



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

SINTESIS, CARACTERIZACIÓN Y CITOTOXICIDAD DE COMPUESTO LÍQUIDO CRISTALINOS

Profesor Patrocinante

Dr. Eduardo A Soto B
Departamento de Química
Orgánica y Fisicoquímica

Director

Dr. Eduardo A Soto B
Departamento de Química
Orgánica y Fisicoquímica

Director

Dr. Marcelo J Kogan B
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Karina Paola Navarrete Méndez

Santiago de Chile 2018

**A mi hija Camila, mi mayor tesoro,
por todo el tiempo que le robé...**

Agradecimientos.

Una mañana de diciembre estando en la facultad, el profesor Eduardo Soto Bustamante me ofreció trabajar con él. Necesitaba un estudiante de farmacia para medir la toxicidad de unos compuestos con propiedades líquido cristalinas y con mucha emoción acepté. Ese día se inició lentamente una hermosa amistad que se ha mantenido en el tiempo e incluso fuera de la universidad. Él se fue ganando sin querer mi admiración; por ser noble, porque trató de ser siempre lo más justo con sus alumnos, por sus valores, por cómo se apasiona por los cristales líquidos, por la humildad que mantiene pese a todos sus conocimientos y por como lucha por aquellos a quien quiere. A medida que los meses transcurrieron en el laboratorio comencé a sentirlo como amigo, también como a un padre y por sobre todo como un guía, y si después de muchos años pude finalmente concluir esta etapa de mi vida fue principalmente gracias a él, porque yo me rendí, pero él nunca lo hizo y siempre insistió. “Profe Soto, trabajar con usted, ha sido una de las mejores cosas que me han pasado en la vida...Cuenta conmigo siempre!!!”

Quiero agradecer al profesor Marcelo Kogan por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme a pensar como un biólogo y por todo lo que aprendí trabajando a su lado. Profesor: “usted es un grande”.

A la profesora Soledad Bollo, por acoger mi solicitud y permitirme concluir uno de mis principales sueños. “Profe Sole, muchas gracias!!!”

A Hernán Pessoa por transmitirme a través de sus clases usando tan solo una tiza y el pizarrón, un entusiasmo único por la química orgánica.

Al profesor Guillermo Díaz, por preocuparse como un padre de sus alumnos y haberme escuchado cuando lo necesité...

A la profesora Zandra Alcarraz, por ser simplemente maravillosa.

A la memoria de los profesores Roni Bocic y Ana María Thielemann por las enseñanzas de vida que compartieron conmigo.

A la profe Carla Delporte por recibirme con los brazos abiertos y haberme llenado de confianza cuando me quise titular.

A Julio Garmendia, quien siempre y con gran amabilidad me prestó los libros en la biblioteca. “Julio, gracias por todo...”

A Guisella Muñoz y a Fidel Albornoz por el enorme apoyo que me brindaron cuando estuve trabajando en el quinto piso.

También quiero agradecer a personas que ya no están en la facultad pero que me ayudaron muchísimo y a quienes llegué a querer harto; como la Srta. Ilse Valencia, la Sra. Carmen Castillo y la Sra. Victoria Goldsack.

A mis amigos Marcelo Cañete, Ariel Meneses, María José Orellana y Rafael Vergara, que en la verdad no son mis amigos, sino mis hermanos. Ellos se ganaron un espacio muy grande en mi corazón.

A Alejandra Penroz, mi amiga del alma... Gracias por existir!!!

A mis amigas Verónica Acha, Karina Aguiluz, Ángela Contreras, Claudia Feliú, Magdalena Lira, Tamara Riquelme, Johanna Rojas, Pamela Sepúlveda y Carolina Zuñiga, por estar conmigo en todas e incluso mover montañas cuando lo necesito. El cariño de todas ustedes ha hecho que mi vida sea más fácil y agradezco al universo por haberlas conocido. Las quiero mucho!

A Benny Álvarez, a Marcela Barraza, a la “Manena” y a la “Omi”, porque siempre quisieron que llegara este día.

A mamá, a papá, a mi hermano Carlos, a mi bella sobrina Sofía, a mi prima Paula y por sobre todo a mi hija Camila. Ustedes son mis tesoros más preciados y espero que Dios siempre les proteja. Les amo con el alma...

A todos mis primos porque no imaginan cuanto les quiero. A mis tíos y a mis abuelos, porque a pesar de todo siempre estamos juntos...

A la memoria de mi prima Marcia, de mi amiga Cecilia Tello, de mi tío Jorge Vásquez y de mi abuelo Enrique, sé que se preocupan por mí desde el cielo...

Tabla de Contenidos

TABLA DE CONTENIDOS.....	IV
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BASES DE SCHIFF.....	11
1.2. DERIVADOS DEL AZOBENCENO	12
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
2.1. Hipótesis.....	13
2.2. Objetivos Generales.....	13
2.3. Objetivos Específicos	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Reactivos	14
3.2. Equipos.....	16
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	17
4.1. Síntesis de derivados de Azobencenos.	17
4.1.1. Preparación de Cloruro de Ácido Metacrílico.	19
4.1.2. Metacrilato de 6-Cloro hexilo (M6Cl).	20
4.1.3. Metacrilato de 6- Yodo hexilo (M6I).	21
4.1.4. Síntesis de 4-(4-Octiloxi-fenilazo)-fenol (A8).	21
4.1.5. Síntesis de 4-(4-Dodeciloxi-fenilazo)-fenol (A12).	22
4.1.6. Síntesis de 4-(2-Hidroxifenilazo)-5-octiloxi-fenol (OA8).	23

4.1.7.	Síntesis de 5-Dodeciloxi-2-(4-hidroxi-fenilazo)-fenol (OA12)	23
4.2.	Alquilación de los azocompuestos	24
4.2.1.	Síntesis de monómeros M6A8	24
4.2.2.	Síntesis de M6A12	25
4.2.3.	Síntesis de M6OA8	26
4.2.4.	Síntesis de M6OA12	26
4.3.	Polimerización de Monómeros azos	27
5.	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA	29
5.1.	Microscopia de luz polarizada (MLP)	29
5.2.	Microscopia de Luz Polarizada Tradicional	30
5.3.	Microscopia de Luz Polarizada con Soporte por Tensión Superficial	31
5.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	32
5.5.	Análisis Térmico Gravimétrico (TGA)	36
6.	ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD	38
6.1.	Cultivo Celular	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1.	Síntesis experimental	42
7.2.	Caracterización Físicoquímica	43
7.2.1.	Caracterización físicoquímica de las bases de Schiff	52
7.3.	Análisis Termogravimétrico	57
7.3.1.	TGA de Monómeros de derivados del azobenceno	58
7.3.2.	TGA de Monómeros de las bases de Schiff	60
7.3.3.	Análisis Termogravimétricos de Polímeros	61
7.4.	Citotoxicidad	65
8.	CONCLUSIONES	73
9.	BIBLIOGRAFÍA	75

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Representación de la disposición molecular de un sólido cristalino frente al aumento de la temperatura.	4
Figura 2. a) Esquema de una fase Nemática; b) Imagen de una fase Nemática por microscopía.	6
Figura 3 a) Esquema de una fase Colestérica; b) Imagen de una fase Colestérica por microscopía.....	6
Figura 4. Diagrama de un pitch.....	7
Figura 5. Tipos de fases observadas con un Microscopio de Luz Polarizada: a) Fase Nemática a una temperatura de 100°C por calentamiento; b) Fase Esméctica A a una temperatura de 55°C por calentamiento; c) Fase Esméctica C a los 90°C por calentamiento.	8
Figura 6. Representación esquemática de las mesofases: a) Nemática; b) Esméctica A; c) Esméctica C.	8
Figura 7. Sub clasificación de los cristales líquidos.	9
Figura 8. Representación del grupo funcional Imina.	11
Figura 9. Estructura de una base de Schiff.....	11
Figura 10. Estructura de un derivado del azobenceno.	12
Figura 11. Representación del Azo aromático derivado del Fenol	17
Figura 12. Representación del Azo aromático derivado del Resorcinol.....	17
Figura 13. Esquema de síntesis para la formación del M6I.	18

Figura 14. Ruta sintética de los monómeros Azos M6A12 (R=H) y M6AO12 (R=OH).	19
Figura 15. Representación del polímero con $R_1 = C_mH_{2m+1}$. Si R= H y m=12 tenemos PM6A12, si m=8 PMA8. Cuando R= OH y m=12, PM6OA12 y si m=8, PM6OA8.....	28
Figura 16. Efectos de la birrefringencia sobre la luz polarizada.....	29
Figura 17. MLP conectado a una cámara de video y a un computador.	30
Figura 18. Diagrama que representa la formación de una lámina suspendida de compuesto extendido por tensión superficial.....	32
Figura 19. a) M6A8 a 65°C en MLP tradicional con tensión superficial; b) M6A8 a 80°C por MLP convencional.	32
Figura 20. Diagrama de energía frente a temperatura: Cr = cristal, I = líquido isótropo.....	33
Figura 21. Curva DSC de un polímero orgánico típico.	35
Figura 22. Equipo para realizar el DSC	36
Figura 23. Equipo TG NETZSCH TG 209 F1.....	37
Figura 24. Imagen de células obtenidas con un Microscopio Estereoscópico: a) Células sin el estímulo; b) Células después de la formación de los cristales de Formazán.....	40
Figura 25. Conversión del MTT en Formazán por acción de la mitocondria	41
Figura 26. MLP con Tensión Superficial. a) Fase SmA a 70.0°C (enfriamiento); b) I (isótropo) a 90.8°C (calentamiento); c) SmA a 88.8°C (enfriamiento); d) estructura del M6A8.....	44

Figura 27. DSC del monómero M6A8.....	45
Figura 28. a) Fase SmA focal cónica por MLP Técnica convencional a 89.4°C (calentamiento); b) Sm C a 60°C (calentamiento); c) Sm C a 67°C (calentamiento); d) Estructura del monómero M6A12.	46
.Figura 29. DSC del monómero M6A12.....	47
Figura 30. a) Fase SmA por MLP con Tensión superficial a 60,9°C (enfriamiento); b) Fase SmA a 62.1°C por tensión superficial (enfriamiento); c) SmA a 60°C (enfriamiento); d) Estructura del monómero M6OA8.....	48
Figura 31. DSC para el monómero M6OA8.	49
Figura 32. a) Fase SmC por MLP con vidrio pretratado con detergente a 80.3°C (Calentamiento); b) Fase SmA por MLP a 62.7°C (enfriamiento); c) Fase Smc por MLP a 82.5°C (enfriamiento); d) Estructura del M6OA12..	50
Figura 33. DSC del monómero M6OA12.....	51
Figura 34. MLP con tensión superficial: a) Fase SmC a 56°C (calentamiento); b) Fase Isotrópica a 85.4°C (enfriamiento); c) Fase isotrópica a 84.9°C (enfriamiento); d) M8R12 a 81.7°C; e) Estructura del monómero M8R12.	52
Figura 35. DSC del monómero M8R12.....	53
Figura 36. M10R12. MLP por Técnica convencional. a) Fase Cristal a 45°C (calentamiento); b) Fase SmA. MLP con Tensión Superficial a 97.5°C (enfriamiento); c) Fase SmC a 75.5°C; d) Fase SmC a 99.7°C (enfriamiento); e) Estructura de la base de Schiff M10R12.....	54
Figura 37. DSC del monómero M10R12.....	55

Figura 38. a) Análisis Térmico Gravimétrico de M6OA8 y del M6OA12; b) Análisis Térmico Gravimétrico de M6A8 y del M6A12.	57
Figura 39. Termograma de los monómeros de las Bases de Schiff.	60
Figura 40. Análisis Termogravimétrico de bases de polímeros de las bases de Schiff:	61
Figura 41. Gráfico de Citotoxicidad de distintos solventes orgánicos en la línea celular <i>neuroblastoma SH-SY5Y</i> . Todas las muestras con n=18 y 48 horas de estímulo.	66
Figura 42. Gráfico de Citotoxicidad de monómeros azobencénicos y de bases de Schiff en la línea celular <i>neuroblastoma SH-SY5Y</i> . Todas las muestras con n=18 a una concentración de 0,2mol/l durante 24 horas.....	67
Figura 43. Gráfico de Citotoxicidad de monómeros azobencénicos y de bases de Schiff en la línea celular <i>neuroblastoma SH-SY5Y</i> .Todas las muestras con n=18 a una concentración de 0,2mol/l durante 48 horas.	68
Figura 44. Gráfico de Citotoxicidad de monómero M6A8 en la línea celular <i>neuroblastoma SH-SY5Y</i> . Todas las muestras con n=18 a distintas concentraciones durante 24 horas.	70
Figura 45. Gráfico de Citotoxicidad de los polímeros en la línea celular <i>neuroblastoma SHSY5Y</i> .Todas las muestras con n=18 a concentraciones de 50 ppm. por 48 horas.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis por Microscopía de luz Polarizada.....	56
Tabla 2. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido. (nd* = no determinada).....	56
Tabla 3 Análisis Termogravimétrico de monómeros con sus respectivos polímeros.....	62

RESUMEN

En esta investigación se sintetizaron los monómeros M6A8, M6A12, M6OA8 y M6OA12 y se caracterizaron sus estructuras y sus propiedades líquido cristalinas utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Microscopía de Luz Polarizada (MLP). Los compuestos desarrollaron mesofases esmécticas A y C. Dichos monómeros fueron polimerizados para obtener los correspondientes polímeros con rendimientos superiores al 60%. Se estudió la estabilidad térmica de los monómeros por termogravimetría (TGA).

Con el fin de generar una nueva aplicación biotecnológica y al desconocerse los efectos dañinos que podrían presentar en el organismo, se realizaron ensayos de citotoxicidad de los monómeros y de los polímeros en la línea celular inmortalizada de neuroblastoma SH-SY5Y, mediante la reducción del colorante MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5-difeniltetrazolio], el que es solo metabolizado por células vivas.

Se encontró que la toxicidad, de los compuestos es baja respecto de células de neuroblastomas, encontrándose un efecto dosis-respuesta para uno de los monómeros M6OA12 no lineal con la concentración. Los ensayos con MTT indican que bajo los tiempos y concentraciones en estudio los compuestos no presentaron una citotoxicidad relevante. Los resultados obtenidos proyectan posibles usos de estos cristales líquidos para la creación de materiales biomédicos o para el desarrollo de una matriz que pueda contener y liberar fármacos.

ABSTRACT

In this work the monomers M6A8, M6A12, M6OA8 and M6OA12 were synthesized and their chemical structure and liquid crystalline properties were characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Polarized Light Microscopy (MLP). The compounds developed smectic A and C mesophases. The monomers were polymerized to obtain the corresponding polymers with yields higher than 60%. The thermal stability of the monomers was studied by thermogravimetric analysis (TGA). In order to generate a new biotechnological application, and since the harmful effects that could occur in the body was unknown, cytotoxicity tests of the monomers and polymers were assessed. They were performed in a immortalized cell line of neuroblastoma SH-SY5Y, by the reduction of dye content of MTT [3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] which is metabolized just by living cells. The citotoxicity of the compounds was low in neuroblastoma cells, and a non-linear dose-response effect with the concentration was found for one of the monomers M6OA12. The tests with MTT indicate that under the times and concentrations under study the compounds did not present a relevant cytotoxicity. The obtained results project possible uses of these liquid crystals for the creation of biomedical materials or for the development of a matrix that can contain and release drugs.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los materiales ha formado parte importante en la historia de la humanidad. El hombre, desde muy temprano, manipuló distintos elementos de la naturaleza, con el fin de crear herramientas que le permitieran sobrevivir y mejorar su calidad de vida. Este contacto resultó ser tan importante que llegó a marcar las diferentes etapas de la Prehistoria, que hoy conocemos como “la edad de piedra” y “la edad de los metales”.

Una de las razones por las que todos los días se buscan nuevas sustancias es porque los materiales influyen marcadamente en la sociedad. Todo el tiempo la tecnología nos deslumbra con nuevos artefactos tecnológicos que nos facilitan el trabajo, acortan distancias, nos conectan con el mundo, amenizan nuestro quehacer diario y generan adelantos en áreas tan importantes como la medicina, la astronomía, la construcción, etc.

La expresión LCD (Liquid Crystal Display) utilizada para referirnos a las pantallas de televisores, computadores y teléfonos celulares, se volvió muy común. El componente base que se utiliza para estos dispositivos, está construido por cristales líquidos. Estas estructuras no forman parte exclusiva de artefactos tecnológicos, ya que en la en la naturaleza también los podemos encontrar formando parte de membranas celulares (fosfolípidos), en lipoproteínas que recubren el axón de las neuronas o en la simple película de una pompa de jabón. Las pantallas de cristales líquidos se producen en grandes cantidades en todo el mundo. A comienzos del año 2001 su producción ya

alcanzaba unas 70 toneladas. Es por ello, que conocer el impacto ecológico y toxicológico. Se volvió cada vez más relevante¹.

Se debe además entender que la producción masiva de pantallas ocurre en Asia. En Europa la situación es diferente, debido a que las cantidades que se manejan no alcanzan los cientos de kilogramos. En el viejo continente los tramos de 10 a 100 kilos, solo requieren como análisis toxicológico el de toxicidad aguda. El tramo 100 a 1000 kilos exige además pruebas de mutagenicidad bacteria, de irritación de piel y de ojos; Y por sobre los 1000 kilos hasta las 100 toneladas, se suman las pruebas de toxicidad aguda con un segundo ensayo, mutagenicidad in-vitro y toxicidad sub- aguda.

De todos los cristales líquidos testeados hasta el 2001, solo una sustancia resultó ser tóxica y 8 fueron consideradas dañinas. La primera fue eliminada de las líneas de producción de mezclas de compuestos líquido cristalinos y las otras 8 incluidas en concentraciones menores al 10%.

Para formarnos una idea, teléfonos celulares, sistemas de navegación y pantallas de 15" con espaciadores de celdas de 6 μm y con una densidad relativa de 1 g/cm^3 , entregan en promedio 0,6 mg de cristales líquidos por cm^2 de pantalla, cantidad no menor como para no considerar su toxicidad al momento de producirlos.

Los cristales líquidos son sustancias que comparten características de los sólidos cristalinos y de los líquidos. En un sólido cristalino, las moléculas se

encuentras unidas de manera rígida, siguen un patrón de ordenamiento y pueden desviar la luz, en cambio, en un líquido las moléculas se desplazan de manera desordenada y al azar. Un cristal líquido tiene de los líquidos la capacidad de fluir y de los sólidos la de desviar la luz, adquiriendo con ello propiedades ópticas.

Los cristales líquidos fueron descubiertos en 1888 por el botánico y químico austriaco Friedrich Reinitzer², quien observó un singular fenómeno, cuando determinaba los puntos de fusión del acetato y del benzoato de colesterol, extraídos previamente de unos vegetales. Reinitzer presentó sus primeros resultados en la Sociedad de Química en Viena el 3 de Marzo de 1883³. Él observó que a la temperatura de 145.5°C los cristales se fundían transformándose en un líquido opaco y turbio, al continuar calentando, a los 178.8°C se tornaban en uno completamente claro y transparente, observándose además una variación de volumen y de calor en cada uno de los cambios de estado⁴. Luego, al enfriar la muestra, observó que el proceso de transición de fases ocurrió de manera inversa y a las mismas temperaturas.

Reinitzer, le detalla en una carta lo observado al físico austriaco Otto Lehman, un cristalógrafo muy respetado de esa época, quien era especialista en microscopía de luz polarizada. Lehmann⁵, descubrió que la fase opaca y la transparente del benzoato de colesterol presentaban zonas de estructura molecular cristalina con actividad óptica, similares a las que poseen los sólidos cristalinos y fue él mismo quien impuso el término “cristales líquidos”⁶.

Los cristales líquidos, también denominados “mesofases”, presentan un orden intermedio entre un sólido cristalino y un líquido (figura 1).

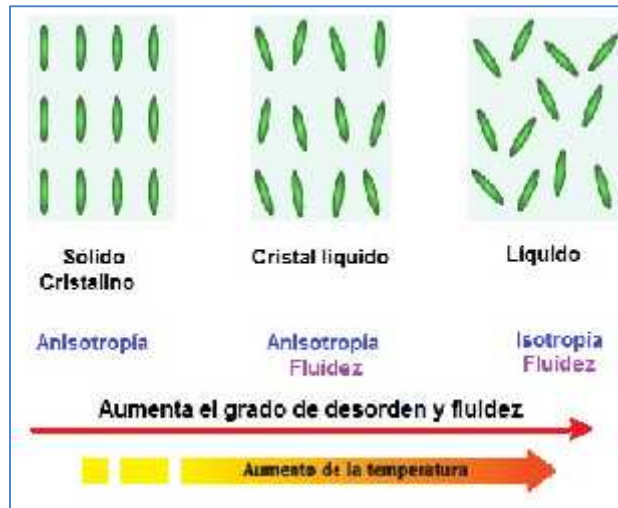


Figura 1. Representación de la disposición molecular de un sólido cristalino frente al aumento de la temperatura.

Los Cristales comparten algunas propiedades físicas de ambos estados⁷, fluyen como lo hacen los líquidos, y al igual que los sólidos cristalinos, son termodinámicamente estables, anisótropos, parcialmente ordenados y birrefringente⁸, porque cuando un haz de luz los incide, puede desviarlos con dos índices de refracción diferente. Se considera a un material anisótropo, cuando el valor de las propiedades físicas que presenta, como las ópticas, mecánicas, eléctricas, magnéticas, etc. dependen de la dirección en que estas se aplican. En los Líquidos isotrópicos los valores obtenidos no dependen del ángulo de medida.

Durante la primera parte de la historia de los compuestos líquido cristalinos, el francés George Friedel⁹, estudió activamente este nuevo estado de agregación de la materia, habló de “mesofase” cuando se refirió a ella y la clasificó de acuerdo al grado de desorden adquirido^{10,11} en: Nemáticos, Colestéricos y Esméticos¹².

a) Cristal líquido Nemático.

La fase nemática (figura 2)¹³ es representada por la letra N y su nombre proviene del griego μ (nema), que significa “hilo”, debido a los defectos topológicos que presenta este tipo de textura (figura 5a y 6c). Esta fase cuando se presenta lo hace a temperaturas más altas que las demás. Posee un mayor grado de desorden en la posición de sus centros de masa y tiene mucha similitud con un líquido isótropo. Las moléculas pueden moverse lateralmente, girar alrededor de un eje común o deslizarse paralelamente a él.

Ópticamente un nemático se comporta como un material uniaxial con un centro de simetría. Además una imagen simplificada de la disposición relativa de las moléculas en la fase líquido-cristalina nemática se muestra en la figura 6C¹⁴.

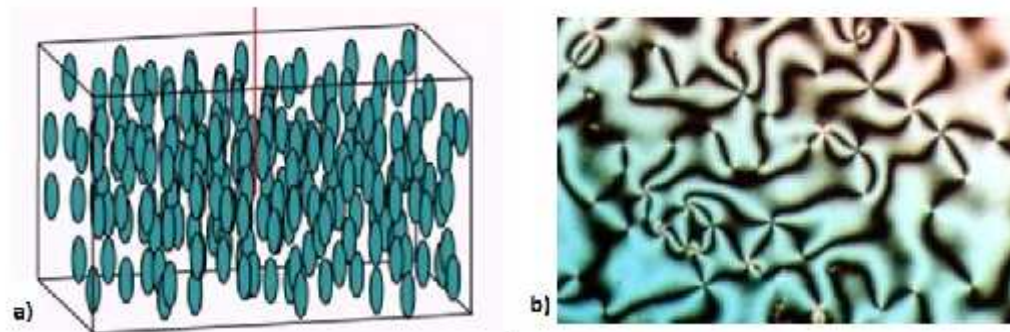


Figura 2. a) Esquema de una fase Nemática; b) Imagen de una fase Nemática por microscopía.

b) Cristal líquido Colésterico.

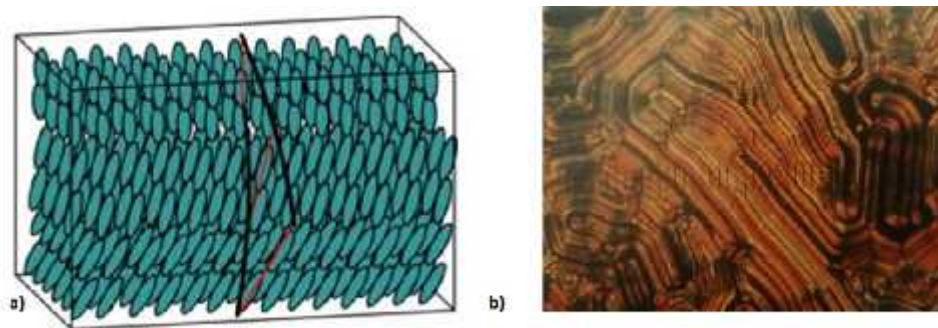


Figura 3 a) Esquema de una fase Colestérica; **b)** Imagen de una fase Colestérica por microscopía

Como la primera vez que se observó esta fase fue en esteres del colesterol, se designó para nombrarla el término “colestérico”. Este tipo de cristal líquido representado en la figura 3¹⁵, es una variante de la fase nemática, que sólo se da en compuestos aquirales. La simetría que presenta se puede reproducir en campos de fuerza poco simétricos, generando una estructura en forma de

espiral. La distancia que existe entre las capas cuando la estructura completa un giro de 360° se denomina pitch (p). Esta medida es un parámetro importante en algunas aplicaciones tecnológicas¹⁶ (Figura 4). El pitch de los cristales líquidos colestéricos va del orden de varios cientos de nanómetros, comparables con la longitud de onda del espectro visible. La forma de espiral de estos compuestos es la responsable de los colores característicos (por medio de la reflexión de Bragg¹⁷ debido a la estructura periódica) y de su poder rotatorio. El pitch puede ser muy sensible a ciertos parámetros como por ejemplo: temperatura, composición química, campo eléctrico o magnético aplicado¹⁸.

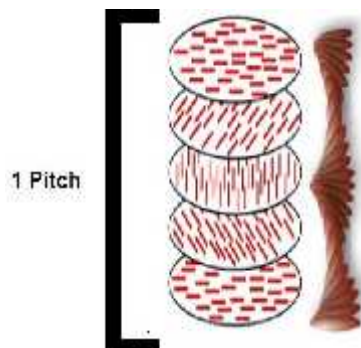


Figura 4. Diagrama de un pitch.

c) Cristal líquido Esmético (Sm).

El término “esméctica” se origina del latín “*smecticus*”, que significa limpieza o tener propiedades similares al jabón. Esta fase presenta moléculas con una relativa libertad de rotación sobre el eje Z y de traslación sobre los

ejes X e Y. Las fuerzas laterales entre las moléculas de la fase esméctica son más fuertes que las que existen entre las capas, es por ello que es posible el deslizamiento de una capa sobre la otra sin perder el orden. Este fenómeno es el que proporciona la fluidez a los sólidos.

Existen varios tipos de fases esmécticas, cada una de ellas se identifica con una letra que va desde la A (SmA) hasta la H (SmH)¹⁹.

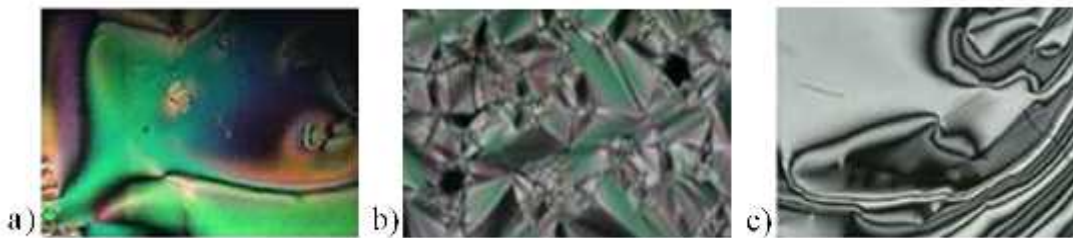


Figura 5. Tipos de fases observadas con un Microscopio de Luz Polarizada: **a)** Fase Nemática a una temperatura de 100°C por calentamiento; **b)** Fase Esméctica A a una temperatura de 55°C por calentamiento; **c)** Fase Esméctica C a los 90°C por calentamiento.

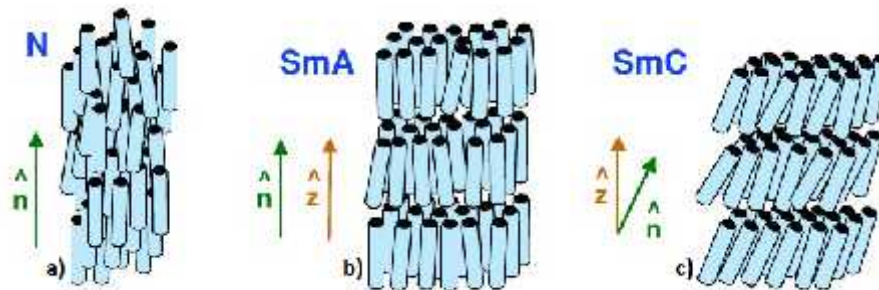


Figura 6. Representación esquemática de las mesofases: **a)** Nemática; **b)** Esméctica A; **c)** Esméctica C.

El segundo periodo de la historia de los cristales líquidos se inicia en 1925, con la aceptación de este nuevo estado de la materia por la comunidad científica.

En el 1960 surge la última etapa, en ella se crean los primeros relojes y calculadoras con pantallas formadas en base a electrodos y a polarizadores. Desde ese momento aumentó la cantidad de investigaciones que hasta hoy han permitido descubrir nuevos fenómenos y desarrollar nuevas tecnologías contribuyendo así a mejorar la calidad de vida de las personas.

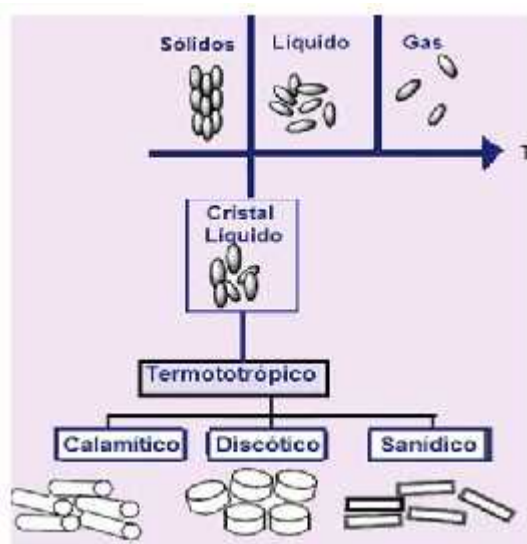


Figura 7. Sub clasificación de los cristales líquidos.

Los cristales líquidos pueden ser además **termótropos** y **liótropos**. Los cristales líquidos termótropos presentan un estado líquido cristalino que depende de rangos de temperatura y los liótropos, dependiente de los grados

de concentración. Estos cristales líquidos están formados por un sólido anfifílico, disuelto en un determinado solvente, en condiciones de concentración, temperatura y de presión definidos, con el fin de conseguir distintos ordenamientos.

Los cristales líquidos que cambian con la temperatura (figura 7) se clasifican²⁰ de acuerdo a sus características moleculares, como **calamíticos** (varilla), **discóticos** (disco) y **sanídicos** (listón)²¹.

1.1. BASES DE SCHIFF.

Dentro del grupo funcional Imina (figura 8), encontramos a las bases de Schiff, la diferencia está en que en la Imina **R''** corresponde al sustituyente que está unido al Nitrógeno y puede ser un átomo de Hidrógeno, un arilo o un alquilo y en la base de Schiff **R''**, solo puede ser un arilo o un alquilo.

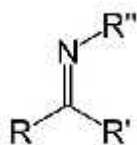


Figura 8. Representación del grupo funcional Imina.

Las bases de Schiff que se caracterizaron en este trabajo se encontraban sintetizadas en el laboratorio y se identificaron como **MnR12** para los monómeros y **PMnR12** para los polímeros, donde **n** corresponde al espaciador y **12** es la cantidad de carbonos que presenta la cadena metilénica. **n** = 8 y 10. (Figura 10).

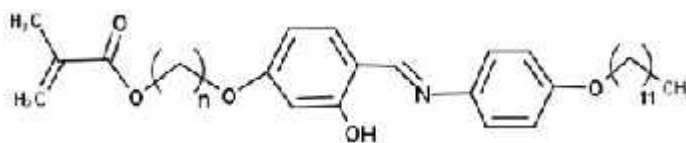


Figura 9. Estructura de una base de Schiff.

En la actualidad los compuestos que incluyen bases de Schiff en su estructura son muy variados y pueden servir para crear redes macrocíclicas en sistemas

biológicos como metalporinas (hemoglobina, citocromos, clorofila, vitamina B12), antibióticos (Valinomicina, Nonactina), complejos con metales de transición, sensores para terapias fotodinámicas, medios de contrastes para exámenes clínicos, etc.²²

1.2. DERIVADOS DEL AZOBENCENO

Dentro de los distintos grupos funcionales que encontramos en química orgánica, existen los **azos**, llamados también azocompuestos, azoderivados o compuestos azoicos. Estas moléculas se representan mediante la estructura **R-N=N-R'**, donde **R** y **R'** pueden estar formados por estructuras hidrocarbonadas o por otros grupos orgánicos, y los átomos de Nitrógeno están unidos por un enlace doble.

Para distinguir dentro de la gran variedad de azos que existen, a aquellos con los que se realizó esta investigación, se referirá en este trabajo a ellos como derivados azobencénicos, porque ambos radicales tendrán como sustituyente un benceno (Figura 10).

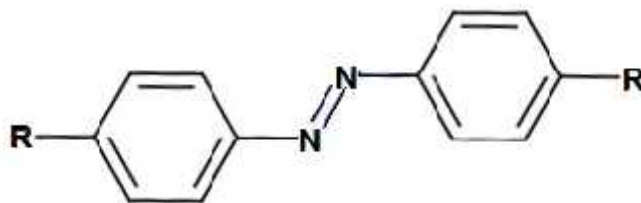


Figura 10. Estructura de un derivado del azobenceno.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Los azobencenos y las bases de Schiff presentan propiedades químicas, físicas y biológicas que permiten la creación y el desarrollo de nuevos biomateriales moleculares.

2.2. Objetivos Generales

Sintetizar derivados de azobencenos, caracterizar y efectuar estudios de citotoxicidad de los monómeros, de los polímeros de las bases de Schiff y de los compuestos creados, con el fin de determinar si presentan características y propiedades líquido cristalinas que permitan desarrollar nuevas tecnologías.

2.3. Objetivos Específicos

- Síntesis de compuestos azobencénicos.
- Caracterización química de los compuestos.
- Determinación de las propiedades líquido cristalinas de los monómeros estudiados.
- Estudio de mesofases por microscopía de luz polarizada de los monómeros.
- Caracterización físico química de los compuestos por Análisis Térmico Diferencial.
- Estudio de la estabilidad térmica por Termogravimetría.

- Ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares de neuroblastoma SH-SY5Y.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

- 1-Hexanol ($C_6H_{14}O$): Merck, para síntesis, PM 102,18g/mol.
- 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo AIBN ($C_8H_{12}N_4$): Aldrich, pureza 98% PM 220g/mol.
- 6-Chloro-1-hexanol (Cl)
- $(CH_2)_6OH$): Aldrich, pureza 95.0%, PM 136,62 g/mol.
- Acetato de etilo ($CH_3COOC_2H_5$): Merck, pro análisis, PM 88,11 g/mol.
- Acetona (CH_3COCH_3): Merck, pro análisis, PM 58,08 g/mol.
- Ácido clorhídrico (HCl): Merck, pro análisis, PM 36,46 g/mol.
- Ácido metacrílico monómero: Aldrich, pureza 99%, PM 86,09 g/mol.
- Alcohol Isopropílico ($(CH_3)_2CHOH$): Aldrich, pureza 99.7%, PM 60,1g/mol.
- Antibiótico estreptomicina-penicilina: GIBCO, Cat. 15140-122.
- Azul de Tripan: Hyclone, Cat. SV30030.01.
- Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio (MTT): Invitrogen, Cat. M6494.
- Cloruro de Tionilo ($SOCl_2$): Merck, para síntesis, PM 118,97g/mol
- Diclorometano (CH_2Cl_2): Merck, grado laboratorio, PM 84,93 g/mol.

- Dimetilformamida (DMF): Merck, pro análisis, PM 73,00 g/mol.
- Dodecilsulfato de sodio (SDS): Sigma, PM 288.38 g/mol.
- Etanol (C₂H₅OH): Merck, pro análisis, PM 46,07g/mol.
- Eter dietílico ((C₂H₅)₂O): Merck, grado laboratorio PM 74,12g/mol.
- Fenol (C₆H₅OH): Merck, pro síntesis, PM 94,11g/mol.
- Filtros no pirogénicos de 0,22 m: Schleicher & Schuell.
- Hidroquinona (C₆H₄ (OH)₂): Merck, para síntesis, PM 110,11g/mol.
- Hidróxido de Potasio (KOH): Merck, pureza 99%, PM 50,00 g/mol.
- Hidróxido de sodio (NaOH): Merck, pureza 99%, PM 40,00 g/mol.
- Nitrito de Sodio (NaNO₂): Merck pureza 99% PM 68,9 g/mol.
- Papel filtro N° 1: Whatman, 55 nm, Cat. 1001055.
- Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂): Merck, calidad analítica, PM 34,02 g/mol.
- Resorcinol (C₆H₄(OH)₂): Aldrich, pureza 99,0% PM 110,11 g/mol.
- Sulfato de Sodio Anhidro (Na₂SO₄), Merck pureza 99% PM 142,04g/mol.
- Tampón fosfato salino (tableta): Sigma, Cat. P-4417.
- Tiosulfato de Sodio (Na₂O₃S₂): Merck, grado laboratorio PM 312,8g/mol.
- Tolueno (C₇H₈): Merck, pro análisis PM 92,14g/mol.
- Trietilamina ((C₂H₅)₃N), Merck para síntesis PM 101,19g/mol.
- Tripsina: GIBCO, Cat. 15400.

- Yoduro de Sodio (NaI): Merck pureza 99% PM: 149,89g/mol.

3.2. Equipos

- Análisis Elemental Carlo-Erba EA 1108.
- Campana de seguridad biológica Nuair UN-425-400E.
- Centrífuga Hettich Rotofix 32
- DTA Mettler Toledo FP84HT.
- Espectrofotómetro ATI UNICAM UV3.
- Estufa Nuair US con sistema de filtración HEPA y auto flujo de CO₂.
- Horno de calentamiento Instec HCS302.
- Horno de calentamiento Linkman THMS 600.
- Lector ELISA Bio-RAD 550.
- Microscopio Estereoscópico Zeiss Stemi SV6.
- Microscopio Leica DMLP.
- NMR Bruker WM 300.
- Sonicador Ultrasons P-Selecta.
- TG Netzsch TG209F1.
- Vortex Eurolab MelB1719

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Síntesis de derivados de Azobencenos.

La disponibilidad de recursos determinó las etapas de las síntesis de los compuestos azos. Una vez obtenidos, fueron analizados por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones y la nomenclatura quedó establecida de la siguiente manera:

Cuando $R = H$, el azo es fenólico, y se abrevia como MnAm (Figura 11). Si $R = OH$, el azo es resorcinólico y se designa MnOAm (Figura 12), donde M representa el grupo metacrilato; n el espaciador; A corresponde al grupo Azo fenólico y AO corresponde al grupo Azo derivado del resorcinol. PMnAm y PMnOAm corresponden a los polímeros de ambos grupos. Para este estudio el valor de $n = 6$ y el de m es 8 ó 12.

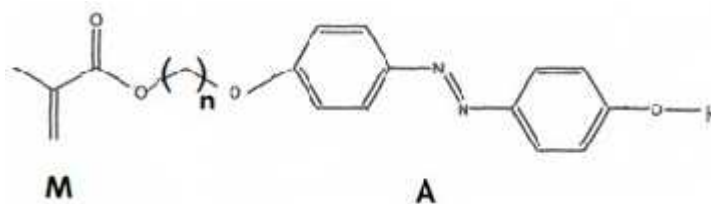


Figura 11. Representación del Azo aromático derivado del Fenol

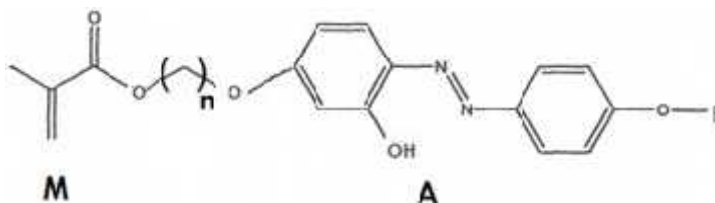


Figura 12. Representación del Azo aromático derivado del Resorcinol.

Los compuestos azos sintetizados fueron: **M6A8**, **M6A12**, **M6OA8** y **M6OA12**. Para sintetizar los monómeros azos, se utilizaron anilinas que se encontraban previamente preparadas en el laboratorio. Estas se hicieron reaccionar con Fenol para producir los azos fenólicos o con Resorcinol para formar los azos resorcinólicos. Posteriormente se esterificó con Metacrilato de 6-Yodo-hexilo (**M6I**), cuya preparación se detalla en la figura 13. Las anilinas utilizadas para este trabajo fueron octiloxianilina (**R8**) y 4-(dodeciloxi) anilina (**R12**).

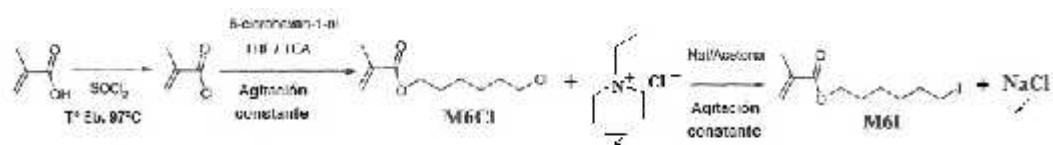


Figura 13. Esquema de síntesis para la formación del M6I.

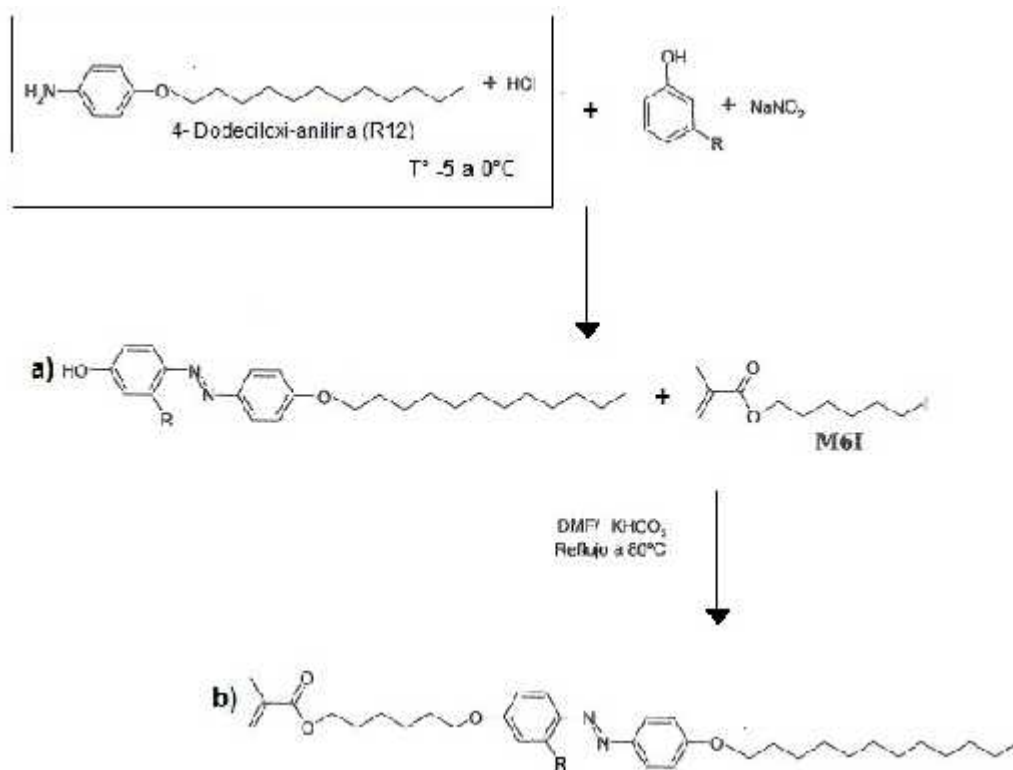


Figura 14. Ruta sintética de los monómeros Azos M6A12 (**R=H**) y M6AO12 (**R=OH**).

La figura 14 detalla la preparación de los monómeros azobencénicos en estudio. **M6A8** y **M6AO8** utilizan el mismo diagrama de síntesis, pero en estos casos, la anilina con la que se parte es la 4-Octiloxianilina. Para los monómeros **M6A12** y **M6AO12**, se inicia la reacción con el 4-dodeciloxianilina.

4.1.1. Preparación de Cloruro de Ácido Metacrílico.

Dentro de un balón de dos cuellos completamente seco, se agrega una cantidad conocida de ácido metacrílico y sobre él se añade gota a gota, desde un embudo de adición a presión constante, una cantidad equivalente en moles de

cloruro de tionilo. La reacción se lleva a cabo en un equipo a reflujo formado por un agitador magnético, una barra magnética, un manto calefactor, un refrigerante y una trampa de cloruro de calcio. Después de una hora de reflujo, por destilación simple se purifica el producto a una temperatura de 97°C.

Rendimiento: 70%.

4.1.2. Metacrilato de 6-Cloro hexilo (M6Cl).

En un equipo compuesto por: un balón de dos bocas con embudo de adición a presión constante; un refrigerante, un manto calefactor, una barra y un agitador magnético. Se adiciona lentamente a reflujo, una cantidad equimolar de cloruro de metacrililo a una mezcla formada por 6-clorohexanol y trietilamina, todo esto disuelto en tolueno seco. Se agita de manera constante. El avance del proceso se controló por cromatografía en capa fina, alcanzando conversión a productos después de 4 horas. Al final de la reacción, precipita un sólido de color blanco que corresponde a clorhidrato de trietilamina. La solución resultante se filtra, separándola de la fase orgánica, esta se lava con agua y la fase acuosa se extrae con dietiléter. Los extractos orgánicos se recolectan y se purifica el producto por columna en sílica gel, utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo 4:1.

M6Cl. $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3) ppm; 6,02 (s, 1H, Trans $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 5,49 (s, 1H, Cis $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 4,11 (t, 2H, $\text{CO}_2\text{-CH}_2$); 3,53 (t, 2H, $\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 1,87 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-Cl}$), 1,93 (s, 3H, $\text{H}_2\text{C}=\text{C-CH}_3$); 1,80-1,76 (m, 6H, $\text{-CH}_2\text{-}$).

Rendimiento: 58%.

4.1.3. Metacrilato de 6- Yodo hexilo (M6I).

Se disuelve una cantidad conocida de M6Cl en acetona seca dentro de un balón de dos cuellos equipado con una barra magnética, un refrigerante, una trampa de calcio y un agitador magnético. Se adiciona el equivalente en moles de yoduro de sodio disuelto en la mínima cantidad de solvente. La mezcla se agita a temperatura ambiente por 24 horas, se filtra el cloruro de sodio formado durante la reacción y la solución restante se concentra. En un embudo de decantación con éter etílico se agrega el concentrado y se lava varias veces con una solución acuosa de tiosulfato de sodio. Los extractos orgánicos se juntan, se secan con sulfato de sodio anhidro y se concentran en el rota vapor. El producto se purifica por columna en sílica gel, utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente.

M6I ¹HRMN (CDCl₃) ppm; 6,02 (s, 1H, Trans H₂C=C); 5,47 (s, 1H, Cis H₂C=C); 4,04 (t, 2H, CO₂-CH₂); 3,18 (t, 2H, -CH₂-I); 1,86 (s, 3H, H₂C=C-CH₃); 1,73 (m, 2H, -CH₂-I); 1,54 (m, 2H, -CH₂-OH); 1,33 (m, 4H, -CH₂-).

Rendimiento: 85%.

4.1.4. Síntesis de 4-(4-Octililoxi-fenilazo)-fenol (A8).

La reacción se lleva a cabo en un equipo formado por un balón de dos bocas, una barra magnética, un agitador magnético y un termómetro, todo instalado sobre un baño de agua con hielo y cloruro de sodio. En el balón se agrega una cantidad conocida de 4-octiloxianilina (R8) disuelta en Etanol. Cuando la

solución se encuentra a una temperatura menor a los 0°C, se añade lentamente ácido clorhídrico al 37%, procurando que la temperatura no supere los 0°C. En paralelo, en un matraz se agregan cantidades equimolares de nitrito de sodio, fenol e hidróxido de potasio 5 molar, los que reaccionan a 0°C. Esta mezcla se adiciona lentamente y gota a gota sobre la anilina ya disuelta, controlando siempre que la temperatura no exceda los 0°C. La reacción finaliza cuando se observa cambio de color a naranja claro. El sólido formado se filtra al vacío y posteriormente es neutralizado con HCl diluido. Una vez seco se recristaliza con diclorometano.

(A8) $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,79 (d, 2H, N=N-ArH), 7,74 (d, 2H, HO-ArH), 6,93 (d, 2H, ArH-O-), 6,87-6,84 (d, 2H, HO-ArH-), 5,06 (s, OH-Ar-), 3,97 (t, 2H, -O-CH₂-), 1,76 (m, 2H, -O-CH₂-), 1,52 (O-CH₂-), 1,40-1,22 (m, 8H, -CH₂-), 0,82 (t, 3H, -CH₃-). **Rendimiento:** 52%.

4.1.5. Síntesis de 4-(4-Dodeciloxi-fenilazo)-fenol (A12).

Se lleva a cabo la misma reacción pero utilizando 4-dodeciloxianilina (R12).

(A12) $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,80 (d, 2H, N=N-ArH), 7,01 (dd, 4H, HO-ArH-N=N-ArH-O), 6,92 (d, 2H, HO-ArH-N=N-), 5,10 (s, OH-Ar-), 3,96 (t, 2H, -O-CH₂-), 1,76-1,22 (m, 18H CH₂-), 0,82 (t, 3H, -CH₃-).

Rendimiento: 55%.

4.1.6. Síntesis de 4-(2-Hidroxi-fenilazo)-5-octiloxi-fenol (OA8).

En un equipo compuesto por: un baño de agua, hielo y cloruro de sodio; un balón de dos bocas, una barra magnética, un agitador y un termómetro, se agrega al balón una cantidad conocida de 4-octiloxianilina disuelta en acetonitrilo. Una vez que la solución está a una temperatura menor a los 0°C, se adiciona ácido clorhídrico al 37%, procurando mantener la temperatura de la mezcla estable. En paralelo, en un matraz se hace reaccionar una cantidad equimolar de nitrito de sodio y de resorcinol con una solución 5 molar de hidróxido de potasio, controlando siempre el valor de la temperatura. Esta mezcla se añade lentamente y gota a gota sobre la anilina. La aparición del color naranja oscuro indicará que el compuesto azo se comenzó a formar. Una vez finalizado este proceso, el sólido que decanta se filtra al vacío y posteriormente se neutraliza con HCl diluido. Para su purificación una vez seco se hace pasar por una columna en sílica gel, utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 4:1.

(OA8) 1H-RMN (CDCl3) ppm; 7,71 (d, 2H, N=N-ArH), 7,63 (d, 1H, HO-ArH), 6,92 (dd, 2H, N=N-ArH-O-), 6,47 (dd, 1H, HO-Ar(OH)H-), 6,35 (d, 1H, HO-Ar(OH)H-), 5,44 (s, 2H,-2OH-Ar-), 3,95 (t, 2H, -O-CH2-), 1,78-1,25 (m, 12H, CH2-), 0,82 (t, 3H, -CH3-). **Rendimiento:** 55%.

4.1.7. Síntesis de 5-Dodeciloxi-2-(4-hidroxi-fenilazo)-fenol (OA12)

Se lleva a cabo la misma reacción pero utilizando 4-dodeciloixianilina (**R12**).

(OA12) $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,71 (d, 2H, N=N-ArH), 7,64 (d, 1H, HO-ArH), 6,92 (d, 2H, ArH-O-), 6,47 (d, 2H, HO-ArH-), 5,06 (s, OH-Ar-), 3,95 (t, 2H, -O-CH₂-), 1,79 (m, 2H, -O-CH₂-), 1,51 (O-CH₂-), 1,40-1,19 (m, 14H, -CH₂-), 0,81 (t, 3H, -CH₃-). **Rendimiento:** 60%.

4.2. Alquilación de los azocompuestos

4.2.1. Síntesis de monómeros M6A8

El compuesto azo ya sintetizado, previamente disuelto en DMF (N, N-dimetilformamida), se agrega en un equipo a reflujo con una cantidad en moles equivalentes de bicarbonato de potasio. Se deja reaccionar por 30 minutos controlando constantemente la temperatura para que no sobrepase los 80°C. Posteriormente, se agrega el M6I y una punta de espátula de hidroquinona para que el producto obtenido en la reacción no polimerice. Durante el tiempo que dura todo este proceso, se controla el avance de la reacción por cromatografía en placa fina. Una vez finalizado, se enfría a temperatura ambiente, se lava con agua y de las soluciones acuosas se extrae el producto con éter. La fase etérea se lava en forma repetida con agua para eliminar la DMF. El producto se seca con Sulfato de sodio anhidro y se concentra. La purificación del sólido obtenido se realiza por cromatografía con sílica gel, utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente.

M6A8 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,89-7,86 (d, 4H, N=N-ArH), 6,94-6,90 (d,4H, -O- ArH-N=N-), 6,02 (s, 1H, Trans $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 5,47 (s, 1H, Cis $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 4,02 (m, 2H, -O- CH_2 -), 3,78 (m, 2H,-Ar-O- CH_2 -), 3,95 (m, 2H,CO₂- CH_2 -), 1,94 (s, 3H, CH_3 -CO); 1,79 (O- CH_2 -), 1,43-1,25 (m, 18H, - CH_2 -), 0,80 (t,3H, - CH_3 -). **Rendimiento:** 50%.

Análisis Elemental Teórico: C 71.54, H 8.93, N 5.23, O 14.30

Experimental: C 72.84, H 8.56, N 5.66, O 11,62

4.2.2. Síntesis de M6A12

La preparación del compuesto M6A12 se llevó a cabo utilizando la síntesis descrita en el punto 4.2.1, solo modificando los reactantes.

M6OA12 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm;7,91 (d, 4H, N=N-ArH), 6,94 (dd,4H, -O-ArH-N=N-), 6,03 (s, 1H, Trans $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 5,49 (s, 1H, Cis $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 4,10 (t, 2H, -O- CH_2 -), 3,97 (m, 4H,CH₂-O-Ar-N=N-Ar-O- CH_2 -), 1,87 (s, 3H, CH_3 -CO); 1,74-1,20 (m, 28H, - CH_2 -), 0,81 (t,3H, - CH_3 -).

Rendimiento: 45%

Análisis Elemental Teórico: C 73.39, H 9.40, N 5.35, O 11.86

Experimental: C 74.14, H 9.15, N 5.09, O 11.62

4.2.3. Síntesis de M6OA8

La preparación del compuesto M6OA8 se llevó a cabo utilizando la síntesis descrita en el punto 4.2.1, solo modificando los reactantes.

M6OA8 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,70 (d, 2H, N=N-ArH), 7,64 (d, 1H – O- Ar(OH)-H-N=N-), 6,93 (d,2H, -O-ArH-N=N-), (6,53 dd 1H y 6,47 d 1H, - O-2H- Ar(OH)- N=N), (6,03 (s, 1H, Trans $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 5,48 (s, 1H, Cis $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 4,09 (t, 2H, - O- CH_2 -), 3,95 (m, 4H, -Ar-O- CH_2 .) 2,09 (s, 3H, CH_3 -CO); 1,87-1,22 (m, 20H, - CH_2 -),0,82 (t,3H, - CH_3 -).

Rendimiento: 45%

Análisis Elemental Teórico: C 70.53, H 8.79, N 5.35, O 15.45.

Experimental: C 70.56, H 8.29, N 5.49, O 15.66

4.2.4. Síntesis de M6OA12

La preparación del compuesto M6OA12 se llevó a cabo utilizando la síntesis descrita en el punto 4.2.1, solo modificando los reactantes.

M6OA12 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) ppm; 7,70 (d, 2H, N=N-ArH), 7,66 (d, 1H – O-Ar(OH)-H-N=N-), 6,90 (d, 2H, -O-ArH-N=N-), (6,53 dd 1H y 6,47 d 1H, -O-2H- Ar(OH)- N=N), (6,03 (s, 1H, Trans $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 5,48 (s, 1H, Cis $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$); 4,09 (t, 2H, - O - CH_2 -) ,3,95-3,94 (m, 4H, CO_2 - CH_2 - y - CH_2 -O-

Ar-) 2,09 (s, 3H, CH₃-CO); 1,87- 1,25 (m, 26H, -CH₂- 0,82 (t, 3H,-CH₃-).

Rendimiento: 42%

Análisis Elemental Teórico: C 71,20, H 9,20, N 5,23, O 14,44.

Experimental: C 72,05, H 8,89, N 4,94, O 14,12.

4.3. Polimerización de Monómeros azos

La polimerización se realizó vía radicales libres utilizando 2,2'-azo-bis-isobutirilnitrilo (AIBN) como iniciador. En un tubo hermético se colocó 1 gramo de monómero disuelto en 9 ml de Tolueno seco. El tubo se tapa con un septum provisto de una aguja de salida de gases y otra para burbujear nitrógeno gaseoso por 10 minutos. Así se desplaza el oxígeno presente en el medio de la polimerización. Enseguida se agrega una solución en 1 ml de tolueno seco de 0,1 mg de AIBN y se continúa burbujeando por 5 minutos más para evitar que el AIBN reaccione con el oxígeno y provoque el término de la reacción generando un bajo rendimiento²³. Para que la polimerización se lleve a cabo, la mezcla se calienta a 60°C durante 48 horas y después a 80°C por dos horas más. La solución ahora viscosa del polímero en tolueno, se agrega sobre un exceso de acetona fría (100 ml) para que precipite. Posteriormente, se lava varias veces con pequeños volúmenes de acetona para eliminar los restos de monómeros que no se hayan polimerizado. La estructura del polímero queda ejemplificada en la figura 15.

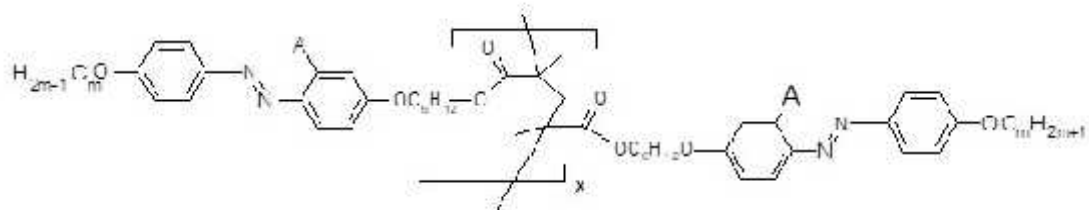


Figura 15. **Representación del polímero con $R_1 = C_mH_{2m+1}$. Si $R = H$ y $m=12$ tenemos PM6A12, si $m=8$ PMA8. Cuando $R = OH$ y $m=12$, PM6OA12 y si $m=8$, PM6OA8.**

5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Para caracterizar los compuestos sintetizados se utilizó Microscopía de Luz Polarizada, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Térmico Gravimétrico (TGA).

5.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)

Dentro de las distintas microscopías que existen, el uso de la luz polarizada es la más efectiva para el estudio de materiales anisótropos que además sean birrefringentes, ya que estos presentan texturas características de sus fases líquido-cristalinas²⁴. En el microscopio, cada fase crea un cuadro de imágenes, las que se conocen con el nombre de “texturas” y pueden ser observadas cuando se encuentran entre dos lentes polarizados cruzados (figura 16). Esto se debe a la birrefringencia que presentan los cristales líquidos²⁵.

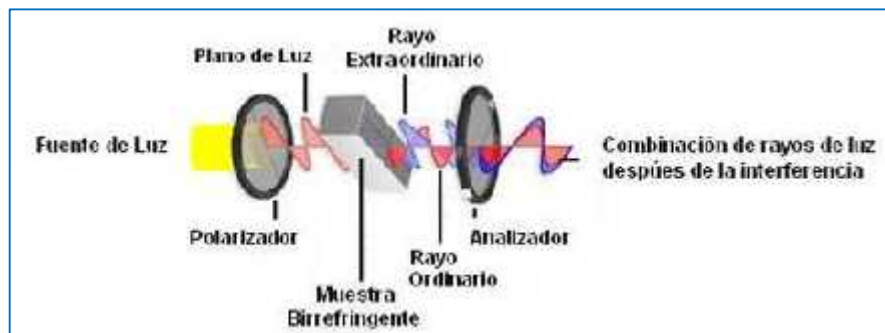


Figura 16. Efectos de la birrefringencia sobre la luz polarizada.

Para esta investigación, se trabajó con un microscopio de luz polarizada que estaba equipado con una cámara de video Panasonic conectada a un computador (figura 17). El microscopio además tenía acoplada una platina de calentamiento, la que permitía llevar a distintos niveles de temperatura la muestra estudiada. Así se podían observar los cambios que se generaban en los diferentes compuestos. Este método es fundamental para caracterizar materiales líquido cristalinos, definir las temperaturas en las que se generan los cambios de estado, analizar la textura observada y con ello identificar los tipos de fases involucradas.



Figura 17. MLP conectado a una cámara de video y a un computador.

5.2. Microscopia de Luz Polarizada Tradicional.

La muestra es colocada sobre una lámina de vidrio, luego se lleva a una placa calefactora, se calienta hasta que se transforma en líquida y luego se coloca sobre ella un cubre objeto. Una vez enfriada, se ubica sobre el horno de

calentamiento para observar las distintas texturas, calentando y enfriando con las velocidades de cambio de temperaturas controladas.

5.3. Microscopia de Luz Polarizada con Soporte por Tensión Superficial

Se elabora un orificio de unos 3 mm de diámetro aproximadamente en una lámina metálica; cerca de la perforación se agrega un poco de compuesto y se calienta sobre una placa calefactora. Cuando se funde la muestra, con una espátula se esparce el líquido formado, pasando sobre el orificio con el mayor cuidado posible para que se forme sobre la abertura una película delgada y suspendida (figura 18); luego, con mucho cuidado para que la lámina formada no se rompa, se lleva a la placa de calentamiento del MLP para observar sus texturas calentando y enfriando las veces que sea necesario.

Esta técnica permite conseguir un ordenamiento molecular del tipo homeótrofo (perpendicular a la superficie), formando capas escalonadas, las que culminan en una asimetría esférica. La figura 19 muestra la diferencia que hay cuando se observa un compuesto líquido cristalino en un microscopio de luz polarizada con técnica convencional y con tensión superficial.

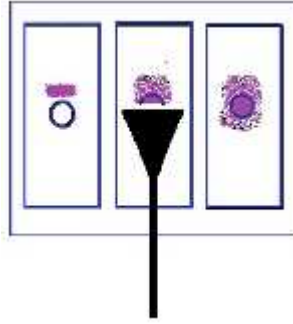


Figura 18. Diagrama que representa la formación de una lámina suspendida de compuesto extendido por tensión superficial.

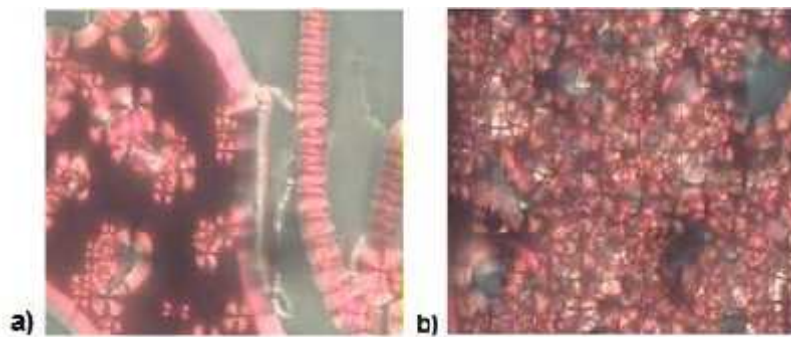


Figura 19. a) M6A8 a 65°C en MLP tradicional con tensión superficial; b) M6A8 a 80°C por MLP convencional.

5.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Por Microscopía de luz polarizada no se determinan de manera exacta las temperaturas en las que se generan los cambios de fase. La destreza y práctica del observador influyen mucho, por este motivo, para caracterizar cada uno de los materiales las técnicas termo analíticas son imprescindibles.

El DSC mide la diferencia de temperatura entre una muestra y un material de referencia. Ambos son sometidos al mismo proceso de calentamiento en una atmósfera controlada en función del tiempo, permitiendo con ello deducir si las

transformaciones que presentan las muestras son endotérmicas o exotérmicas y a qué temperatura ocurre el cambio de fase²⁶ (figura 21). Por lo tanto, con los datos que entrega este análisis podemos establecer las transiciones de fases del compuesto en estudio²⁷. Generalmente por DSC no se pueden determinar entalpías bajas como las de segundo orden, en cambio sí se observan las de cristal-cristal. Entalpías de transición pequeñas son difíciles de determinar, pueden ser observadas si se aumenta la sensibilidad o se cambia la razón de calentamiento. Un ejemplo de este tipo de entalpías está presentes en la transición: SmC – SmA, donde no hay calor latente, pero si un pequeño cambio de energía debido a un cambio en el ángulo de inclinación²⁸. También sabremos si los cristales presentan polimorfismo (distintas formas solidas o líquido cristalinas que tiene un material) y eventualmente calcular su capacidad calórica²⁹.

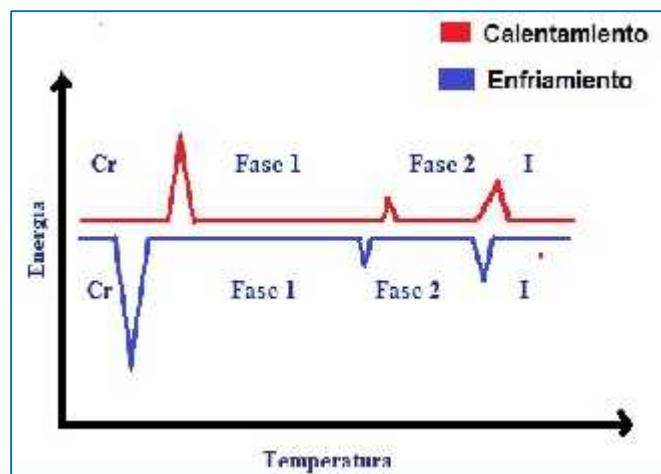


Figura 20. Diagrama de energía frente a temperatura: Cr = cristal, I = líquido isotrópico.

La figura 20 muestra un termograma característico de un cristal líquido. Los picos que se observan se relacionan con la forma de ordenamiento de las moléculas a una determinada temperatura. El punto con mayor entalpía corresponde a la temperatura de fusión cristalina que es el paso del estado sólido a la mesofase, mientras que el de menor valor representa el paso de la mesofase al estado isotrópico y se conoce como la temperatura de aclaramiento^{30, 31}.

Las transiciones de un compuesto orgánico polimérico se muestran en la figura 21. Allí se destaca la transición vítrea definida por una temperatura de transición (T_g), que es la temperatura en la cual algunos materiales se reblandecen, pasan de un estado duro-rígido a un estado más gomoso-elástico-flexible. En algunos casos, en los polímeros se produce una cristalización por sobre la T_g ; así lo que corresponde a la formación de una estructura sólida más estable, la que se forma una vez que las cadenas poliméricas se trasladan sobre la T_g . Así, se origina un proceso exotérmico, el que a una temperatura mayor fundirá para pasar al estado isotrópico. A temperaturas más elevadas, se producirá la degradación del polímero, que se observará como un drástico cambio en la entalpía.

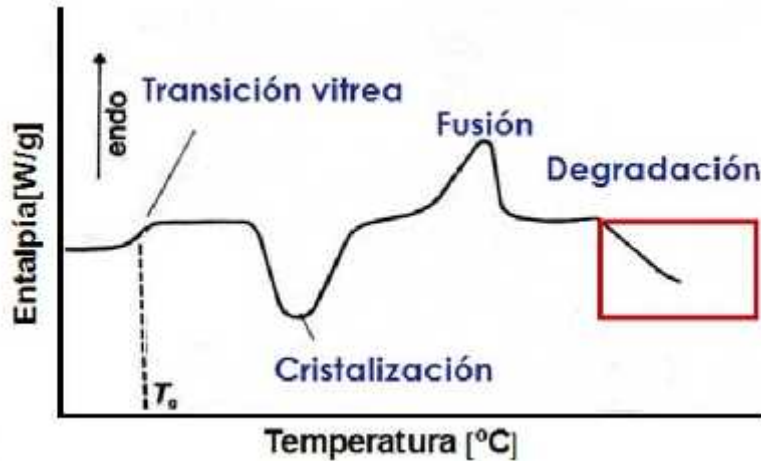


Figura 21. Curva DSC de un polímero orgánico típico.

Para obtener los datos necesarios y realizar los análisis, se emplearon dos crisoles de aluminio Perkin Elmer de 20 μl . En uno de ellos se agregó la muestra en estudio previamente pesada en una balanza analítica Precisa 125A, mientras que el otro crisol sirvió de referencia. Se tomaron los pocillos y se colocaron sobre una placa calefactora para conseguir que ambas muestras al fundirse cubrieran de manera completa la base del crisol antes de ser selladas al vacío. El elemento indio (${}_{49}\text{In}$) se utilizó para calibrar el equipo porque posee un punto de fusión, entalpías de vaporización y de fusión conocidas (156.2°C; 231.5 kJ/mol; 3,253 kJ/mol). Luego, los crisoles se introdujeron en un equipo Mettler Toledo (figura 22), controlado por un procesador FP 90, que estaba conectado a un computador para el almacenamiento de los datos. El DSC, con la ayuda de un programa especializado, permitió dentro de los 0°C y los 300°C, obtener el análisis

térmico y establecer las transiciones de fase de cada uno de los monómeros. Los barridos se llevaron a cabo tanto por calentamiento como por enfriamiento a 1°C/ min, 4°C/min y 5°C/ min.



Figura 22. Equipo para realizar el DSC

5.5. Análisis Térmico Gravimétrico (TGA)

El análisis térmico gravimétrico (TGA) calcula cuanto se altera la masa de una muestra y la rapidez con la que esto ocurre cuando es sometida a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser pérdida o ganancia de masa, ya sea porque la muestra se está oxidando, deshidratando o descomponiendo. La Termogravimetría puede utilizarse conjuntamente con el DSC, ya que permiten obtener información complementaria sobre el comportamiento térmico de un compuesto.

Un TGA consta de una balanza analítica sensible, un horno, un sistema de gas de purga que tiene por función proporcionar una atmósfera inerte y un microprocesador que controla el instrumento, y que además adquiere y visualiza los datos obtenidos.

El comportamiento gravimétrico de las distintas muestras se conoció agregando a un crisol de porcelana de 50 μ l una cantidad conocida de compuesto previamente masado en una balanza analítica y luego, se llevó a una placa calefactora para que al fundirse se cubriera de manera homogénea toda la superficie del recipiente. Después, se midió en un equipo TG NETZSCH TG 209 F1 (figura 23). El rango de masa con el que se realizó el estudio varió entre los 3mg y los 6mg, y el equipo trabajó entre los 27.5°C y los 800°C a una velocidad de calentamiento de 5°C/min.



Figura 23. Equipo TG NETZSCH TG 209 F1.

6. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Se realizaron estudios de toxicidad *in vitro* para los monómeros azobenzoicos: M6OA8, M6OA12, M6A8 y M6A12; para las bases de Schiff M8R12 y M6R12, y para los polímeros de ambos grupos de compuestos.

Los ensayos se llevaron a cabo en células de neuroblastoma SH-SY5Y, entre los pasos de división 5 - 13 para los monómeros y 3 - 8 para los polímeros. El marcador de viabilidad celular utilizado fue el MTT.

6.1. Cultivo Celular.

Las células permanecieron sin actividad en un medio crio-preservante formado por 900 μ L de suero fetal de bovino (SFB) y 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) dentro de un tubo a -80°C . El SFB antes de mezclarse con el DMSO se inactivó, para ello se llevó a un baño con la temperatura regulada a 56°C por 45 minutos.

El tubo que contenía las células que se conservaban para futuros estudios, se descongeló de manera rápida en un baño de agua a 37°C . Luego, se centrifugó a 1000 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante se aspiró con una pipeta Pasteur esterilizada que se encontraba conectada a una red de vacío. Las células descongeladas fueron suspendidas en un medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbeco) de alta glucosa (4.500 mg de glucosa/ml), suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 100U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina. La línea

celular activada proliferó en botellas estériles de 75 cm², dentro de una estufa de

cultivo a 37°C bajo una atmosfera compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂. Cuando la comunidad de células en el fondo del frasco fue superior al 85% del contenido, se descartó el medio de cultivo en el que estaban por aspiración y se lavaron los restos celulares con 4ml de solución de buffer fosfato salino (PBS) 1X. Después se volvió a aspirar y se agregó una solución de tripsina- EDTA al 0.25% para despegar las células del fondo y poder separarlas entre ellas. Se golpeó suavemente el frasco para facilitar la acción de las enzimas. Una vez que las células se despegaron se agregó 4mL de DMEM 10% SFB. Se llevó a un tubo estéril de centrifuga de 50mL y se centrifugó a 1000 rpm durante 4 minutos en una centrífuga Hettich 37 Rotofix 32, el sobrenadante se aspiró y el pellet de células depositado en el fondo del tubo se suspendió en 10mL de DMEM 10% SFB.

Para contar las células se extrajeron del tubo 20µL de la solución y se diluyeron en 180µL de DMEM 10% SFB. De esta dilución se tomaron 20µL y se mezclaron con la misma cantidad del colorante Azul de Tripán, sustancia que se utiliza para determinar viabilidad celular. Esta tintura penetra la membrana de las células muertas tiñéndolas completamente de color azul. Se depositó en una cámara de Neubauer una alícuota, obteniendo con ello la cantidad de células por mililitro de medio de cultivo.

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo en placas con 96 pocillos. En cada uno se sembró 5.000 células en un volumen de 80 μl de medio DMEM. Después de 24 horas de incubación, se completó a 100 μl al agregar distintas soluciones de monómeros o de polímeros. Como control de muerte positivo se utilizó H_2O_2 al 0,2% y SDS al 0,2%. Después de 48 horas de contacto entre las células y el estímulo, se aspiró el sobrenadante de cada pocillo y se lavó 2 veces con una solución de PBS 1X, luego se adicionó 100 μl de MTT y 1mg/ml de solución de PBS. Se llevó a una estufa de cultivo por cuatro horas y transcurrido este tiempo se aspiró el medio de cada pocillo quedando depositados en el fondo los cristales de Formazán (Figura 24). Estos se disolvieron en 100 μl de isopropanol bajo agitación constante por 2 horas.

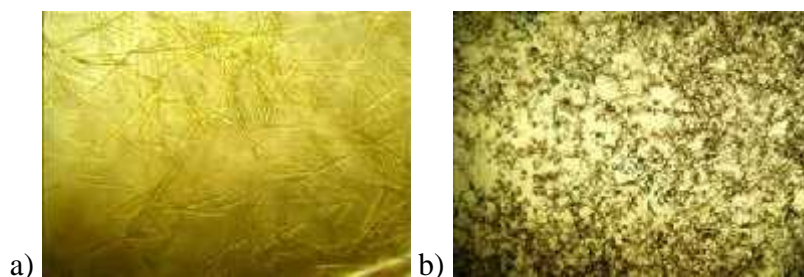
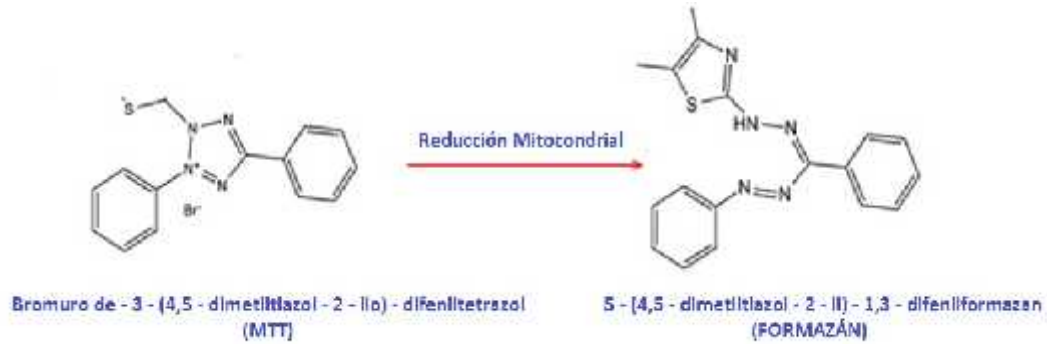


Figura 24. Imagen de células obtenidas con un Microscopio Estereoscópico: **a)** Células sin el estímulo; **b)** Células después de la formación de los cristales de Formazán.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT³², llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo así, determinar si hay actividad

mitocondrial en las células tratadas³³. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de cristales de formazán producidos (figura 25)



.Figura 25. Conversión del MTT en Formazán por acción de la mitocondria

Después se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de placas ELISA a 570 nm de longitud de onda³⁴. Cada compuesto estudiado se sembró seis veces y el ensayo fue realizado en tres oportunidades, por lo tanto, cada condición fue repetida 18 veces.

Los resultados obtenidos, se graficaron y se realizaron los análisis estadísticos paramétricos (ANOVA y test de Turkey-Kramer), en el software Minitab Statistical 17. Estos estudios estadístico permitieron estimar si los resultados obtenidos fueron significativos y no productos del azar.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis experimental

Para optimizar el rendimiento de la síntesis, se utilizaron intermediarios claves, partiendo de estructuras sencillas hasta llegar a moléculas más complejas. La reacción se llevó a cabo en tres etapas, comenzando por la producción de los halogenuros de alquilo, para continuar después con la obtención de los monómeros y con ellos realizar después la polimerización.

Los derivados de azos fenólicos sintetizados fueron M6A8 y M6A12 y los resorcinólicos M6OA8 y M6OA12. Para conseguir la formación de productos, fue muy importante controlar la temperatura en algunos pasos específicos de la ruta sintética.

La síntesis de los compuestos azos fue bastante complicada ya que tiene muchas etapas críticas. El manejo del tiempo, de la temperatura y del pH son claves en cada parte de la ruta. Durante el proceso, la mayor dificultad la presentó la síntesis de los fragmentos moleculares (sintones): A8, A12, OA8 y OA12, resultó ser la más difícil, por las condiciones de temperatura en las que se debía trabajar (0 °C). La etapa de la purificación resultó ser la más pesada y la de mayor dificultad.

El rendimiento de la última etapa de formación de los monómeros varió entre un 42% y un 50%. La pequeña diferencia se puede atribuir al largo de la cadena y al grupo hidroxilo de los azos resorcinólicos. Pueden que estas partes

de la estructura intervengan durante el proceso de purificación cuando pasan por la columna de sílice, porque los compuestos que se obtuvieron en mayor porcentaje fueron los de menor longitud y los derivados del fenol.

La polimerización radicalaria de los monómeros se logró con un rendimiento superior al 65%.

La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones permitió verificar la identidad de cada uno de los compuestos obtenidos durante la síntesis. Las señales espectrales permitieron distinguir si la cadena terminal de cada monómero era de 8 o 12 carbonos y además reconocer a los monómeros azoaromáticos fenólicos y resorcinólicos. La diferencia entre ambos fue entregada por los protones de la zona aromática y por el protón del grupo hidroxilo.

7.2. Caracterización Físicoquímica.

Caracterización de las mesofases de los derivados azobencénicos.

Para registrar y determinar las texturas que presentan los compuestos en estudio, primero se utilizó un Microscopio de Luz Polarizada (MLP) y luego se determinaron las temperaturas de transición por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Las fases encontradas más frecuentes fueron la Esméctica (SmA) y la Esméctica C (SmC). Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Monómero M6A8

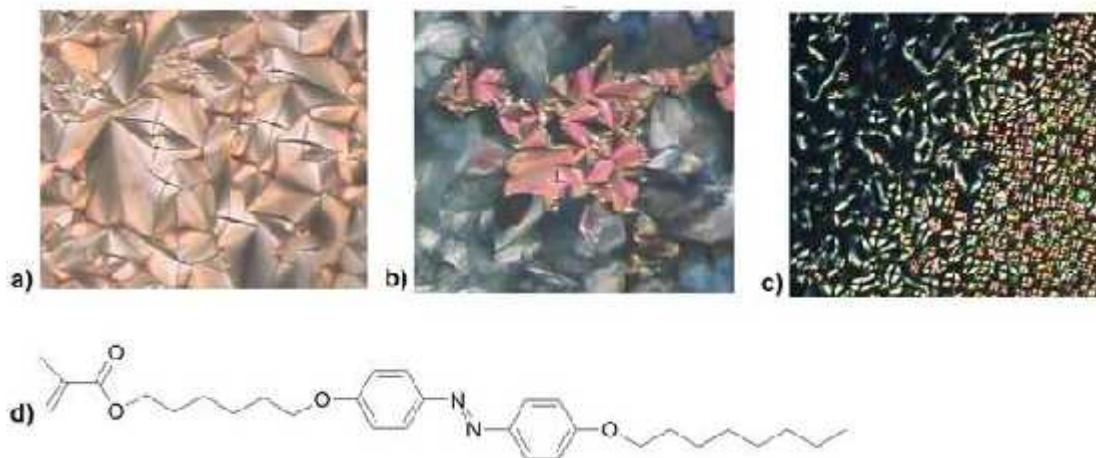


Figura 26. MLP con Tensión Superficial. **a)** Fase SmA a 70.0°C (enfriamiento); **b)** I (isótropo) a 90.8°C (calentamiento); **c)** SmA a 88.8°C (enfriamiento); **d)** estructura del M6A8.

Los datos obtenidos por MLP nos indican:

Calentamiento: Cristal (75.0°C) – Isótropo.

Enfriamiento: Isótropo - (78.6°C) SmA – (60.0°C) Cristal.

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristal (77.0°C) – Isótropo.

Enfriamiento: Isótropo (71.1°C) – SmA - (61.1°C) Cristal

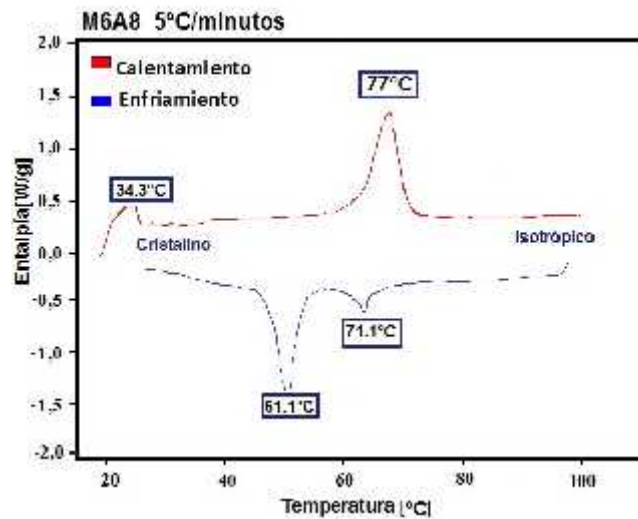


Figura 27. DSC del monómero M6A8.

La figura 27 destaca por MLP la fase esméctica A, a los 70°C por enfriamiento.

Los datos proyectados por el DSC (figura 27), presentan cuatro transiciones de fase, en este caso, representadas cada una de ellas por las máximas alturas que sobresalen dentro de la rampa, por lo tanto, estamos frente a la presencia de un compuesto líquido cristalino. Por MLP, al enfriar, se pudo apreciar la fase esméctica A, que se observó los 78.6°C. Como solo se apreció un tipo de fase por enfriamiento, que no se apreció por calentamiento, diremos que estamos frente a un cristal líquido **Monótrofo**

Monómero M6A12

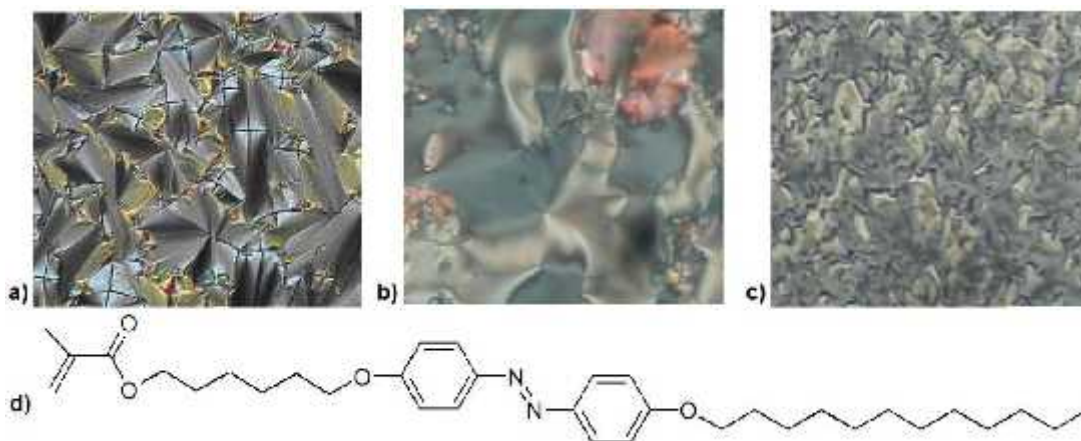


Figura 28. a) Fase SmA focal cónica por MLP Técnica convencional a 89.4°C (calentamiento); b) Sm C a 60°C (calentamiento); c) Sm C a 67°C (calentamiento); d) Estructura del monómero M6A12.

Los datos obtenidos por MLP nos indican que las texturas encontradas y las temperaturas de fases fueron:

Calentamiento: Cristal (52.0°C) – SmC (60°C) – SmA (89.4°C) – I

Enfriamiento: Isotrópica (87.7°C) - SmA (75.9°C) – Cristal (70.5°).

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristal (52.6°C) – SmA (86.8°C) – Isótropo.

Enfriamiento: Isótropo (90°C) – SmA (76.6°C) – SmC (67°C) – Cristal.

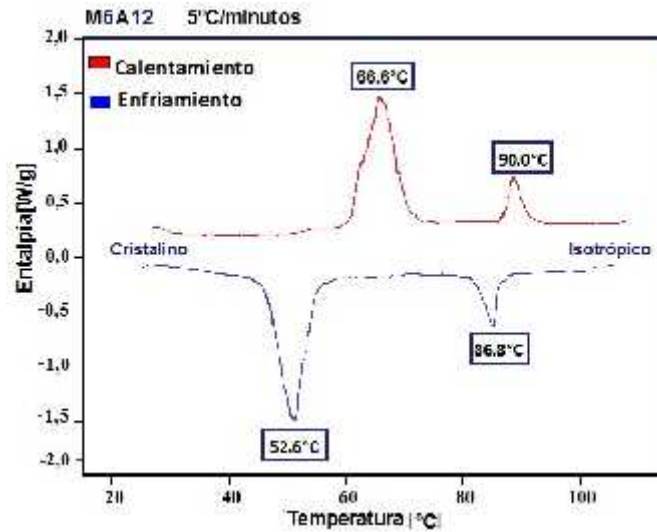


Figura 29. DSC del monómero M6A12.

La figura 28 muestra las fases esmécticas A focal cónica y esméctica C, observadas por calentamiento.

Al enfriar y llegar a los 75.9°C, por MLP la primera textura que aparece es una SmA que presenta una estructura poligonal bien definida. Cuando esto ocurre, diremos que estamos frente a una **SmA focal cónica**. Este tipo de distribución es común observarla cuando la nucleación que se origina desde el estado isotrópico, comienza a formarse en la superficie del vidrio.

Por MLP, las temperaturas de transición al estado isotrópico tienen estrecha relación tanto por calentamiento (89.4°C), como por enfriamiento (87.7°C), el caso se repite en el DSC y casi a las mismas temperaturas (figura 29). No ocurre lo mismo con el cambio de estado que pasa por el cristalino, ya que no se pudo determinar de forma clara, tal vez por inestabilidad del equipo, porque al querer alcanzar temperaturas menores a 0°C el DSC se descompensaba. Las fases observadas en este estudio fueron la smA y SmC.

Monómero M6OA8

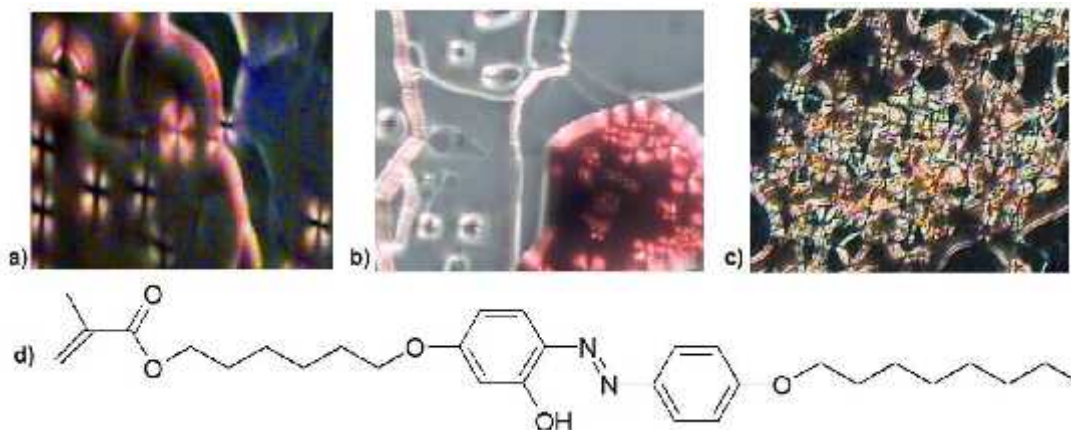


Figura 30. a) Fase SmA por MLP con Tensión superficial a 60,9°C (enfriamiento); b) Fase SmA a 62.1°C por tensión superficial (enfriamiento); c) SmA a 60°C (enfriamiento); d) Estructura del monómero M6OA8.

Los datos obtenidos por MLP nos indican:

Calentamiento: Cristalina (40.7°C) – SmA (66.4°C) – Isotrópica.

Enfriamiento: Isotrópica (87.1°C) – SmA (60.9°C) – Cristalina.

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristal (45.0°C) – SmA (83.0°C) – Isótropo.

Enfriamiento: Isótropo (85.0°C) – SmA (43.0°C) – Cristal.

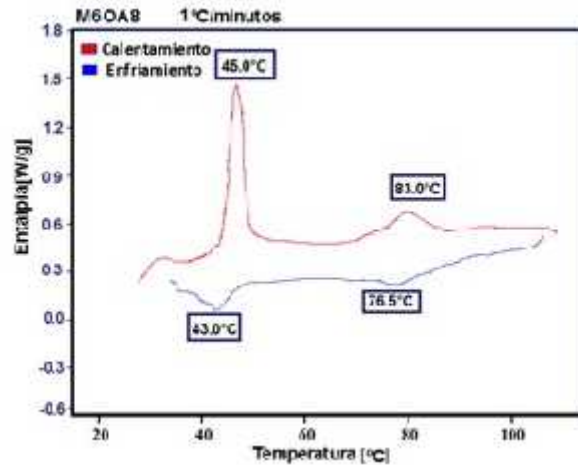


Figura 31. DSC para el monómero M6OA8.

El primer Termograma realizado al M6OA8, se hizo con una rapidez de 5°C/min. , pero como los cambios de transición resultaron ser casi imperceptibles por la baja energía involucrada, se realizó nuevamente, pero a un flujo de 1°C/min. Es por ello, que de todas las curvas presentadas es la única que presenta esta velocidad.

En el gráfico de la figura 31, podemos observar que pese a que las señales correspondientes a casi todos los cambios de fase siguen siendo débiles, se pueden distinguir claramente, así que nuevamente estamos frente a un compuesto líquido cristalino.

Por calentamiento y por enfriamiento se nota claramente una simetría entre las temperaturas de transición de fase.

Por MLP se pudo observar por calentamiento y por enfriamiento solo la presencia de la fase SmA, a una temperatura que bordeaba los 60°C.

Monómero M6OA12

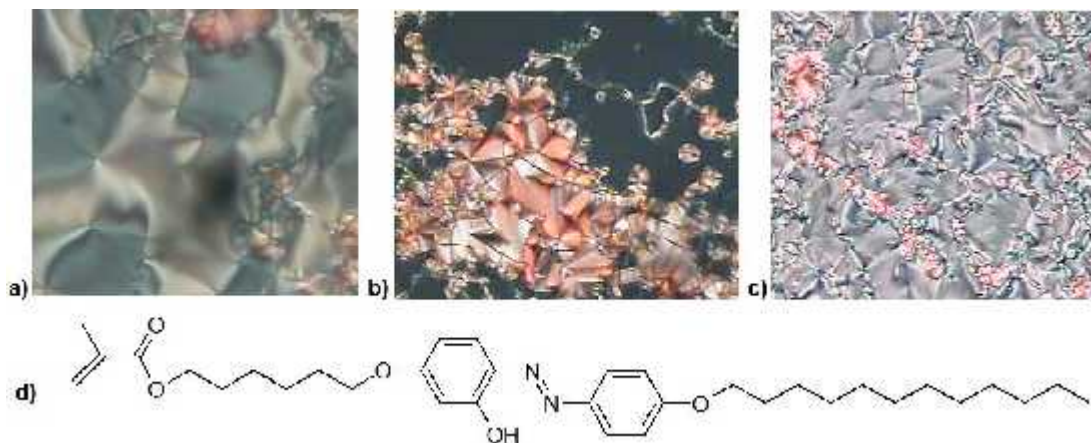


Figura 32. **a)** Fase SmC por MLP con vidrio pretratado con detergente a 80.3°C (Calentamiento); **b)** Fase SmA por MLP a 62.7°C (enfriamiento); **c)** Fase Smc por MLP a 82.5°C (enfriamiento); **d)** Estructura del M6OA12.

Los datos obtenidos por MLP nos indican que las texturas encontradas y las temperaturas de fases fueron:

Calentamiento: Cristal (55.7°C) – SmC (79.3°C) – SmA (90.4°C)–I.

Enfriamiento: I (98.2°C) – SmA (70.3°C) - SmC (50.9°C) - Cristal.

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristal (55.7°C) – SmC (nd)* - SmA (98.8°C) – I.

Enfriamiento: I (92.2°C) – SmA (nd)* – SmC (43.7°C) – Cristal.

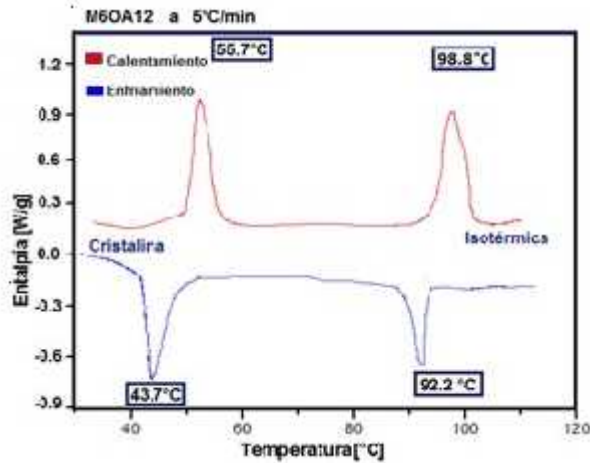


Figura 33. DSC del monómero M6OA12.

Este compuesto presenta temperaturas de transición muy similares entre ambas rampas (figura 33) y los valores entregados por MLP se acercan bastante a los entregados por el DSC.

Las texturas observadas por MLP en este monómero corresponden a una SmA y a una SmC. Las temperaturas en las que aparece la SmC por calentamiento y la SmA por enfriamiento no pudieron determinarse por DSC ((nd)*), solo se establecieron por MLP (figura 32)

7.2.1. Caracterización fisicoquímica de las bases de Schiff.

Monómero M8R12

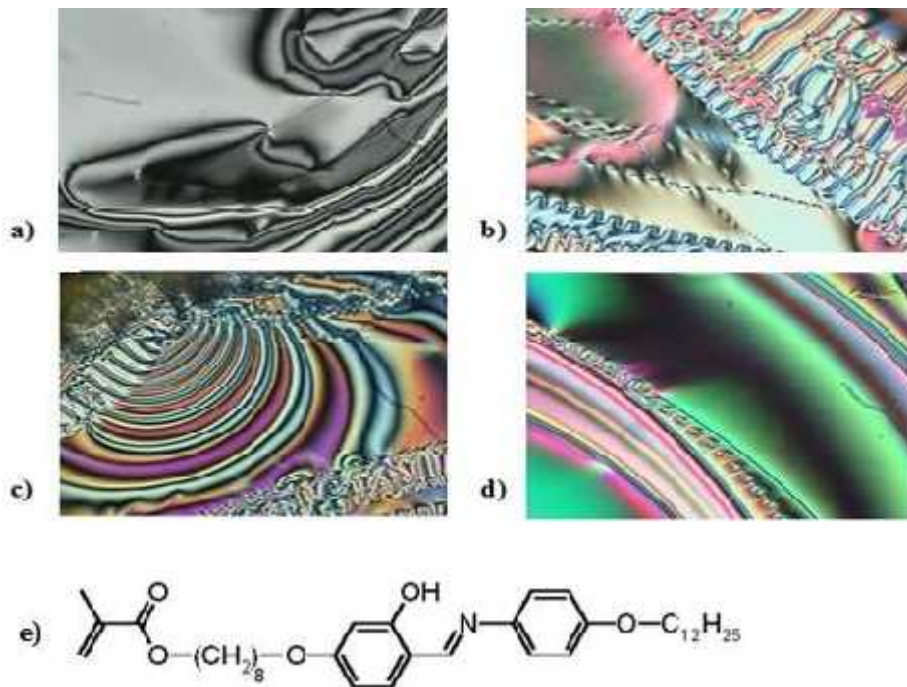


Figura 34. MLP con tensión superficial: **a)** Fase SmC a 56°C (calentamiento); **b)** Fase Isotrópica a 85.4°C (enfriamiento); **c)** Fase isotrópica a 84.9°C (enfriamiento); **d)** M8R12 a 81.7°C; **e)** Estructura del monómero M8R12.

Los datos obtenidos por MLP nos indican:

Calentamiento: Cristalina (58.4°C) – SmC - (98.9°C) Isotrópica.

Enfriamiento: Isotrópica (95.7°C) - SmC - (48.9°C) Cristalina.

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristalina (67.0°C) – SmC (99.5°C) – Isotrópica.

Enfriamiento: Isotrópica (99.2°C) – SmC (49.0°C) – Cristalina.

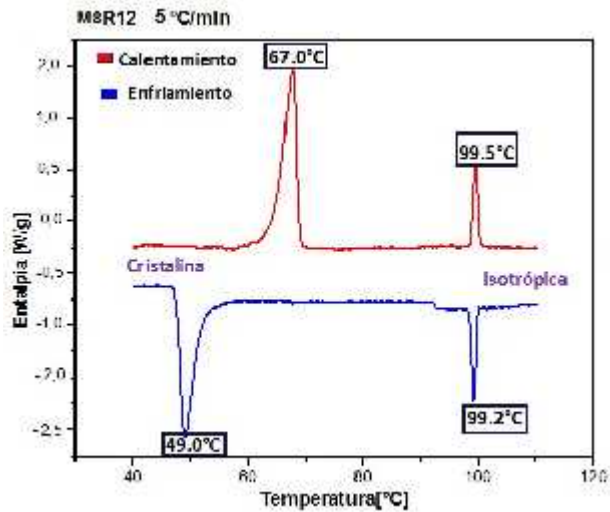


Figura 35. DSC del monómero M8R12

Con los datos obtenidos por el DSC (figura 35) y por MLP (figura 34) podemos ver que las transiciones de fase están muy marcadas, por DSC se observan claramente los cuatro picos con una alta energía, así que podemos asegurar que estamos frente a un compuesto líquido cristalino. Por calentamiento, la temperatura con la que el monómero llega al estado isotrópico es prácticamente la misma con la que el compuesto sale de ese estado (0,3°C de diferencia). No ocurre lo mismo cuando transcurre la primera transición desde el cristalino (más de 10°C de diferencia). La textura que se observa por MLP cuando se parte desde el isotrópico es la SmC (Figura 34a). Por enfriamiento figura el mismo tipo de textura.

Monómero M10R12

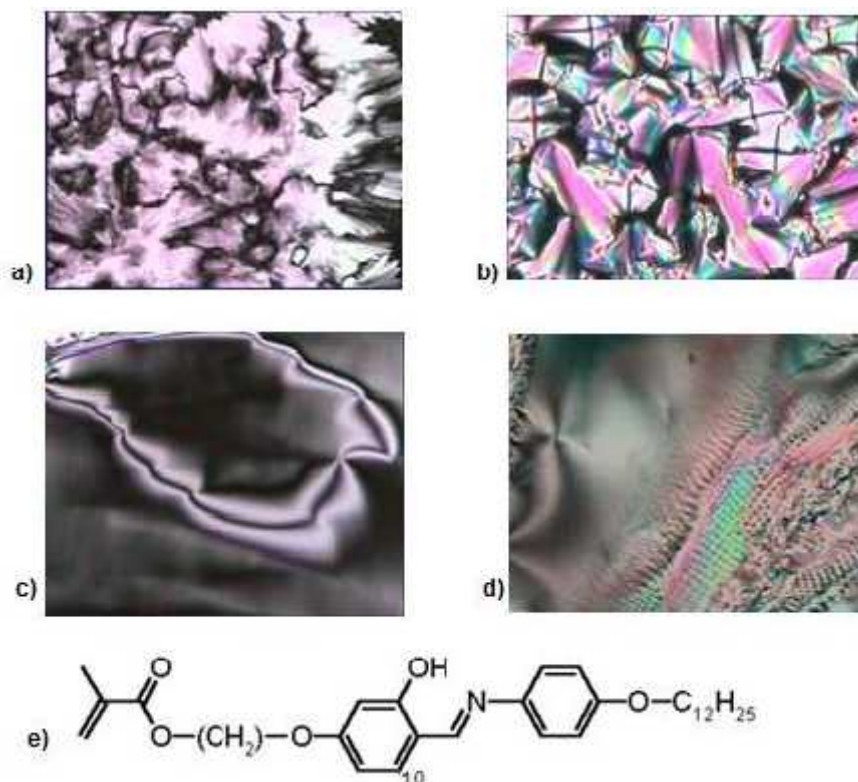


Figura 36. M10R12. MLP por Técnica convencional. **a)** Fase Cristal a 45°C (calentamiento); **b)** Fase SmA. MLP con Tensión Superficial a 97.5°C (enfriamiento); **c)** Fase SmC a 75.5°C; **d)** Fase SmC a 99.7°C (enfriamiento); **e)** Estructura de la base de Schiff M10R12.

Los datos obtenidos por MLP nos indican:

Calentamiento: Cristal (45.0°C) – SmC (89.0°C) – SmA-(100.5°C) – I.

Enfriamiento: I (57.7°C) - SmA (75.9°C) – SmC (99.7°C) – Cristalina.

Los datos entregados por el DSC fueron los siguientes:

Calentamiento: Cristalina (55.7°C) – SmC (nd*) – SmA (98.8°C) – I.

Enfriamiento: I (97.7°C) – SmA (nd*) - SmC (43.7°C) – Cristalina

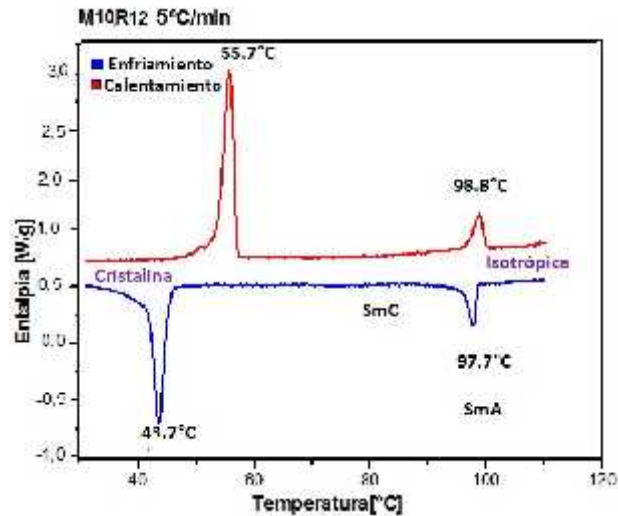


Figura 37. DSC del monómero M10R12

El monómero M10R12 presenta claramente propiedades líquido cristalinas. El grafico muestra los cuatro puntos donde ocurren los cambios de estado (figura 37). Las temperaturas con las que pasan por el isótropo presentan una variación despreciable (menos de un grado), mientras que cuando pasa por el estado cristalino, la diferencia alcanza los 12°C.

Por MLP, tanto por calentamiento como por enfriamiento se observaron dos tipos de texturas, la SmA y la SmC (figura 36), cada una de ellas con su respectiva temperatura a la que fue observada, lo que no fue posible lo que no fue posible establecer por el DCS.

	Mesofase por Calentamiento	Mesofase por enfriamiento
M6OA8	C(40,7°C) - SmA (66,4°C) - I.	I (87,1°C) - SmA (60,9°C) -C.
M6OA12	C(55,7°C) - SmC (79,3°C) - SmA (90,4°C) - I	I(98,2°C) - SmA (70,3°C) - SmC(50,9°C) -C.
M6A8	Cristal (75,0°C) - Isótropo.	I (78,6°C) - SmA (60,0°C) -C.
M6A12	C(52,0°C) - SmC (60,0°C) - SmA (89,4°C) - I.	I (87,7°C) - SmA (75,9°C) - C (70,5°C).
M8R12	C(58,4°C) - SmC (98,9) - I.	I (95,7°C) - SmC (48,9°C) - C.
M10R12	C(45,0°C) - SmC (89,0°C) - SmA (100,5°C) - I	I(57,7°C) - SmA (65,9°C) - SmC (99,7°C) -C

Tabla 1. Análisis por Microscopía de luz Polarizada.

	Mesofase por Calentamiento	Mesofase por enfriamiento
M6OA8	C(45,0°C) - SmA (83,0°C) - I.	I (85,0°C) - SmA (43,0°C) - C.
M6OA12	C (55,7°C) - SmC (nd)* - SmA (98,8°C) - I.	I (92,2°C) - SmA (nd)* - SmC (47,3°C) - C.
M6A8	Cristal (77,0°C) - Isótropo.	I (71,1°C) - SmA (61,1°C) - C.
M6A12	C (52,6°C) - SmA (86,8°C) - I.	I(90,0°C)-SmA (76,6°C)- SmC(67,0°C)- C.
M8R12	C (67,0°C) - SmC (99,5) - I.	I (99,2°C) - SmC (49,0°C) - C.
M10R12	C (55,7°C) - SmC (nd)* - SmA (98,8°C) - I.	I(97,7°C) - SmA (nd)* - SmC (43,7°C)- C.

Tabla 2. Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido. (nd* = no determinada).

7.3. Análisis Termogravimétrico.

Dentro de la gama de los análisis térmicos que existen, está el análisis térmico gravimétrico. Cuando un material se calienta, su estructura cristalina puede sufrir un cambio físico, como una fusión, o uno de transición de un estado cristalino a otro o también entre mesofases si es un cristal líquido. Para conocer el comportamiento térmico de descomposición de los compuestos en estudio, estos fueron calentados a velocidad constante (5 K/min) desde los 22°C hasta los 800°C. Las curvas Termogravimétricas obtenidas mostraron los intervalos de temperatura donde ocurrió la mayor pérdida de masa.

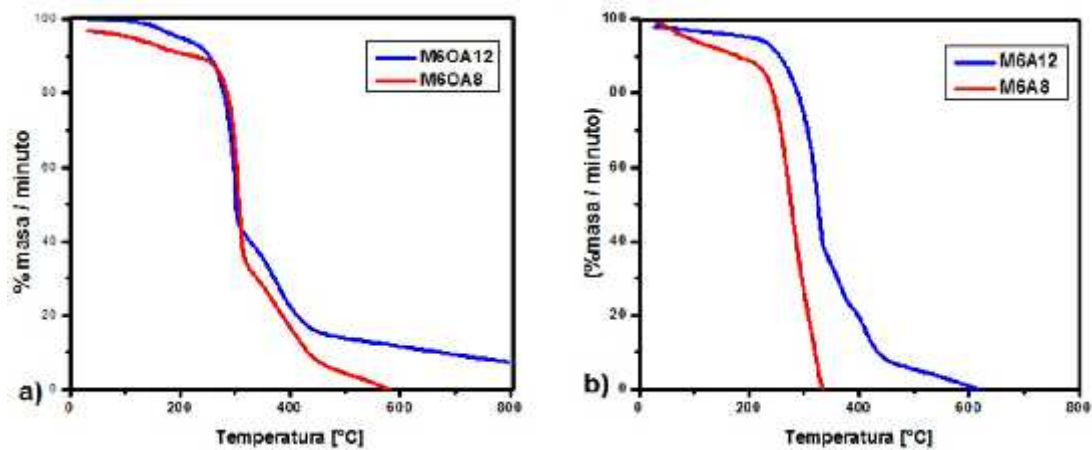


Figura 38. a) Análisis Térmico Gravimétrico de M6OA8 y del M6OA12; b) Análisis Térmico Gravimétrico de M6A8 y del M6A12.

7.3.1. TGA de Monómeros de derivados del azobenceno.

La figura 38-a, compara la pérdida de masa entre los derivados azobencénicos resorcinólicos. Se puede apreciar que los monómeros M6OA12 y M6OA8 presentan un comportamiento de degradación bastante similar, ya que los puntos de inflexión muestran que las temperaturas en la que ocurren las pérdidas de masa importante coinciden.

Existe aproximadamente un 5% de masa que se pierde a los 100°C en el monómero M6OA8 y un 0,4% en el M6OA12. Se presume que corresponde a eliminación de humedad absorbida por los compuestos.

El monómero M6OA12 se descompone a partir de los 290°C y el M6OA8 lo hace a la misma temperatura. La diferencia radica en que el porcentaje de masa presente en este punto era menor en el M6OA8. Entre los 300°C y los 400°C el porcentaje de masa cae del 50 al 20%, observándose siempre mayor cantidad de M6AO12 que de M6OA8 hasta que finaliza el proceso. En la figura 38-b, se observa el comportamiento con el que ambos azos fenólicos se desintegran frente al calor, situación que no coincide con los resorcinólicos. A los 230°C se comienza a descomponer el M6A8 mientras que el M6A12 lo hace a los 245°C. Prácticamente todo el M6A8 se descompone a los 290°C y el M6A12 a los 340°C aún poseía algo de masa remanente.

Al comparar entre si los compuestos fenólicos y los resorcinólicos (Tabla 3), la cantidad de intermediarios, y por consiguiente, la masa molar de las

moléculas tuvieron directa relación con la temperatura de degradación. A mayor largo de cadena intermediaria, más cantidad de enlaces presenta la estructura y más energía se necesita para romperlos. Si bien es cierto, las temperaturas a las que comenzaron a degradarse los monómeros azos resorcinólicos fue la misma, la cantidad de masa que fue presentando cada uno a determinada temperatura a medida que avanzaba el tiempo fue distinta, perdiéndose mayor cantidad de aquellos que tienen cadenas más cortas.

Si hacemos la comparación entre los azos derivados de los azobencenos fenólicos y de los resorcinólicos que presentan la misma cantidad de carbonos intermediarios, veremos que la presencia del grupo Hidroxilo aumenta la estabilidad térmica de estos compuestos.

Al analizar las energías de enlaces involucradas en las estructuras, las uniones que cambian entre la molécula derivada del Fenol (**C-H**) con 414 kJ/mol de energía entre sus enlaces, con las del Resorcinol (**C-O-H**) con 811kJ/mol, vemos que presentan una diferencia que no es despreciable (casi 400kJ/mol), variedad energética que puede influir directamente en la temperatura con la que cada compuesto se degrada.

7.3.2. TGA de Monómeros de las bases de Schiff

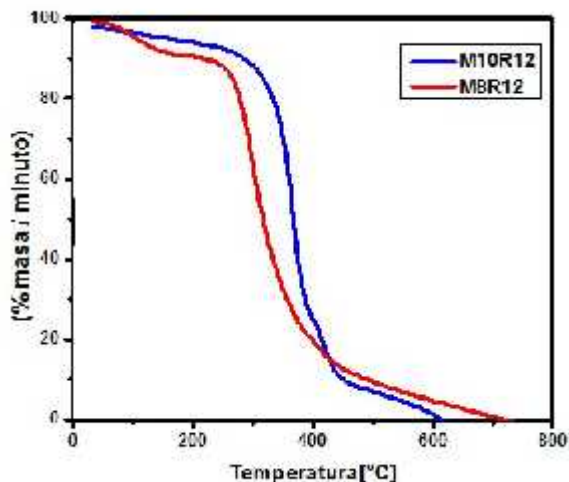


Figura 39. Termograma de los monómeros de las Bases de Schiff.

Nuevamente las rampas estudiadas se asemejan bastante, e incluso hay dos puntos de temperatura en los que se presentan la misma cantidad de masa degradada por minuto (80°C y 426°C).

Desde los 50°C, el monómero M8R12 necesita menos calor para degradarse que el M10R12, esta situación continúa así hasta los 280°C y 310°C respectivamente. Nuevamente se aprecia que la molécula de mayor peso molecular (M10R12) requiere de más energía para su descomposición, lo que concuerda con lo observado en los compuestos azobenzoicos.

7.3.3. Análisis Termogravimétricos de Polímeros.

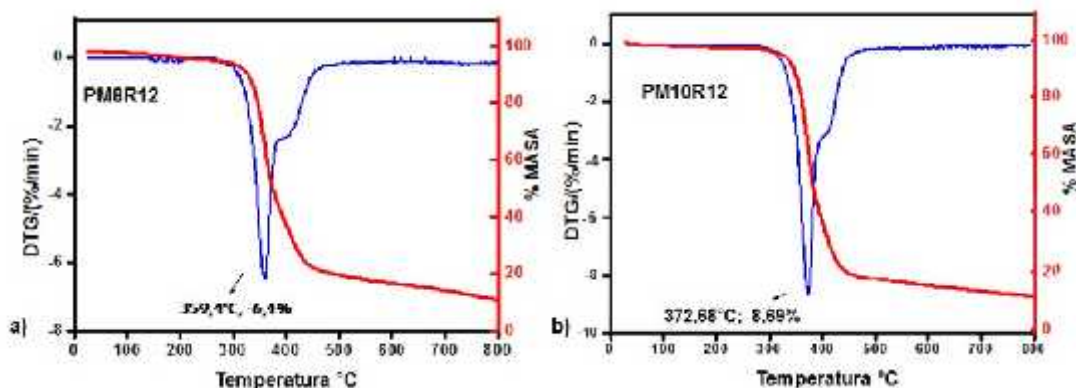


Figura 40. Análisis Termogravimétrico de bases de polímeros de las bases de Schiff:
a) PM8R12; b) PM10R12.

Otra manera de mostrar los datos en Termogravimetría es utilizando la primera derivada de la curva de degradación de la masa, en función de la temperatura o del tiempo. La figura 40 corresponde al TG y al DTG de los polímeros que se obtuvieron a partir de los monómeros de Bases de Schiff

La curva DTG (Derivada de la Termogravimetría), representa la variación de masa frente a la temperatura. La curva DTG informa el resultado del mismo experimento que la curva TG (variación del peso con respecto a la temperatura o al tiempo), pero de forma diferente. Una curva DTG de un compuesto puro puede ser considerada como propia, debido a la secuencia de procesos físico-químicos que experimenta en determinadas condiciones en un intervalo de temperatura. DTG nos entrega la relación que existe entre el porcentaje de masa presente con respecto al tiempo. Al comparar las rampas de degradación de los monómeros con sus respectivos polímeros, los cambios encontrados no

son significativos. La tabla 3 presenta los datos obtenidos al comparar cada monómero con su respectivo polímero.

Compuesto	% masa	T° [°C]	T° [°C]
M6OA12	17	301.5	304.7
M6OA8	17	297.3	301.2
M6A12	22	300.8	305.7
M6A8	22	296.7	302.8
M8R12	6,4	351.2	362.1
M10R12	6,4	367.6	372.6

Tabla 3 Análisis Termogravimétrico de monómeros con sus respectivos polímeros.

7.4. Citotoxicidad.

Los estudios de toxicidad se realizaron en cultivos de línea celular SH-SY5Y y se sometieron a desiguales tiempos de exposición, incubándose con los tipos de compuestos líquido cristalinos a distintas concentraciones y evaluando la acción citotóxica de los mismos. En la figura 24, se observa la formación de los cristales de Formazán, los que se relacionan de manera indirecta con la viabilidad celular. Después de 24 horas de tratamiento en los cultivos de SH-SY5Y, no se encontraron diferencias específicas, pero con 48 horas, apareció una mayor diferenciación entre ambos grupos funcionales en estudio. Hay que especificar que la señal que entrega la viabilidad de un medio sin haber sido expuesto a ningún compuesto de los que se están estudiando, corresponde a lo que en el gráfico se denominó “control”, el cual sirve de manera interna para evaluar la significancia estadística (p). Así que se asignó un 100% de viabilidad al medio de cultivo DMEM SFB 10%.

El primer problema que se presentó para conocer la citotoxicidad de los azobencenos y de las bases de Schiff, fue que son insolubles en agua y para probarlos en un cultivo celular debían estar disueltos. Así que se prepararon mezclas al 0,5% v/v y al

1% v/v, formada por el solvente en estudio y el medio de cultivo en el que se desarrollaban las células. Los solventes utilizados en este estudio fueron: Tolueno, Tetrahidrofurano (THF), Cloroformo, Dimetilsulfóxido (DMS), N-

metil pirrolidona (NMP), Diclorometano (DCLMet) y Acetato de etilo (A de Et). Como control de muerte positivo se usó SDS 0,2% y H₂O₂ 0,2%.

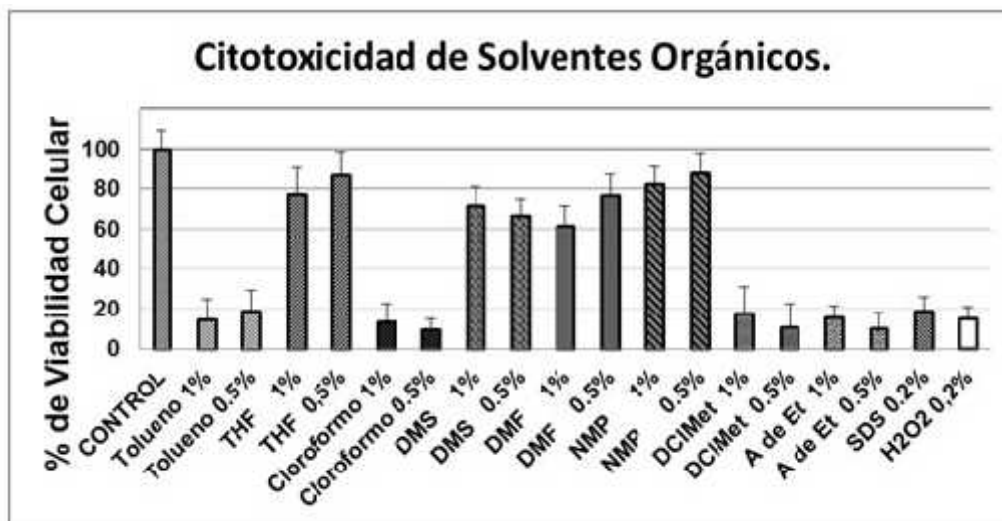


Figura 41. Gráfico de Citotoxicidad de distintos solventes orgánicos en la línea celular *neuroblastoma SH-SY5Y*. Todas las muestras con n=18 y 48 horas de estímulo.

Las células que presentaron el mayor porcentaje de viabilidad fueron las que se sometieron al estímulo de la NMP y del THF (figura 41). Como la solubilidad de los compuestos era mayor en el THF que en la NMP, es decir, se necesitaba menos de la mitad de volumen de THF para disolver la misma cantidad de compuesto que con la NMP, se optó por el THF como solvente para este análisis.

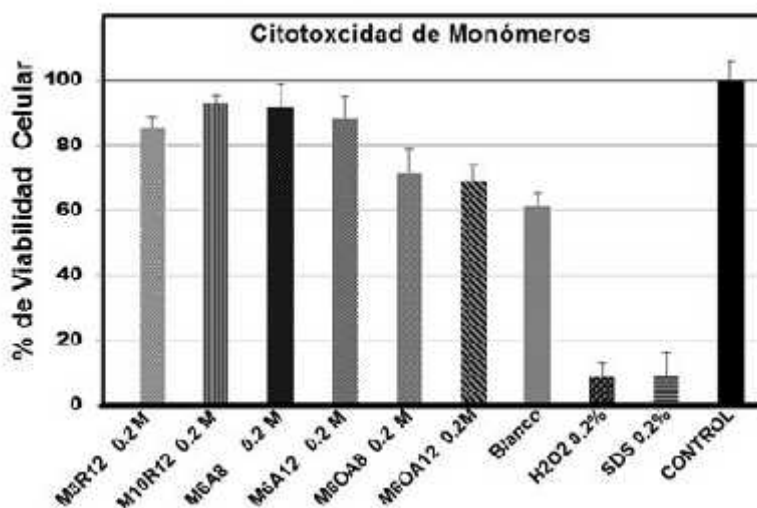


Figura 42. Gráfico de Citotoxicidad de monómeros azobencénicos y de bases de Schiff en la línea celular neuroblastoma SH-SY5Y. Todas las muestras con n=18 a una concentración de 0,2mol/l durante 24 horas.

Para este caso y cada uno de los ensayos, el Blanco correspondió al solvente utilizado para disolver los monómeros y los polímeros, el THF.

Este grupo de monómeros incluye a los derivados de azobencenos y a las bases de Schiff, cada uno de ellos a la misma concentración molar y con el estímulo aplicado por 24 horas.

Podemos ver que el porcentaje de viabilidad representa la cantidad de células que continúan con actividad metabólica, pese a haber sido expuestas a un compuesto químico que no forma parte de su medio natural. Si comparamos a las células que sólo estuvieron expuestas al solvente (Blanco) con las que estuvieron expuestas a los monómeros, podríamos pensar que la inactividad celular se debe principalmente al solvente utilizado, está entre el 8 y el 20%, dependiendo del monómero. También podemos observar que los valores

obtenidos a partir de las bases de Schiff y de los azobencenos no presentan diferencias significativas que nos permitan identificar a uno de ellos como más nocivo (figura 42).

El análisis estadístico, permitió ver que las desviaciones estándar son bastante homogéneas y que en ningún caso una de ellas sobresale como para tener que verificar los valores de absorbancia obtenidos durante el ensayo (figura 42).

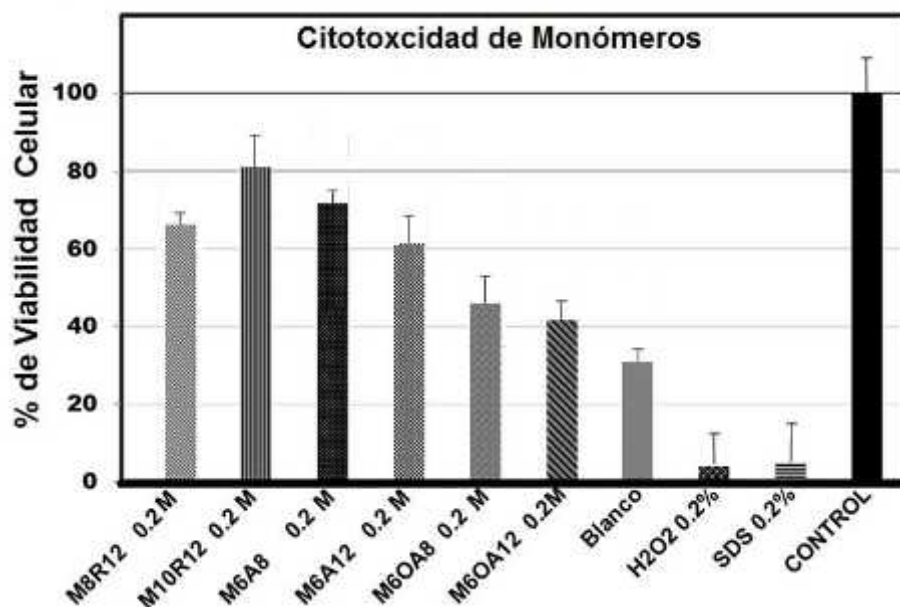


Figura 43. Gráfico de Citotoxicidad de monómeros azobencénicos y de bases de Schiff en la línea celular *neuroblastoma SH-SY5Y*. Todas las muestras con n=18 a una concentración de 0,2mol/l durante 48 horas.

En el gráfico de la figura 43, se observa el porcentaje de viabilidad que se estudió después de haber aplicado el estímulo por 48 horas con una concentración de 0,2mol/l.

Podemos ver que a diferencia del estudio que se realizó por 24 horas, en éste, se distinguen un poco más los efectos de los compuestos, resultando ser los derivados de azobencénicos provenientes del resorcinol lo que presentan el menor porcentaje de viabilidad. A pesar de esto, puedo considerar que a la concentración estudiada no estamos frente a estructuras letales, porque más del 50% de las células están vivas y no ocurrió lo mismo con los controles de muerte positiva que se utilizaron.

Al comparar la viabilidad de las células frente al estímulo que estuvo presente por 24 horas con el que estuvo 48 horas, podemos notar que el factor tiempo no interrumpió la vida de las células, porque aumentó la viabilidad celular, por lo que podría concluir que el ciclo reproductivo de las células se mantuvo pese a que estaba siendo expuesta a una sustancia extraña a su medio.

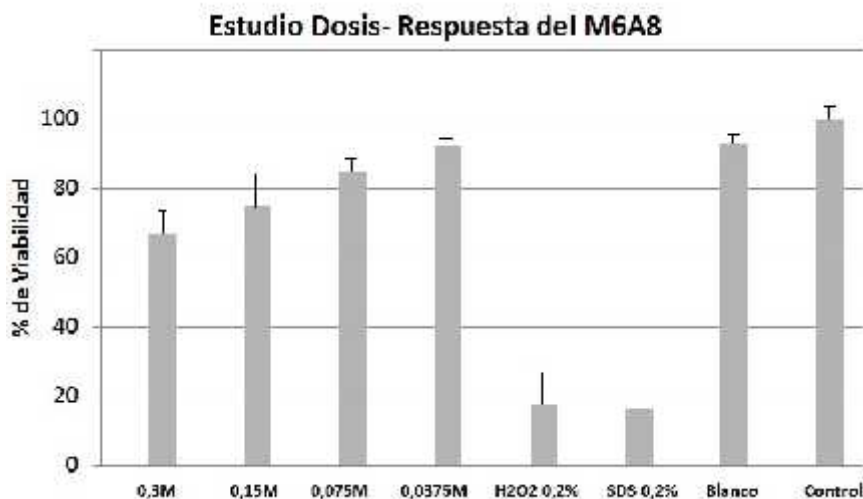


Figura 44. Gráfico de Citotoxicidad de monómero M6A8 en la línea celular *neuroblastoma SH-SY5Y*. Todas las muestras con **n=18** a distintas concentraciones durante **24 horas**.

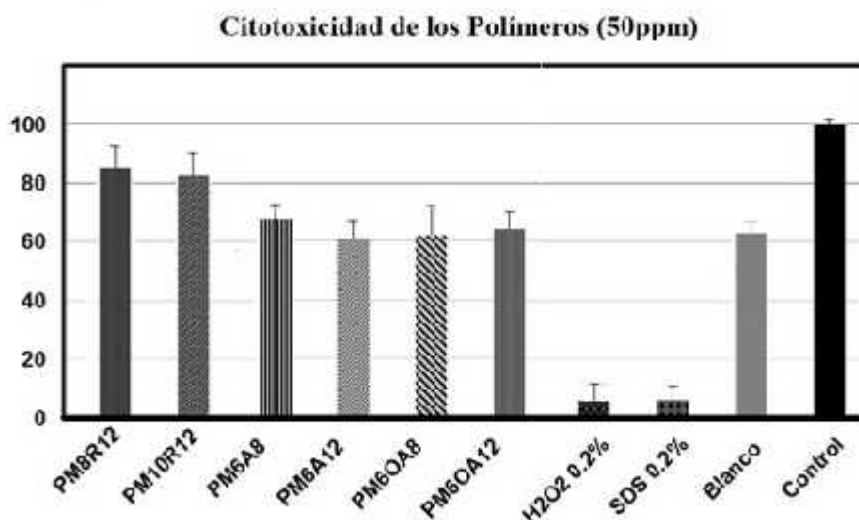
Entre los monómeros que sintetice en el laboratorio, el derivado del fenol y con la cadena terminal más corta, el M6A8, en el ensayos anterior (figura 43), mostró ser el que presentaba el mayor porcentaje de viabilidad. Así que lo elegí para estudiar su respuesta a distintas dosis con los estímulos aplicados por 24 horas.

La respuesta frente a la menor concentración que utilicé es muy similar a la que entrega el Blanco, por lo que podría pensar que las células que dejaron de tener actividad, lo hicieron por el efecto del THF y no por el compuesto líquido cristalino estudiado.

Al aumentar la concentración al doble, el porcentaje de viabilidad no bajó a la mitad, tal vez porque tenemos varios factores que afectan el análisis de los datos, como por ejemplo, que las células siguen multiplicándose mientras

algunas mueren y que el solvente con el que se trabajó intervino, situación que no habría ocurrido si hubiese podido utilizar agua para disolver los cristales. Lo que sí hay que destacar, es que hay una clara relación entre la concentración del monómero agregado como estímulo y la viabilidad celular (figura 44).

En esta parte del estudio (Figura 45), se trabajó con concentraciones ppm porque para calcular la molaridad de los polímeros necesitaba conocer su masa



molar y no realicé ningún experimento que me permitiera determinarla.

Figura 45. Gráfico de Citotoxicidad de los polímeros en la línea celular *neuroblastoma SHSY5Y*. Todas las muestras con n=18 a concentraciones de 50 ppm. por 48 horas.

El estímulo en esta parte del estudio se mantuvo por 48 horas, ya que los experimentos anteriormente realizados permitieron ver una mayor diferenciación entre los monómeros cuando permanecían más tiempo expuestos a los distintos compuestos.

Nuevamente la diferencia que existe entre las muestras sometidas al solvente puro comparadas con las que estuvieron frente a la mezcla no superan el 25% y en algunos casos es casi despreciable, así que vuelvo a concluir que si la viabilidad celular no llega al 100% es a causa del THF y no de los polímeros estudiados.

Si hago una comparación de acuerdo a los grupos funcionales, las bases de Schiff presentan menos efectos citotóxicos que los derivados azobencénicos, tanto en el caso de los monómeros como de los polímeros.

En resumen, los ensayos de viabilidad muestran que aparentemente a las dosis con las que se realizó cada experimento, los compuestos no son aparentemente citotóxicos, ya que el solvente utilizado para este estudio, era un factor que influía demasiado en los análisis.

La diferencia de viabilidad presentada por el conjunto de monómeros y de polímeros azobencénicos, estadísticamente no es significativa y se observa que las bases de Schiff, en que a las dosis investigadas resultaron tener mayor porcentaje de viabilidad.

8. CONCLUSIONES.

Se sintetizaron los monómeros M6A8, M6A12, M6OA8 y M6OA12 y se caracterizaron sus estructuras.

Se caracterizaron las propiedades líquido cristalinas de los azo compuestos sintetizados, encontrándose la existencia de las mesofases, Esméctica A y C.

La polimerización de los monómeros para obtener los polímeros PM6A8, PM6A12, PM6OA8 y PM6OA12 se llevó a cabo con rendimientos superiores al 60%.

Las bases de Schiff previamente sintetizadas en el laboratorio presentaron propiedades y texturas características de cristales líquidos, con mesofases del tipo Esmécticas de tipo A y Esméctica C.

Para los derivados azos, su descomposición es concordante con la estabilidad de sus estructuras, encontrándose que en aquellos compuestos derivados de resorcinol, la estabilidad térmica es más alta que aquellos derivados del fenol.

La temperatura de degradación de los monómeros y de los polímeros, no presentaron diferencias significativas.

Respecto de la citotoxicidad, se encontró que los compuestos estudiados y a las dosis indicadas en cada ensayo, presentan una baja toxicidad en células de neuroblastomas SH-SY5Y, con una mortandad celular no mayor al 20%.

Se observó claramente un efecto dosis-respuesta en el monómero M6A8.

Debido a que la respuesta no fue inversamente proporcional a la cantidad de

monómero agregado como estímulo, se establece que no hay una función lineal.

Los resultados del ensayo con MTT, indican que bajo los tiempos y las concentraciones con las que se trabajaron los compuestos, estos no presentaron una citotoxicidad relevante.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] B Simon-Hettich and W Becker, "Toxicological Investigations of Liquid Crystals," 28th Workshop on Liquid Crystals, Freiburg, Germany. March 24-26, 1999.
- [2] F. Reinitzer, Wiener Sitzber. 94, (1888), 719, ibid 97 (1888), 167.
- [3] F. Reinitzer, Monatsch. Chem., **9**, 421 (1888).
- [4] H.Kawai, Japan J. Appl.Phys, 8, 1969, 975.
- [5] O.Lehmann Z. Phys Chem 4, 1889, 462.
- [6] Meyer, R. B.1977. Ferroelectric liquid crystals. Mol. Cryst. Liq Cryst. 33.
- [7] O.Lehmann Z. Phys Chem 4, 1889, 462.
- [8] D. Dunmur, K. Toriyama en Handbook of Liquid Crystals, Vol. 1, Ed. D. Demus, J. Goodby, G. W. Gray, H.-W. Spiess, V. Vill, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, 215-230.
- [9] Friedel, G. 1922. Les e'tats mesomorphic da la matie'r. Ann. Phys. 237.
- [10] John W. Goodbye et al. Molecular Complexity and the control of self-organising processes, liquid crystals (36), 6-7: 567-605 Jun-Jul. 2009.
- [11] F. Reinitzer, Wiener Sitzber. 94, (1888), 719, ibid 97 (1888), 167.
- [12] Blinov, L. M. 2011. Structure and Properties of Liquid Crystals. Springer Dordrecht. Cap 1. 1p.
- [13] Ingo Dierking. 2003. Texture of Liquid Crystals. Druckhaus DarmstadtGmbH, Darmstadt. Color plates. 167p.

- [14] Ingo Dierking. 2003. Texture of Liquid Crystals. Druckhaus DarmstadtGmbH, Darmstadt. Color plates. 167p.
- [15] Ingo Dierking. 2003. Texture of Liquid Crystals. Druckhaus Darmstadt GmbH, Darmstadt. Color plates. 167p.
- [16] C. J. Booth en Handbook of Liquid Crystals, Vol. 2A, Ed. D. Demus, J. Goodby, G. W. Gray, H.-W. Spiess, V. Vill, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, 303-334.
- [17] Charles Kittel. 2003. Introduction to liquid Crystals. 2006. Bad Marienberg, Germany. 3p.
- [18] Ingo Dierking, Intruduction. En su: Textures of Liquid Cristals, Weinheim, WILEY-VCH Verlag Gmb & Co. KgaA. pp 1-16. 2003. [19] Ingo Dierking, Intruduction. En su: Textures of Liquid Cristals, Weinheim, WILEY-VCH Verlag Gmb & Co. KgaA. pp 1-16. 2003. [20] H. Kawai, Jpn. J. Appl. Phys., 8, 875, 1969.
- [21] Ingo Dierking, Intruduction. En su: Textures of Liquid Cristals, Weinheim, WILEY-VCH Verlag Gmb & Co. KgaA. pp 1-16. 2003.
- [22] G. Gray and P. A. Winsor. 1974. Liquid Crystals and Plastic Crystals, (chapter 2), Chichester.
- [23] Ingold, K.U., Kochi, J.K. (Ed.); Free Radicals, Wiley, New York, Vol.I, Ch.2, 37-112 (1973).

- [24] Radecka- Payzek, W., Patroniak, V., Lisowski, J: Metal complexes of polyaza and polyoxaaza Schiff base macrocycles. *J. Coord. Chem. Rev.* 2005, 249, 2156 – 2175.
- [25] Demus, D. Richter, L. 1978. *Textures of Liquid Crystals*. Verlag Chemie, Weinheim. 58p.
- [26] Demus, D Goodby, G. W. Gray, H. W. Spiess, V. 1998. *Handbooh of Liquid Crystals*, Wiley – VCH, Vol. 1, 407- 453p.
- [27] *Handbook of Liquid Crystals*, Wiley- VCH, D. Demus, J. Goodby, G. W. Spiess, V. Vill, Vol. 1, 310 – 334, 1998.
- [28] G. Gray and P. A. Winsor. 1974. *Liquid Crystals and Plastic Crystals*, (chapter 2), Chichester.
- [29] P. Narvard and R. Cox. 1084. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 102, 265p.
- [30] Höhne G., Hemminger W. and Flammersheim H.J.: *Differential Scanning Calorimetry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1996, ISBN 3-540-59012-9.
- [31] Haines P. J. et al: *Thermal methods of analysis: principles, applications and problems*. Blackie Academic & Professionals, London, 1995.
- [32] D.A. Skoog et al. *Principios de Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, Madrid. Pp 864- 869. (2002).
- [32] Fentem J.H. The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology* 1994; 13 (2):445-449.
- [33] Fentem J.H. The use of human tissue in vitro toxicology, Summary of general discussions. *Human Experimental Toxicology* 1994; 13: 445- 449.

[34] LIU Y., Peterson D. A., Kimura H., Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69 (2):581-593, 1997.