Lamm, M. E.; Jr, D. M. N. *The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride*. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/j100895a039>.
- (82) Houtman, C. J.; Kitin, P.; Houtman, J. C. D.; Hammel, K. E.; Hunt, C. G. Acridine Orange Indicates Early Oxidation of Wood Cell Walls by Fungi. *PLOS ONE* **2016**, *11* (7), e0159715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159715>.
- (83) Schreiber, J. P.; Daune, M. P. Fluorescence of Complexes of Acridine Dye with Synthetic Polydeoxyribonucleotides: A Physical Model of Frameshift Mutation. *J. Mol. Biol.* **1974**, *83* (4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90509-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90509-9).
- (84) Ma, X.; Sun, R.; Cheng, J.; Liu, J.; Gou, F.; Xiang, H.; Zhou, X. Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93* (2), 345–350. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00483>.
- (85) Annadhasan, M.; Basak, S.; Chandrasekhar, N.; Chandrasekar, R. Next-Generation Organic Photonics: The Emergence of Flexible Crystal Optical Waveguides. *Adv. Opt. Mater.* **2020**, *8* (21), 2000959. <https://doi.org/10.1002/adom.202000959>.
- (86) Hunsperger, R. G. Losses in Optical Waveguides. In *Integrated Optics*; Springer New York: New York, NY, 2009; pp 107–128. https://doi.org/10.1007/b98730_6.
- (87) Gur, D.; Pierantoni, M.; Elool Dov, N.; Hirsh, A.; Feldman, Y.; Weiner, S.; Addadi, L. Guanine Crystallization in Aqueous Solutions Enables Control over Crystal Size and Polymorphism. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (9), 4975–4980. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00566>.
- (88) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- (89) Gabadinho, J.; Beteva, A.; Guijarro, M.; Rey-Bakaikoa, V.; Spruce, D.; Bowler, M. W.; Brockhauser, S.; Flot, D.; Gordon, E. J.; Hall, D. R.; Lavault, B.; McCarthy, A. A.; McCarthy, J.; Mitchell, E.; Monaco, S.; Mueller-Dieckmann, C.; Nurizzo, D.; Ravelli, R. B. G.; Thibault, X.; Walsh, M. A.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M. *MxCuBE*: A Synchrotron Beamline Control Environment Customized for Macromolecular Crystallography Experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **2010**, *17* (5), 700–707. <https://doi.org/10.1107/S0909049510020005>.
- (90) Brockhauser, S.; Ravelli, R. B. G.; McCarthy, A. A. The Use of a Mini- κ Goniometer Head in Macromolecular Crystallography Diffraction Experiments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (7), 1241–1251. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003880>.
- (91) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.

- (92) Nascimento, A.; Araujo, E.; Hagio, C.; Almeida, S.; Rodrigues, A. C.; Barreto Barbosa Trivella, D.; Bruder, M.; Rustiguel, J. K.; Dislich Ropke, C.; Ravanelli Pessa, L.; Azevedo, H.; Cardoso, M.; Zeri, A. C. Launch of the Manacá Beamline at Sirius: First Protein Crystallography Structures and New Opportunities for Pharmaceutical Development Using Synchrotrons. *Synchrotron Radiat. News* **2021**, *34* (5), 3–10. <https://doi.org/10.1080/08940886.2021.1994310>.
- (93) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2 : A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (94) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2015**, *71* (1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- (95) Agilent. CrysAlis PRO, 2014.
- (96) Spackman, P. R.; Turner, M. J.; McKinnon, J. J.; Wolff, S. K.; Grimwood, D. J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M. A. CrystalExplorer: A Program for Hirshfeld Surface Analysis, Visualization and Quantitative Analysis of Molecular Crystals. *J. Appl. Crystallogr.* **2021**, *54* (3), 1006–1011. <https://doi.org/10.1107/S1600576721002910>.
- (97) Neese, F.; Wennmohs, F.; Becker, U.; Riplinger, C. The ORCA Quantum Chemistry Program Package. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152* (22), 224108. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.
- (98) Treegate, K.; Rasamessard, A.; Osotchan, T.; Hodak, J. H. X-Y Sample Scanning Stage and Calibration Method Suitable for Single-Molecule Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *150* (1), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.07.008>.
- (99) Prötzel, D.; Heß, M.; Schwager, M.; Glaw, F.; Scherz, M. D. Neon-Green Fluorescence in the Desert Gecko *Pachydactylus Rangei* Caused by Iridophores. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 297. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79706-z>.

"Poder decir adiós es crecer"

C.

Capítulo VII

Conclusiones y Perspectivas

Este trabajo de tesis se centró en el diseño y la síntesis de nuevos materiales bioinspirados obtenidos a partir de moléculas con relevancia biológica, con la finalidad de establecer una relación entre la Química Supramolecular y Conformacional de sus bloques de construcción y las propiedades resultantes. Trabajos previos del grupo ya habían sentado un precedente sobre la versatilidad conformacional y supramolecular de algunas de estas moléculas al ser empleadas como ligandos orgánicos en la síntesis de diversas arquitecturas de coordinación. La capacidad de adquirir distintas conformaciones que permiten exponer la “dentadura” aminoacídica sin deteriorar el desarrollo de redes extendidas de interacciones no covalentes fue lo que despertó la curiosidad de entender cuáles son los fenómenos que rigen la selección conformacional, y qué rol juegan las interacciones supramoleculares en este proceso. En este contexto, a lo largo de este trabajo de tesis se ha extendido el análisis previamente realizado en el grupo a dos familias de nuevas moléculas, brindando varios ejemplos que ilustran el delicado equilibrio que relaciona la interacción electroestática y el desarrollo de redes supramoleculares de interacciones no covalentes con la eficacia del empaquetamiento y la adquisición de conformaciones con distinto grado de plegamiento.

Además de la contribución realizada en términos de la síntesis orgánica, la optimización de las estrategias para la obtención de material cristalino y la caracterización de nuevas moléculas quirales basadas en L-Fenilalanina y L-Tirosina con aldehídos de interés biológico y comercial (Capítulo III y IV), se pudo extender la investigación al ámbito de la Química Supramolecular y Conformacional de todos estos compuestos, empleando el conjunto de herramientas de análisis heredado de la Ingeniería Cristalina. El cálculo de las Redes de Energía para estudiar la distribución de interacciones en una estructura cristalina, la representación de la Superficie de Hirshfeld para la detección de contactos entre moléculas y el análisis del empaquetamiento utilizando de Factores de Forma y criterios de divergencia supramolecular, son solo algunos ejemplos de las diversas herramientas de la Ingeniería Cristalina que fueron empleadas a lo largo de esta tesis y que pudieron ser extrapoladas de forma directa al análisis de la química en solución.

Gracias a la implementación de espectroscopías dinámicas, tanto resueltas en el tiempo como a temperatura variable, complementadas con microscopías de tiempo de vida, fue posible estudiar el proceso de cambio de conformación, autoensamblado y precipitación para muchas de estas sustancias. Este abordaje integral dio un panorama claro del conjunto de fenómenos que suceden a medida que el material sólido se forma. Para cuantificar el efecto estabilizante que tiene el ensamblado en ciertas conformaciones específicas, y el rol seleccionador que cumple la entropía en los confórmeros, se calcularon los parámetros termoquímicos asociados a los fenómenos de ensamblado y alteración conformacional. Estos resultados dieron cuenta del apreciable aporte que hace la entropía en todos estos fenómenos.

Una de las principales hipótesis de esta tesis se centró en la propuesta de la existencia de una relación estrecha entre la estructura de una molécula, su capacidad de difundir y las propiedades de los materiales obtenidos a través del fenómeno de separación de fases. Efectivamente, gracias a la utilización de la microscopía de imagen de tiempo de vida de fluorescencia, se ha podido seguir en tiempo real este proceso luego de efectuar un salto brusco de pH y observar una dependencia clara entre la morfología del material

generado, la especie molecular precipitante y las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la precipitación (Capítulos III y IV). Las espectroscopías dinámicas utilizadas, en conjunto con la realización de cálculos de parámetros termoquímicos y la implementación de técnicas de dispersión de rayos X fueron utilizadas para establecer un modelo de ensamblado, tanto en solución como en geles supramoleculares, que contempla todos estos resultados y representa el rol de la estructura molecular, la entropía y el solvente durante la agregación.

Uno de los principales resultados obtenidos fue poder observar cómo el radio de colisión y el factor de forma de una dada especie son alterados por el grado de plegamiento y la capacidad de establecer dímeros estables en solución, y cómo estos dos factores repercuten, a su vez, de manera directa en su capacidad de difundir. Esta relación directa entre los parámetros estructurales y supramoleculares y la capacidad de difundir mostró ser esencial para explicar alteraciones en los grados de cristalinidad de algunas de estas sustancias. Adicionalmente, se pudo encontrar una correlación desde la termodinámica entre el factor de forma, el radio de giro y el número de nodos de precipitación que se formarán durante un evento de separación de fases. Poder continuar estudiando esta relación entre estructura, condiciones experimentales, capacidad difusiva y propiedades materiales utilizando distintas metodologías de modelado, como la dinámica molecular, es una de las principales perspectivas de este trabajo.

Por otro lado, a través de un análisis de los datos bibliográficos de las distintas estructuras reportadas para moléculas pequeñas, como los aminoácidos individuales, con demostrada actividad amilogénica, fue posible detectar la presencia frecuente de arreglos supramoleculares conservados que consisten en un apilamiento de planos electroestáticos con los residuos no aminoacídicos orientados hacia el exterior de estos (Capítulo V). Este arreglo estructural no solamente es consistente con el mecanismo de acción de los colorantes más comunes empleados para la detección por imágenes de las estructuras amiloides, sino que sienta las bases para proponer una nueva definición de la estructura amiloide en términos puramente estructurales. Empleando esta definición como referencia, fue posible brindar un marco teórico desde la perspectiva de la Ingeniería Cristalina a la hipótesis amilogénica extendida que actualmente se emplea para comprender la actividad potencialmente citotóxica de algunos metabolitos al autoensamblarse.

Empleando esta herramienta de análisis, en el Capítulo V, se desarrolló el estudio de la Química Supramolecular, en base a las interacciones, la conformación y el empaquetamiento, de las estructuras cristalinas de todos los compuestos derivados de aminoácido presentados en esta tesis cuya estructura cristalina pudo ser resuelta por difracción de rayos X de monocristal. Como resultado, para muchas de ellas se observó un paralelismo claro entre este tipo de arreglos y las estructuras de origen amiloide. Gracias a que fue posible sintetizar diferentes especies para algunos de estos derivados, como switeriones, sales de cloruro o sales de sodio, se pudo estudiar los diversos factores que actúan como método de selección del arreglo estructural.

Mediante el análisis desarrollado se propusieron ciertas vías que permiten explicar cómo se hereda la propiedad amilogénica en estructuras derivatizadas en base a la similitud estructural entre los bloques de construcción empleados para su obtención y los

fragmentos con una propiedad amilogénica probada. Esta relación tan estrecha, y aparentemente antagonista, entre cristalinidad y amilogénesis, y su correspondiente correlato en las estructuras de L-Tirosina y L-Fenilalanina, fue clave para desarrollar un marco estructural simple pero poderoso, para describir la potencial actividad amilogénica de estas pequeñas moléculas.

En particular, para la familia estudiada, se puede establecer la conclusión general que se enuncia a continuación: si pensamos a la estructura molecular de ambos aminoácidos (L-Tirosina y L-Fenilalanina) como extremos en un espectro continuo que separa el carácter amilogénico (L-Fenilalanina) de la formación de redes extendidas (L-Tirosina), se puede establecer que “cuanto más se asemeje una pequeña molécula a la L-Fenilalanina”, mayor será la probabilidad de que esta desarrolle estructuras con carácter amiloide, o mayor será el carácter amiloide de las estructuras generadas por su autoensamblado. Por el contrario, a medida que una estructura molecular “se asemeja a la L-Tirosina”, aumentará su capacidad para formar empaquetamientos rígidos, ordenados e isotrópicos que cada vez distan más de la estructura amiloide.

En base a esta hipótesis de la potencial actividad amilogénica de algunos de los compuestos sintetizados, fue estudiada la interacción entre las moléculas, los agregados que estas generan y neuroblastos de ratón. En líneas generales, todos los compuestos cuando se encuentran como moléculas libres, mostraron cierta capacidad de estimular la formación de protuberancias elongadas en las células al cabo de un tiempo. Contrariamente, los ensambles moleculares demostraron ser poco eficaces para disparar algún tipo de respuesta celular. Sin embargo, los resultados de estas interacciones molécula-neurona no fueron concluyentes debido a que el espacio muestral analizado por esta técnica es acotado y, dadas las diferentes respuestas observadas, no fue posible extraer una tendencia clara. Profundizar en el análisis de la interacción neurona-compuesto, y realizar las caracterizaciones bioquímicas que permitan estudiar la potencial acción reprogramante de estas sustancias es una de las principales proyecciones propuestas para la continuidad de este trabajo.

Finalmente, se sintetizaron y caracterizaron por completo tres materiales cristalinos híbridos bioinspirados a partir de las formas sólidas dicloruro de adeninio, cloruro de guaninio dihidrato y cafeína monohidrato. Todos estos materiales presentaron una respuesta mecánica distinta frente al estrés por flexión. En los tres casos fue posible entender esta respuesta en base al análisis de sus redes de interacción y la racionalización de estas en términos de fuerzas restitutivas y zonas de respuesta colectiva. Adicionalmente, en base a los antecedentes reportados para la guanina en relación a su capacidad de incorporar de manera intracristalina otras moléculas como dopantes, se estudió la capacidad de estos materiales de retener el colorante Naranja de Acridina con el fin de introducir propiedades fotofísicas interesantes.

Los tres sistemas fueron capaces de alojar distintas proporciones de esta molécula exógena, generando materiales híbridos con una respuesta mecánica y óptica distinta en cada caso. En base los resultados de las técnicas de difracción de rayos X, técnicas espectroscópicas de cuantificación y la realización de cálculos de optimización geométrica, fue posible proponer modelos de intercalado para los tres sistemas. Esta propuesta se basa en el intercambio de una molécula de xantina por una del colorante en ciertas posiciones

de la red gracias a la similitud estructural que presenta esta especie exógena con las purinas estudiadas.

Particularmente, para el material híbrido derivado de guanina (cloruro de guaninio dihidrato dopado) se realizó un estudio en detalle de las propiedades fotofísicas. Esta caracterización requirió del diseño y la construcción de un *set-up* experimental capaz de medir las pérdidas ópticas en un material extremadamente pequeño, teniendo control del punto de incidencia del haz que ilumina, y pudiendo cuantificar la intensidad de luz emitida por los extremos de la muestra. El material estudiado presentó una excelente respuesta al ser empleado como guía de ondas, tanto al estar relajado como sometido a estrés mecánico. Este resultado sienta las bases para el futuro diseño de materiales híbridos bioinspirados basados en xantinas, principalmente guanina y sus sales. Adicionalmente, la construcción y puesta a punto de este *set-up* experimental deja abierto un camino para futuras caracterizaciones similares en diversos sistemas, debido a que permite alterar y adaptar varios parámetros experimentales como la longitud de onda del haz incidente, su potencia, y la longitud de onda registrada.

Estudiar la capacidad de retener distintos colorantes con propiedades fotofísicas específicas, en conjunto con el correspondiente análisis de la afinidad matriz-colorante para todos ellos es una de las principales perspectivas a corto plazo para estos nuevos materiales. Gracias a esta capacidad de hospedar moléculas exógenas se prevé que algunas de estas matrices puedan ser capaces de asistir en el desarrollo del efecto de *laseado* de los colorantes. Esta hipótesis se basa, principalmente, en el rol que podría estar cumpliendo la matriz como aceptora de la energía disipada a través de decaimiento no radiativos de la molécula y a su función como aislante y protector del colorante frente a moléculas atmosféricas reactivas. Al mismo tiempo, gracias a la fluorescencia detectada para algunas de estas matrices se prevé que puede llegar a existir algún efecto de transferencia de energía desde la matriz hacia los colorantes que sensibilice y vuelva aún más eficaz el efecto de *laseado*. Poder diseñar materiales cristalinos flexibles como sustrato para nuevos sistemas ópticos en la microescala es una de las principales proyecciones para futuros proyectos basados en los resultados presentados durante este trabajo.