



**Universitat Jaume I**

**Escuela superior de Tecnología y  
ciencias Experimentales**

**Trabajo Fin de Máster**

# **Síntesis y estudio de un gelificante derivado de L-Valina y ácido succínico**

**Autor:** Fernando Cano Fortes

**Supervisor** Juan Felipe Miravet

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

**Curso:**2019/2020



## **ÍNDICE**

### **1. Introducción**

#### **1.1. ¿Qué son los geles?**

##### **1.1.1. Tipos de geles**

##### **1.1.2. Gelificantes de bajo peso molecular (LMWG)**

##### **1.1.3. Mecanismos de formación de geles moleculares**

##### **1.1.4. Caracterización de geles**

##### **1.1.5. Aplicación de los geles moleculares en liberación de fármacos**

#### **1.2. Formación del enlace peptídico en síntesis orgánica.**

##### **1.2.1 Protección del grupo amino**

##### **1.2.2 Activación del grupo carboxilo.**

### **2. Objetivos**

### **3. Resultados y discusión**

#### **3.1. Síntesis**

#### **3.2. Ensayos de Gelificación**

### **4. Conclusiones**

### **5. Parte experimental**

#### **5.1. Síntesis de SucVal6**

#### **5.2. Preparación de geles**

### **6. Anexo**

#### **6.1. Espectro RMN**



## ABREVIATURAS

**AOT** bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio

**BOC** terc-butiloxycarbonilo

**BPOC** [2-(4-bifenil) isopropoxycarbonilo]

**brm** multiplete ancho

**brs** singlete ancho

**CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN** cloroformo/ acetonitrilo

**cmc** concentración micelar crítica

**c.m.g.** concentración mínima de gelificación

**DCC/DCU** N,N'-Diciclohexilcarbodiimida/ N,N'-Diciclohexilurea

**dd/dt** doble doblete/doble triplete

**DMF** N,N-Dimetilformamida

**EDCI o EDC** N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

**EtOAc/EtOH** Acetato de etilo/ Etanol

**Fmoc** 9-Fluorenylmetoxycarbonyl

**HVal6** (S)-2-amino-N-(6-((R)-2-amino-3-methylbutanamido)hexyl)-3-methylbutanamide

**LMWG** Gelificadores de bajo peso molecular

**NHS** N-hidroxisuccinimida

**NPS** 2-nitrofenilsulfenilo

**PEP** *p*-etilfenol

**PTFE** Politetrafluoroetileno

**SPPS** Síntesis en fase sólida

**Suc** Ácido succínico

**SucVal6** (6R, 17S)-6,17-diisopropyl-4,7,16,19-tetraoxo-5,8,15,18-tetraazadocosane-1,22 dioic acid

**TFA** ácido trifluoroacético

**THF** Tetrahidrofurano

**Val** Valina

**Z** Benciloxycarbonilo

**ZValOH** Carbobenzyloxy-L-valine

**ZValOSu** (S)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-methylbutanoate

**ZVal6** Dibenzyl ((2S,2'R)-(hexane-1,6-diylbis(azanediy))bis(3-methyl-1-oxobutane-2,1-diyl))dicarbamate



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ¿Qué son los geles?

Los geles han invadido nuestra vida cotidiana en una variedad de formas. Los sólidos blandos húmedos que encontramos en forma de productos comerciales como jabón, champú, pasta de dientes, gel para el cabello y otros cosméticos, así como lentes de contacto, bolígrafos de gel, etc, son todos geles derivados de compuestos poliméricos.<sup>1</sup> El estado del gel fue reconocido alrededor de 150 años por Thomas Graham en 1861.<sup>2</sup> En los siguientes años, los científicos intentaron definir el estado “gel” de una forma más explícita. Dorothy Jordan Lloyd, pionera en el estudio de las interacciones del agua con las proteínas (particularmente la gelatina), propuso en 1926 la definición de gel: *“sólo una regla parece ser válida para todos los geles y es que deben estar formados por dos componentes, uno que es líquido a la temperatura considerada, y el otro la sustancia gelificante, es un sólido. El propio gel tiene las propiedades mecánicas de un sólido, es decir, puede mantener su forma bajo la tensión de su propio peso y bajo cualquier tensión mecánica muestra el fenómeno de deformación.”*<sup>3</sup>

Actualmente la definición de gel se basa principalmente en la propuesta por Flory en 1974.<sup>4,5</sup> Una sustancia macroscópica es un gel si: (1) tiene una estructura microscópica

---

<sup>1</sup>Sangeetha, N. M., &Maitra, U. (2005). Supramolecular gels: Functions and uses. *Chemical Society Reviews*, 34(10), 821–836.

<sup>2</sup> Graham, T. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **1861**, 151, 183-224.

<sup>3</sup> Jordan Lloyd, D. *In Colloid Chemistry*; Alexander, J. **1926**, vol 1, 767-782, The Chemical Catalog Co, New York

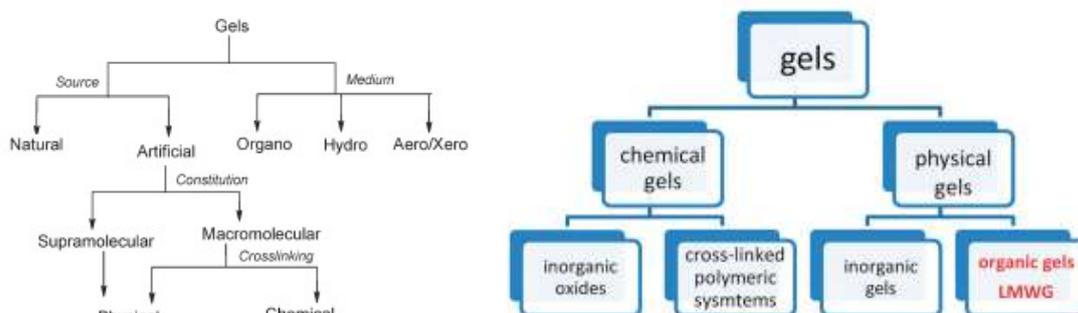
<sup>4</sup> Flory, J.P. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1974**, 57, 7-18.

<sup>5</sup> Gelbart, W.M.; Ben-Shaul, A. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13169-13189.

que es permanente en la escala de tiempo de los experimentos analíticos y (2) es de tipo sólido en su comportamiento reológico a pesar de ser mayoritariamente líquido.<sup>6</sup>

### 1.1.1. Tipos de geles

La mayoría de los gelificantes de origen natural son macromoleculares y forman geles por reticulación física (normalmente enlaces de H). Tales macromoléculas incluyen gelatina, colágeno, agar, almidón y goma gellan.<sup>7</sup> Los geles derivados de compuestos sintéticos pueden ser subdivididos en base a su constitución en macromoleculares (poliméricos) y moleculares (supramoleculares). La formación de geles a partir de compuestos macromoleculares puede resultar de entrecruzamiento químico o interacciones físicas.<sup>8</sup>



**Figura 1.** Tipos de geles y su clasificación según su origen, constitución, tipo de reticulación y medio en el que abarca.

Según el componente mayoritario de los mismos, los geles se pueden clasificar en:

-Hidrogel: Disolvente es agua

-Organogel: Disolvente orgánico

<sup>6</sup> Weiss, R.G.; Terech, P. *Molecular gels: materials with self-assembled fibrillar networks*, Springer **2006**, Dordrecht. ISBN 1-4020-3352-4.

<sup>7</sup>A notable group of low molecular mass natural products that form gel are some of the bile acids. For leading references see: S. Mukhopadhyay and U. Maitra, *Curr. Sci.*, **2004**, *87*, 1666.

<sup>8</sup>Gesser, H.D.; Goswami, P.C. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 765–788.

-Xerogel: un sólido formado después de la evaporación del disolvente en un hidrogel o un organogel por secado y colapso de la red fibrilar. Los xerogeles normalmente retienen una elevada porosidad (15-50%) y una enorme superficie de área ( $150-900 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ), junto con un tamaño de poro muy pequeño (1-10 nm)

-Aerogel: Un sólido formado cuando el disolvente eliminado ocurre bajo condiciones supercríticas; la red no se contrae resultando en una elevada porosidad y baja densidad del material. La fase líquida se reemplaza por un gas y la estructura tridimensional se conserva. Son materiales con propiedades excepcionales incluyendo muy baja densidad, alta área de superficie específica y excelentes propiedades de aislamiento térmico.

### **1.1.2. Gelificantes de bajo peso molecular (LMWG)**

Los LMWG son gelificantes formados por compuestos orgánicos con un peso molecular inferior a 2000 Da. Debido a la especial naturaleza química del agua líquida en comparación con los disolventes orgánicos,<sup>9,10</sup> compuestos capaces de gelificar el agua se subclasifican como hidrogelificadores.

Los mecanismos a través del cual operan los LMWG dependen de un proceso de autoensamblaje jerárquico que ocurre a través de la siguiente secuencia de pasos:

-múltiples interacciones no covalentes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , e interacciones de van der Waals) entre los bloques de construcción a escala molecular les permite autoensamblarse en polímeros supramoleculares, originando las denominadas fibrillas.

---

<sup>9</sup> Ball, P. *H<sub>2</sub>O: A Biography of Water*, 1999, Weidenfeld and Nicholson, London.

<sup>10</sup> *Water: A Comprehensive Treatise* Vol. 1-7; 1982, Franks, R.; ed.; Plenum Press, New York.

- Las fibrillas a menudo luego se ensamblan en haces a nanoescala, denominados fibras
- Las fibras se enredan e interactúan entre sí para formar una red sólida, que abarca la muestra y sustenta el gel macroscópico.

Dada la naturaleza no covalente de las redes fibrilares formadas, los geles moleculares son generalmente reversibles térmicamente.

Podemos hacer las siguientes afirmaciones generales sobre una molécula gelificadora típica<sup>11</sup>.

- La molécula debe ser parcialmente soluble en el disolvente.
- La molécula debe tener el potencial de formar interacciones intermoleculares, como enlaces de H, interacciones electrostáticas...
- Las interacciones no covalentes deben ser direccionales, llevando al ensamblaje de fibras anisotrópicas a nanoescala<sup>12</sup>.

Por esta razón, a menudo los LMWG son moléculas quirales. La mayoría de los LMWG contienen más de un centro estereogénico, por lo que pueden existir bajo varios estereoisómeros, que generalmente muestran comportamientos de gelificación completamente diferentes. La disposición espacial de diferentes diastereoisómeros afecta fuertemente su posibilidad de formar interacciones débiles, como enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  e interacciones de Van der Waals. Por lo tanto, cambiar la configuración de un solo estereocentro puede tener efectos dramáticos en las propiedades de solubilidad, la gama de disolventes que pueden ser gelificados, la

---

<sup>11</sup> D. K. Smith, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 684–694.

<sup>12</sup> A. Aggeli, I. A. Nyrkova, M. Bell, R. Harding, L. Carrick, T. C. B. McLeish, A. N. Semenov and N. Boden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2001**, *98*, 11857–11862.

rigidez de los geles que forma, su concentración crítica de gelificación y la temperatura a que funden los geles.

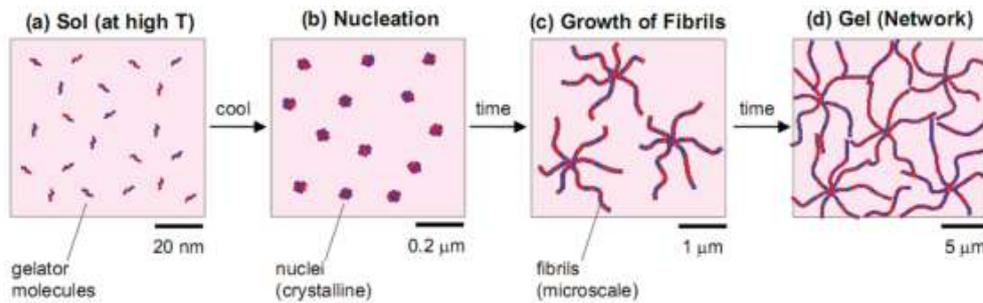
Una característica importante para la formación de hidrogeles a partir de LMWG es el control del pH. La formación de las fibrillas iniciales que conducen a la formación del gel puede estar profundamente influenciada por el pH. Por ejemplo Pochan, Schneider y colaboradores describieron el diseño y caracterización de un péptido de 20 aminoácidos (MAX1) que es capaz de sufrir una hidrogelación activada.<sup>13</sup> La secuencia principal de MAX1 contiene 20 aminoácidos, 8 de los cuales son residuos de lisina y 9 de ellos son residuos de valina. Cuando se disuelve en disoluciones acuosas de baja fuerza iónica a pH 9 y temperaturas inferiores de 20°C, el péptido permanece plegado. Cuando MAX1 es disuelto en un tampón de pH 9 de baja fuerza iónica, es capaz de sufrir un plegado y un autoensamblaje inducidos por la temperatura debido a la formación de una estructura de hoja  $\beta$ . Un comportamiento similar puede ser encontrado para LMWG, que contiene grupos amino o carboxi.<sup>4</sup>

### 1.1.3. Mecanismos de formación de geles moleculares

La **Figura 2** representa la formación de un gel molecular por el mecanismo que se puede denominar "convencional". Para empezar, el gelificante mediante calentamiento en el disolvente elegido da lugar a una disolución de baja viscosidad (**Figura 2a**). Cuando la disolución se enfría por debajo de la temperatura de sobresaturación surgen núcleos nano- o micrométricos (**Figura 2b**). Con el tiempo, estos núcleos crecen en fibrillas rectas o ramificadas (**Figura 2c**), y la superposición o entrelazamiento de estas fibrillas finalmente conduce a la gelificación (**Figura 2d**).

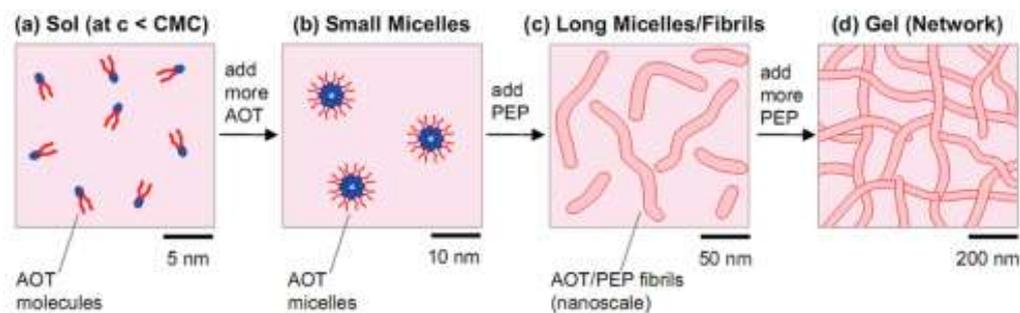
---

<sup>13</sup> K. Rajagopal, M. S. Lamm, L. A. Haines-Butterick, D. J. Pochan and J. P. Schneider, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2619–2625.



**Figura 2.** Esquema del mecanismo “convencional” de formación de un gel molecular<sup>14</sup>.

Por otro lado, la formación de geles puede tener lugar mediante un mecanismo que implique la formación de micelas, como el que se muestra en la **Figura 3**. Hay que tener en cuenta que la generación de micelas y su transformación en fibras está impulsada por la termodinámica (minimización de la energía libre) y no es similar a la nucleación y crecimiento nombrados anteriormente. La longitud media de las fibrillas depende únicamente de la concentración y de la temperatura y no depende de la forma en que la muestra es preparada o si una muestra caliente es enfriada lentamente o rápidamente. A altas concentraciones del aditivo, las fibrillas solapan y/o entrelazan para formar un gel, **Figura 3d**.



**Figura 3.** Esquema del mecanismo de formación de un gel molecular a partir de surfactantes. Se toma como ejemplo el sistema AOT/PEP que genera micelas inversas en isooctano. (AOT: bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio; PEP: *p*-etilfenol).

<sup>14</sup>Raghavan, S. R. (2009). Distinct character of surfactant gels: A smooth progression from micelles to fibrillar networks. *Langmuir*, 25(15), 8382–8385.

En este trabajo se estudia la formación de geles por moléculas que tienen, una estructura anfifílica y que, a priori pueden dar lugar a un mecanismo de gelificación similar al de la **Figura 3**. Muchos hidrogelificantes son anfifílicos, es decir, tienen una porción que es hidrofílica o polar (por ejemplo, capaz de formar enlaces de hidrógeno) y otra porción que es considerablemente hidrofóbica o apolar.<sup>15,16</sup> Conviene recordar que se definen como surfactantes aquellas moléculas con un grupo de cabeza hidrofílico y una o dos colas hidrofóbicas que tienen la siguiente propiedad clave: cuando se añade el agua a concentraciones por encima de su concentración micelar crítica (cmc), los surfactantes formarán micelas o vesículas.<sup>17,18,19</sup>

#### 1.1.4. Caracterización de geles

La inversión de tubo es una de las técnicas principales para la caracterización de los gelificantes. Como se observa en la **Figura 4**, la prueba de diagnóstico más común de gelificación es colocar boca abajo el recipiente que contiene la muestra y luego observar si la muestra fluye por su propio peso.<sup>20</sup>

---

<sup>15</sup>Terech, P.; Weiss, R. G. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3133.

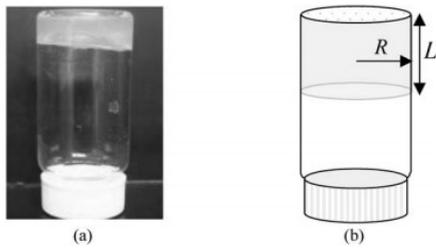
<sup>16</sup>Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201.

<sup>17</sup>Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: San Diego, **1991**.

<sup>18</sup>Jonsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solutions*; Wiley: New York, **1998**.

<sup>19</sup>Evans, D. F.; Wennerstrom, H. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet*; Wiley-VCH: New York, **2001**.

<sup>20</sup>Raghavan, S. R.; Cipriano, B. H. In *Molecular Gels: Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks*; Weiss, R. G., Terech, P., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, **2006**, p 241-252.



**Figura 4.** Test de inversión por el cual gel se queda inmóvil de forma correcta

Se asume que un gel no fluirá, mientras que una muestra viscosa pero inelástica (sol) mostrará un flujo apreciable. La simplicidad de esta prueba la convierte en el método de elección en estudios de comportamiento de fase con geles moleculares.

Siendo más rigurosos, en la prueba de inversión del tubo, si el material no fluye, hay un equilibrio estático de manera que el denominado límite elástico del material estudiado,  $\sigma_y$ , es igual o superior al esfuerzo gravitacional, tal y como se muestra en la ecuación siguiente, donde  $\rho$  es la densidad,  $g$  la aceleración de la gravedad y  $L$  la altura del material.

$$\text{Condición para que el material no fluya en el test de inversión: } \sigma_y \geq \rho g L$$

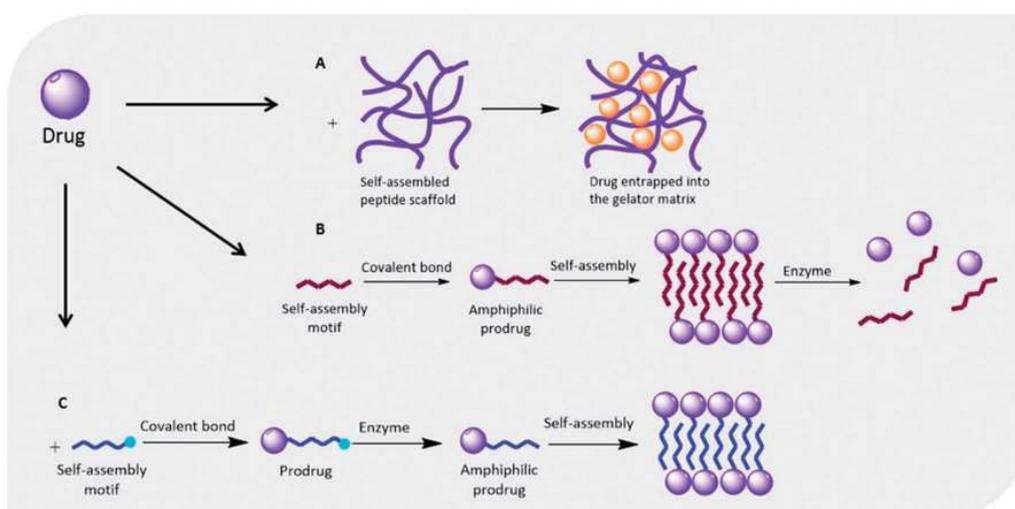
Cabe recordar que cuando se utiliza la prueba de inversión de vial es crucial utilizar la misma masa de muestra y tipo de vial (geometría y tamaño).

#### **1.1.5. Aplicación de los geles moleculares en liberación de fármacos**

El desarrollo de nuevos métodos de administración de fármacos es fundamental para mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos que están limitados por la escasa solubilidad, la baja biodisponibilidad y la corta vida media en plasma. Muchas estrategias han sido investigadas y usadas para superar estos problemas, incluyendo la

formulación de fármacos con sistemas de administración tales como liposomas, micelas, emulsiones y polímeros.

Una de estas estrategias de administración de fármacos involucra organogeles e hidrogeles basados en polímeros, que se han utilizado durante la última década como un método para controlar la liberación de fármacos.<sup>21,22,23,24</sup> En los últimos años, los geles moleculares han surgido como una alternativa a los geles poliméricos debido a propiedades como biodegradabilidad y baja toxicidad. Actualmente existen tres estrategias para la administración de fármacos utilizando geles moleculares (**Figura 5**).



**Figura 5.** Geles moleculares en liberación de fármacos. **(A)** El compuesto está físicamente atrapado dentro de la matriz gelificante (“andamio”) y es liberado del gel por difusión. **(B)** El fármaco puede ser covalentemente conjugado a un grupo funcional, induciendo anfifilicidad, que luego puede autoensamblarse *in situ* y liberar el fármaco mediante degradación enzimática. **(C)** Un conector funcionalizado puede

<sup>21</sup>A. Vintiloiu and J.-C. Leroux, *J. Controlled Release*, **2008**, *125*, 179–192.

<sup>22</sup>F. Ganji and E. Vasheghani-Farahani, *Iran. Polym. J.*, **2009**, *18*, 63–88.

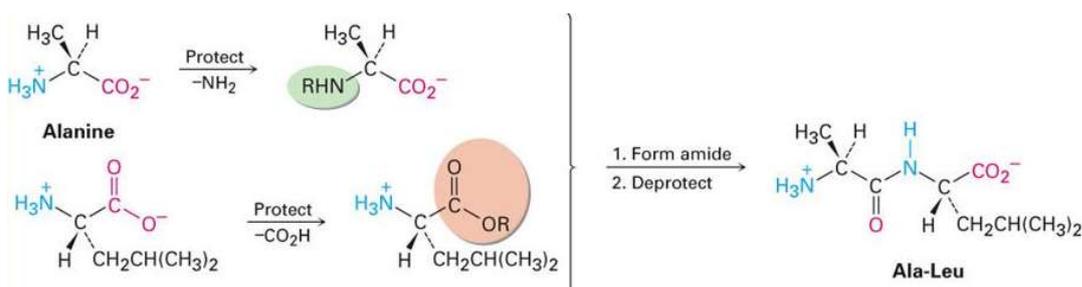
<sup>23</sup>R. V. Ulijn, N. Bibi, V. Jayawarna, P. D. Thornton, S. J. Todd, R. J. Mart, A. M. Smith and J. E. Gough, *Mater. Today*, **2007**, *10*, 40–48.

<sup>24</sup>S. Amin, S. Rajabnezhad and K. Kohli, *Mater. Today*, **2009**, *4*, 1175–1183.

ser covalentemente conjugado con un agente terapéutico, después de la escisión enzimática de parte del conector, el profármaco anfifílico puede autoensamblarse.<sup>25</sup>

## 1.2. Formación del enlace peptídico en síntesis orgánica.

En la síntesis de péptidos y compuestos derivados de aminoácidos se requieren reactivos, catalizadores específicos y grupos protectores apropiados. De esta manera se evita la formación de enlaces no deseados y reacciones secundarias.<sup>26,27</sup>



**Figura 6.** Esquema de formación de un dipéptido usando grupos protectores

<sup>25</sup>P. K. Vemula, N. Wiradharm, J. A. Ankrum, O. R. Miranda, G. John and J. M. Karp, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2013**, DOI: 10.1016/j.copbio.2013.02.006.

<sup>26</sup>Green, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley and Sons: New York, **1999**

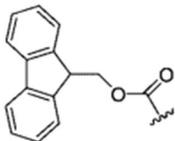
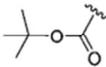
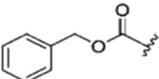
<sup>27</sup>Kocienski, P. J. *Protecting Groups*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, **2004**

### **1.2.1. Protección del grupo amino**

La protección de la funcionalidad de los grupos  $\alpha$ -amino en los aminoácidos es uno de los asuntos más importantes en la química de los péptidos y es obligatoria para prevenir la polimerización del aminoácido una vez activado.

Debido a que la mayoría de la síntesis de péptidos, tanto en solución como en fase sólida, son llevadas a cabo en la dirección C-terminal a N-terminal, los grupos  $\alpha$ -amino protectores (grupos temporalmente protectores) son eliminados varias veces durante la síntesis. Por ello, su eliminación debe realizarse en condiciones suaves que no afecten a los grupos protectores restantes o a la cadena peptídica.

Idealmente, un grupo protector de  $\alpha$ -amino debe conferir solubilidad en los disolventes más comunes y prevenir o minimizar la epimerización durante el acoplamiento. Su eliminación debe ser rápida, eficiente y libre de reacciones secundarias. Adicionalmente, los subproductos deberían ser eliminados fácilmente. Otras características deseadas de los aminoácidos N-protectidos es que sean sólidos cristalinos y estables, lo que facilita su manipulación.

Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of
<b>9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)</b> 	1) 20% piperidine-DMF 2) 1-5% DBU-DMF (See also $\alpha$ -amino )	Boc, Z, <sup>a</sup> Trt Alloc, pNZ <sup>a</sup>
Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of
<b>tert-Butyloxycarbonyl (Boc)</b> 	1) 25-50% TFA-DCM 2) 4 M HCl in dioxane 3) 2 M MeSO <sub>3</sub> H in dioxane 4) 1 M TMS-Cl, 1 M phenol-DCM	Fmoc, Z, <sup>a</sup> Trt, Alloc, pNZ
Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of
<b>Benzoyloxycarbonyl (Z)</b> 	1) H <sub>2</sub> cat 2) Strong acids such as: HBr in AcOH, TFA at high temperatures, TFA-thioanisole or liquid HF 3) BBr <sub>3</sub>	Boc, Fmoc, Trt, Alloc, pNZ <sup>a</sup>

**Figura 7.** Algunos grupos N-protectores comúnmente empleados en síntesis de péptidos.<sup>28</sup>

Los grupos protectores de  $\alpha$ -amino más comunes para la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) son los grupos 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) y el terc-butiloxycarbonilo (Boc). Para la síntesis disolución, otros grupos protectores del  $\alpha$ -amino usados son el Z, el Nps (2-nitrofenilsulfenilo) y Bpoc [2-(4-bifenil)isopropoxycarbonilo] en combinación con la protección de la cadena lateral tipo Bn.

<sup>28</sup>Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.

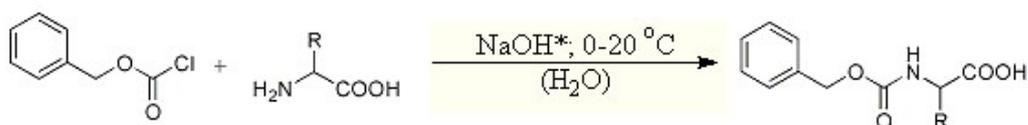
El primer grupo protector “moderno” fue el benciloxycarbonilo (Z) desarrollado por Bergmann y Zervas<sup>29</sup>. Es uno de los grupos protectores  $\alpha$ -amino más ampliamente utilizados para la síntesis de péptidos en solución debido a:

-La fácil preparación de los aminoácidos protegidos con Z

-La alta estabilidad de los aminoácidos y los péptidos protegidos, que son estables a los tratamientos con bases y ácidos suaves (estabilidad a la eliminación del Boc)

-Las condiciones de eliminación versátiles: mediante hidrogenólisis catalítica durante el alargamiento de la cadena o por ácidos fuertes (HBr en ácido acético<sup>30</sup>, TFA a elevadas temperaturas<sup>31</sup>, TFA-tioanisol<sup>32</sup>, HF líquido<sup>33</sup>, BBr<sub>3</sub><sup>34</sup>) en la desprotección final del péptido

-La supresión de la racemización durante la formación del enlace peptídico<sup>35</sup>.



**Figura 8.** Protección de grupos amino en los aminoácidos con el grupo Z.<sup>36</sup>

<sup>29</sup>Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **1932**, *65B*, 1192.

<sup>30</sup>Ben-Ishai, D.; Berger, A. *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1564.

<sup>31</sup>Mitchell, A. R.; Merrifield, R. B. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2015.

<sup>32</sup>Kiso, Y.; Ukawa, K.; Akita, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, *3*, 101.

<sup>33</sup>Sakakibara, S.; Shimonishi, Y.; Kishida, Y.; Okada, M.; Sugihara, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2164.

<sup>34</sup>Felix, A. M. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1427.

<sup>35</sup>Podlech, J.; Gurrath, M.; Müller, G.; Lohof, E. Protection of the R-Amino Group. *In Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl E22a: Methods of Organic Chemistry)*; Goodman, M., Felix, A. M., Moroder, L., Toniolo, C., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart and New York, **2002**; pp 41-165.

### 1.2.2. Activación del grupo carboxilo.

#### Ésteres activos

De modo general, existen tres estrategias para formar enlaces peptídicos en el laboratorio.<sup>37</sup>

(1) El reactivo acilante es formado previamente a la adición de la amina.

(2) El reactivo acilante es formado, aislado y purificado antes de reaccionar con la amina.

(3) El reactivo acilante es generado *in situ* en presencia de un grupo amino mediante la adición del agente activador a una mezcla de los 2 reactivos.

La formación de enlaces amida en este trabajo, utilizando ésteres activos<sup>38</sup> de N-hidroxisuccinimida, corresponde a la segunda estrategia anterior.

La aminólisis de ésteres se utilizó en los albores de la síntesis de péptidos en el laboratorio, utilizando ésteres con grupo saliente ariloxi. La capacidad de grupo saliente del grupo ariloxi es el factor más importante en la reactividad de dichos grupos éster.

Algunos ésteres activos de uso en formación de enlaces amida son ilustrados en la **Figura 9**. A menudo son materiales cristalinos estables y son preparados mediante acoplamiento mediados por DCC (véase apartado siguiente) o por métodos de

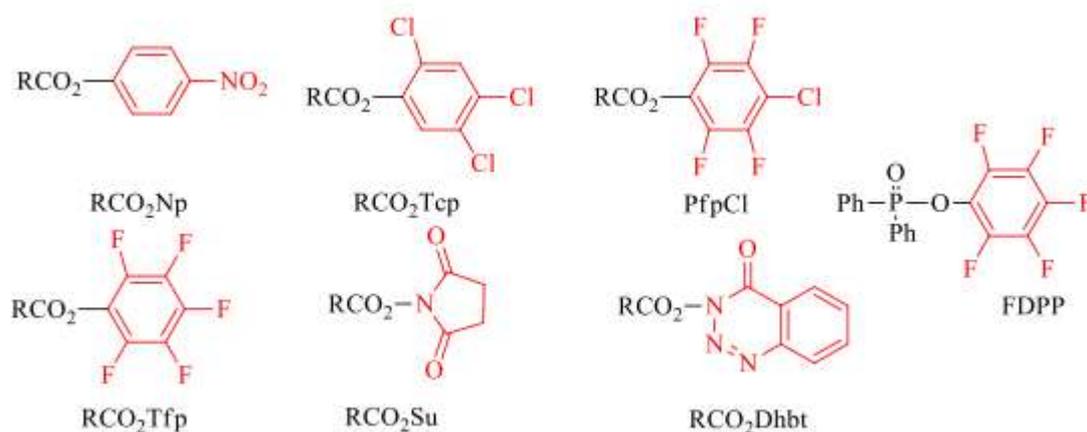
---

<sup>36</sup>Bergmann M. et al., *Ber.*, **1932**, 65, 1192; 66, 1288. Bergmann M., Zervas L., Ross W., *J. Biol. Chem.*, **1935**, 3, 245. Springall H. D., Law H. D., *Quart. Rev. (London)*, **1956**, 10, 234

<sup>37</sup>Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.

<sup>38</sup>Madeleine M.Joullié, Kenneth M.Lassen "Evolution of amide bond formation", *ARKIVOC* **2010**, n°(viii) pp 198-199. ISSN 1551-7012

anhídrido mixto. Los ésteres activos tienen un nivel de activación más bajo que algunos otros derivados de ácido como los cloruros, produciendo menos reacciones secundarias durante el acoplamiento, incluyendo la racemización. Particularmente, los ésteres de N-hidroxisuccinimida son altamente reactivos y se purifican fácilmente. Además, reaccionan limpiamente y rápidamente para formar amidas, liberando N-hidroxisuccinimida que se elimina fácilmente debido a que es soluble en agua.



**Figura 9.** Algunos ésteres activos y sus respectivas abreviaturas

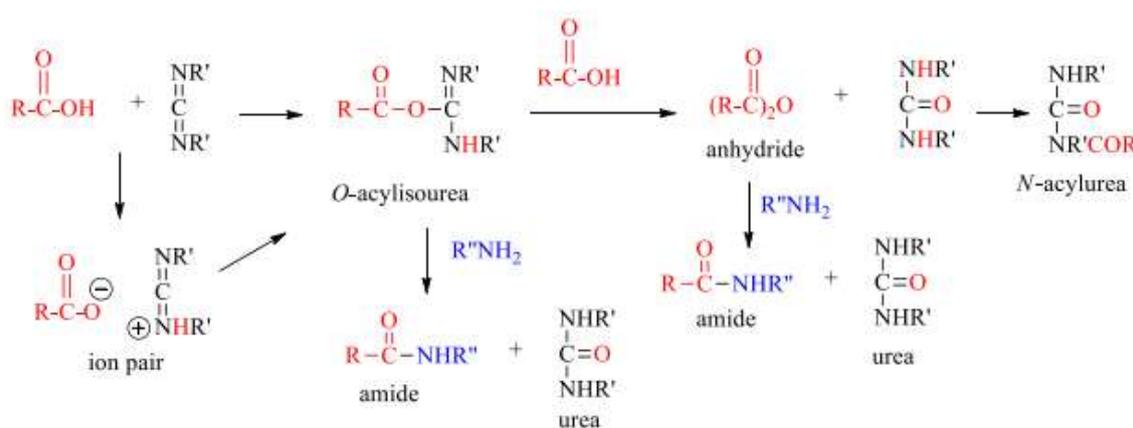
### Carbodiimidias<sup>39</sup>

La dicitohexilcarbodiimida ha sido el reactivo más importante para activar grupos carboxilo en la síntesis de péptidos durante más de 50 años.<sup>40</sup>El paso inicial del

<sup>39</sup> Madeleine M.Joullié, Kenneth M.Lassen "Evolution of amide bond formation", *ARKIVOC* **2010**, n°(viii) pp 210,211,213-214. ISSN 1551-7012

<sup>40</sup>Sheehan, J. C.; Hess, G., *P. J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067

mecanismo de activación es la adición del grupo carboxilo a la función carbodiimida para proporcionar una O-acilisourea, un agente acilante reactivo. El acoplamiento directo implica mezclar cantidades equimolares de la amina, el ácido carboxílico y dicitlohexilcarbodiimida en un disolvente orgánico. La formación de O-acilisourea es rápida y posteriormente reacciona con la amina para formar un enlace peptídico y dicitlohexilurea, que precipita inmediatamente (**Figura 10**)



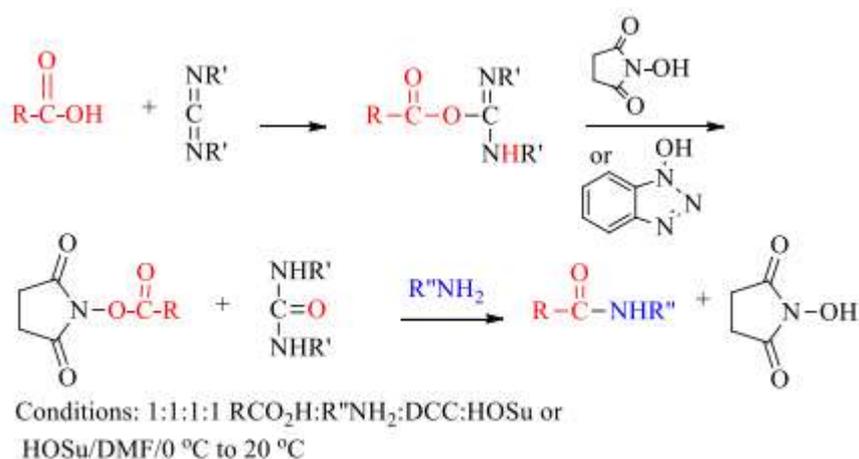
**Figura 10.** Activación de ácidos carboxílicos por carbodiimidas

Dado que la mayoría de las dialquilureas son escasamente solubles, sus separaciones son relativamente sencillas. La reactividad elevada de la O-acilurea hace que pueda intervenir en reacciones secundarias, especialmente si se retrasa la reacción con la amina. Por ejemplo, el colapso por la transferencia de acilo intramolecular puede competir con la reacción con la amina generando una N-acilurea, que reduce el rendimiento y dificulta la purificación. La reacción de transposición puede ocurrir rápidamente cuando el disolvente es DMF (**Figura 11**).



**Figura 11.** Transferencia intramolecular de acilo

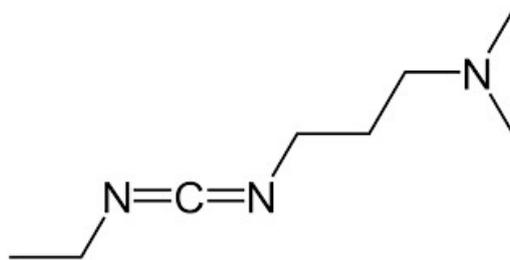
La racemización puede ser controlada por la rápida adición de la amina a la O-acilisourea antes de ocurrir reacciones secundarias. También se puede rebajar la reactividad de la O-acilisourea mediante la formación de especies intermedias por reacción con nucleófilos como como la N-hidroxisuccinimida o el 1-hidroxibenzotriazol (Figura 12)



**Figura 12.** Control de la racemización mediante la adición de N-hidroxisuccinimida

En ocasiones es difícil eliminar completamente la dicitohexilurea formada como subproducto. Por ello, hay otras carbodiimidas comercialmente disponibles la N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, más conocido como EDCI o EDC. La urea formada

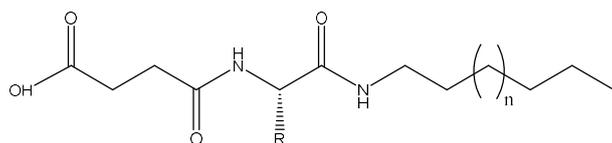
puede separarse del producto peptídico protegido mediante una extracción en fase acuosa ácida.



**Figura 13.** Estructura de la EDCI

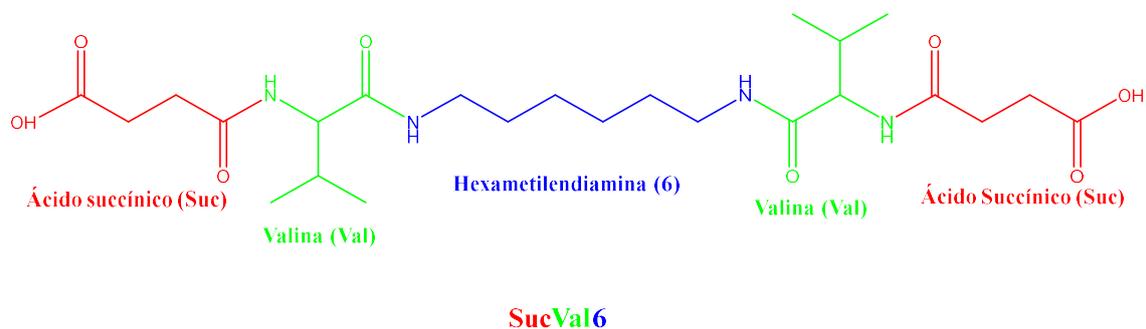
## 2. Objetivos

En el grupo en el que se ha realizado este trabajo se ha estudiado previamente la formación de geles, tanto en disolventes orgánicos como en agua, por moléculas anfifílicas con la estructura general que se muestra a continuación.<sup>41</sup>



En este trabajo se tiene como objetivo general preparar y estudiar moléculas bolaanfifílicas, es decir con extremos polares y un interior hidrofóbico.

**Objetivo 1:** Sintetizar y caracterizarla molécula denominada de modo abreviado SucVal6.



**Objetivo 2:** Estudiar la formación de geles moleculares de SucVal6 en medios acuosos y orgánicos.

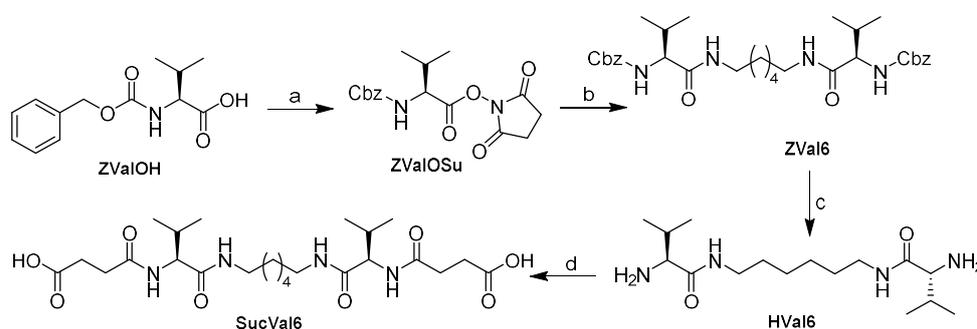
<sup>41</sup>Angulo-Pachon, C. A.; Miravet, J. F. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 5398-5401.



### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Síntesis

La síntesis total del compuesto SucVal6 realizada en este trabajo de fin de máster se indica en el **Esquema 1**. Así, la formación de los enlaces de amida (paso a) está basada en la activación del residuo ácido de la N-carbobencilo-L-valina (ZValOH, comercialmente disponible) en forma de éster.

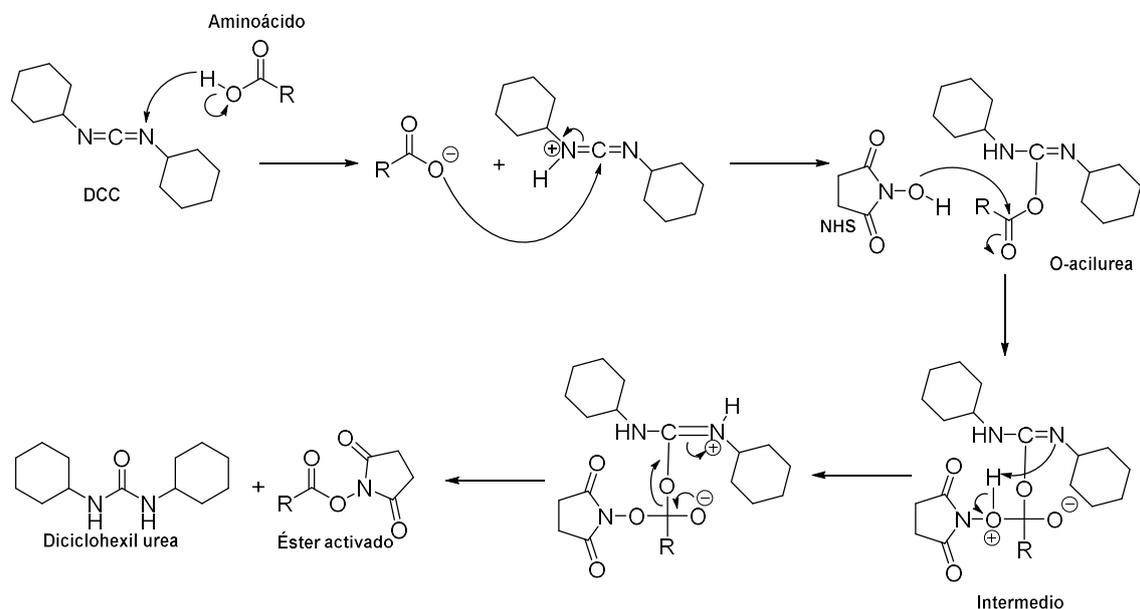


**Esquema 1** Reactivos y condiciones: a) DCC, N-hidroxisuccinimida, THF, 0 °C, 1 h, 83 %; b) 1,6-hexildiamina, THF, overnight, 50 °C, 85%; c) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 2 h, >90%; d) Anhídrido succínico, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, 16 h, 70 %.

Para la formación de éster activado (ZValOSu) se utilizó el método descrito por Sheehan y Hess en 1955,<sup>42</sup> en donde se usan como reactivos la diciclohexilcarbodiimida (DCC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Como se puede observar en el mecanismo representado en el **Esquema 2**, la reacción procede con la desprotonación del ácido seguido por el ataque nucleofílico del carboxilato a la DCC protonada, formándose una O-acilurea altamente reactiva. Ésta reacciona con la NHS dando a lugar un intermedio inestable que transfiere un protón lo que provoca la formación del éster activado y diciclohexilurea como subproducto, que precipita en el

<sup>42</sup>John C. Sheehan and George P. Hess. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067–1068.

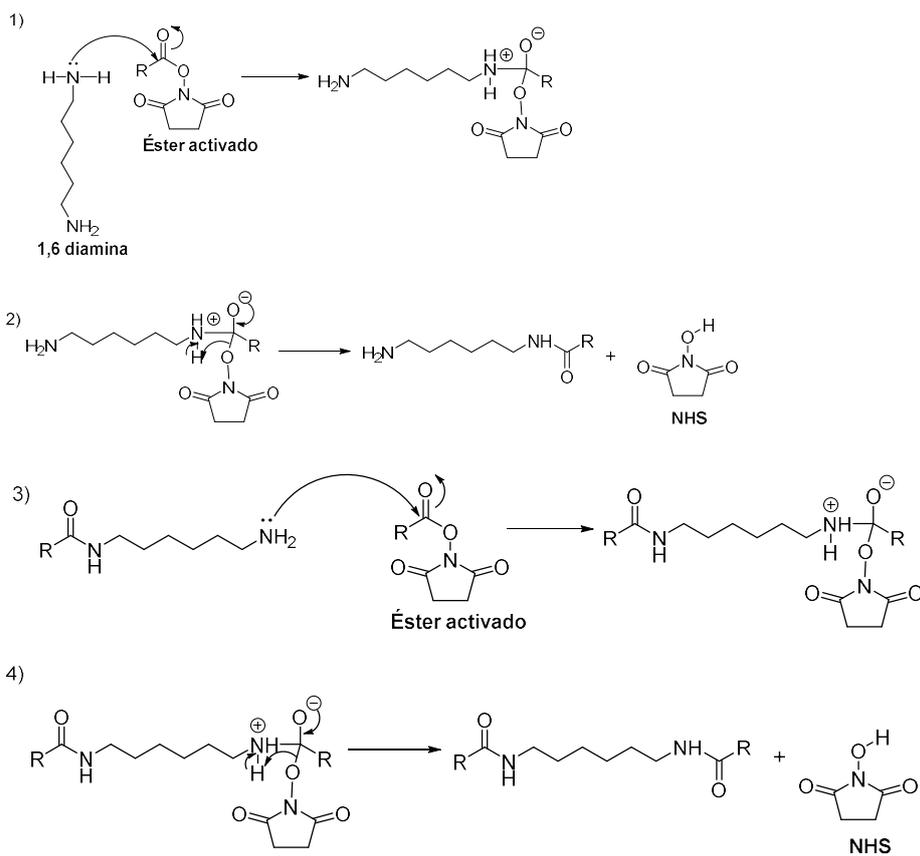
medio de la reacción y se puede separar fácilmente por filtración a vacío. El éster activado crudo se purifica por recristalización en isopropanol. Se obtuvo un rendimiento del 83 %



**Esquema 2** Mecanismo de reacción para la activación de un ácido usando DCC y NHS.

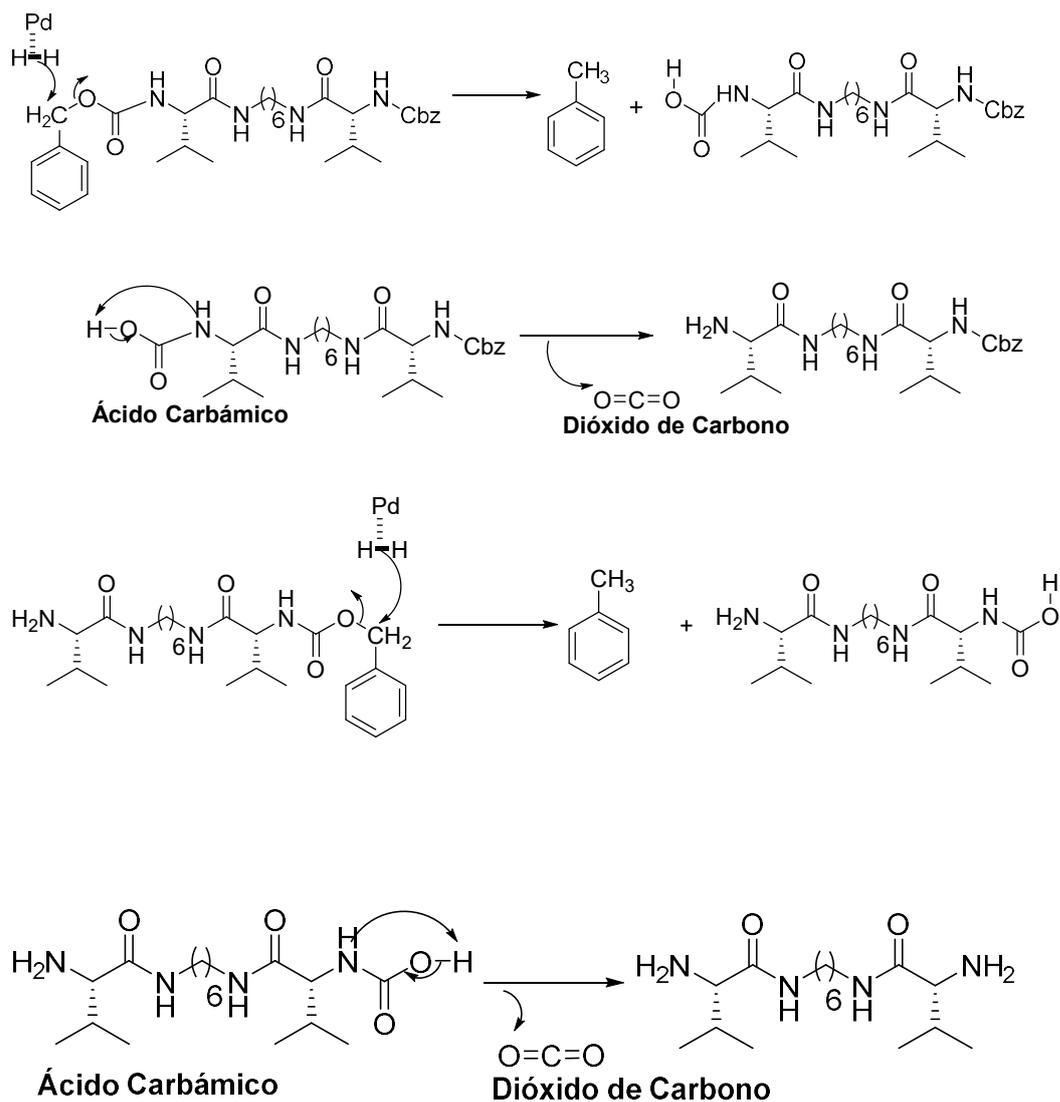
Para la formación de la bisamida protegida (ZVal6), se produce un acoplamiento entre el éster activado y la amina en un disolvente no hidroxílico como el tetrahidrofurano (THF).

En el **Esquema 3** se muestra el mecanismo correspondiente a la acilación del 1,6 diamina con un éster activado del N protegido de la valina.



**Esquema 3** Mecanismo de reacción para la formación de bisamida usando 1,6-hexildiamina y THF como disolvente.

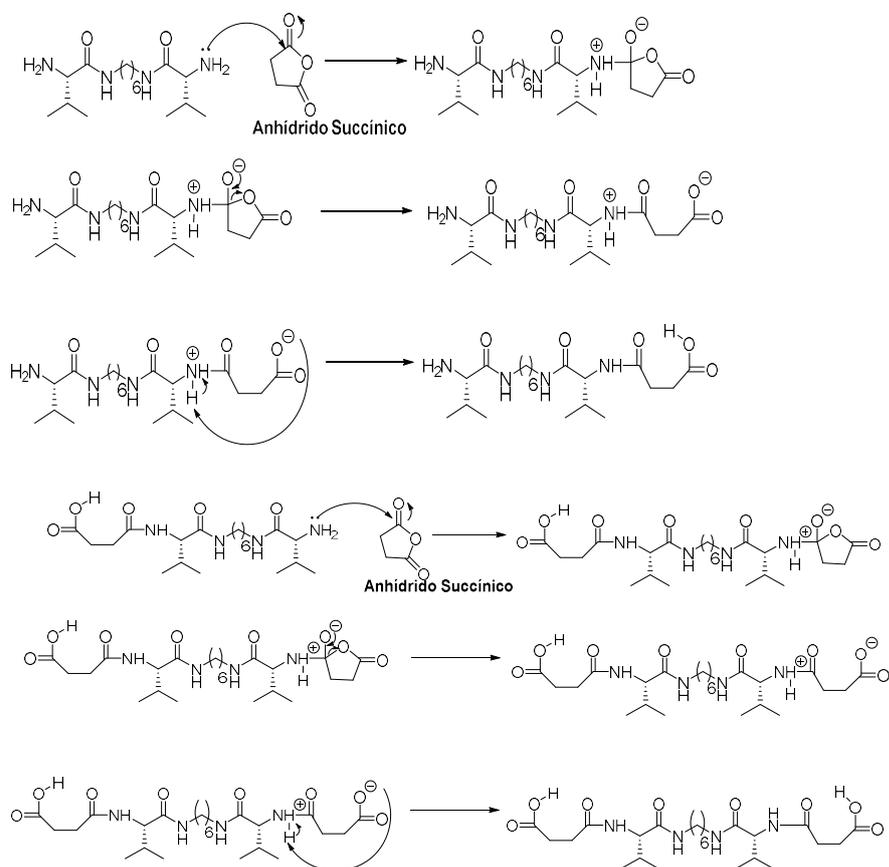
El mecanismo correspondiente a la desprotección del grupo carbobenciloxi (grupo Cbz ó Z) (reacción c), se muestra en el **Esquema 4**. El compuesto desprotegido, HVal6, se obtiene mediante una hidrogenólisis catalítica en presencia de paladio como catalizador y MeOH como disolvente.



**Esquema 4** Mecanismo de reacción de la doble desprotección del grupo amina usando hidrógeno/paladio y metanol como disolvente.

Por último, tenemos en el **Esquema 5** una reacción por el cual la amina primaria  $1^\circ$  actúa como nucleófilo, mientras que el anhídrido succínico como un electrófilo. En la serie de derivados de carbonilo y carboxilo, un anhídrido se clasifica como un elemento bastante reactivo: más que los aldehídos y las cetonas, pero menos los cloruros de ácido. Por lo tanto, el primer paso es un ataque nucleofílico en el sistema  $\pi$

carbonílico C=O a través de un intermedio tetraédrico, que al recuperar el carbonilo expulsa un carboxilato como grupo saliente, dando lugar al enlace amida.



**Esquema 5** Mecanismo de reacción de la acilación de la diamina para formar el producto correspondiente en presencia de anhídrido succínico.

### 3.2. Ensayos de Gelificación

Se realizó en primer lugar un estudio de la formación de geles de SucVal6 en disolventes orgánicos de diferente polaridad. Se utilizó el método de calentamiento-enfriamiento (calentar hasta disolución y enfriar durante 10 min). Los resultados seleccionados son mostrados en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Ensayos de gelificación en disolventes orgánicos.

A una concentración de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , un valor usual para formar geles con este tipo de moléculas, se observó que, de la serie de disolventes utilizados, solamente en etanol se consiguió una disolución al calentar. En los otros disolventes ensayados, acetonitrilo, dioxano, THF, acetato de etilo, cloroformo, tolueno y hexano, solamente se consiguió una disolución parcial. Al enfriar, como puedes observarse en la **Figura 14** se obtuvieron cristales en el caso de etanol mientras que en los demás disolventes queda una suspensión turbia con precipitado en el fondo del vial.

La formación de geles se estudió también en medios acuosos. Para ello se disolvió SucVal6 en medio básico (NaOH 0.1 M) y se añadió a continuación  $20 \mu\text{L}$  de HCl acuoso concentrado agitando el sistema brevemente para homogenizarlo. Se observó el sistema después de diez minutos de reposo. En este caso la formación de geles sí que fue exitosa. Se determinó la concentración mínima de gelación, c.m.g. Cuanto menor

es este valor más eficiente se considera el gelificante. En la **Tabla 1** se muestran los resultados y en las **Figuras15-17** pueden verse imágenes de los geles.

Se obtuvo una concentración mínima de gelificación en agua de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , realizando los ensayos en intervalos de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Se estudió si la fuerza iónica del medio podía influir en los resultados obtenidos. Para ello se utilizó como medio de gelificación disoluciones salinas con cloruro de sodio y bromuro de litio. Como puede verse en la **Tabla 1**, en estos medios salinos la c.m.g. disminuye. En el caso del medio con cloruro de sodio, al pasar de una concentración de 0.5 M a 1 M el valor de c.m.g. desciende de 5 a  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**Tabla 1:** Valores de c.m.g. para SucVal6 en  $\text{mg mL}^{-1}$  en diferentes medios salinos.

<b>Disolvente</b>	<b>c.m.g</b>
H <sub>2</sub> O	$5 \pm 0.5$
H <sub>2</sub> O/NaCl 1M	$4 \pm 0.5$
H <sub>2</sub> O/NaCl 0.5 M	$5 \pm 0.5$
H <sub>2</sub> O/LiBr 1M	$4 \pm 0.5$
H <sub>2</sub> O/LiBr 0.5 M	$4 \pm 0.5$

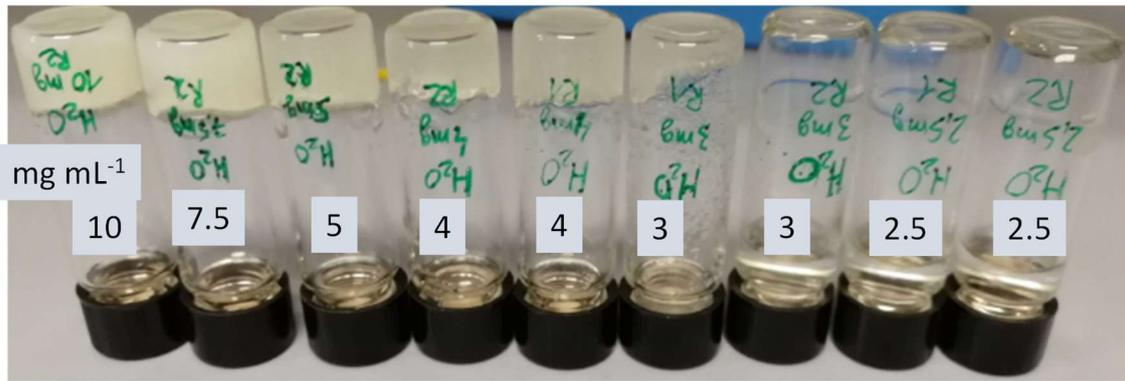


Figura 15. Geles formados en agua.

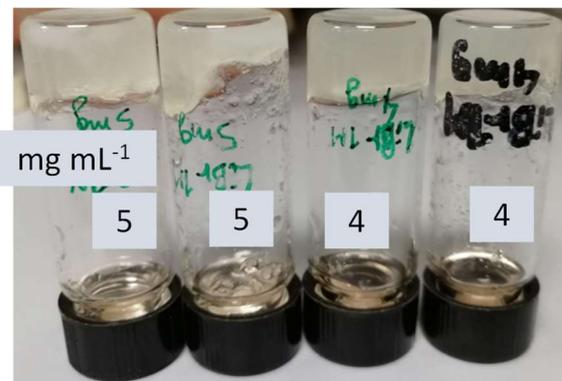


Figura 16. Geles formados en agua/LiBr.

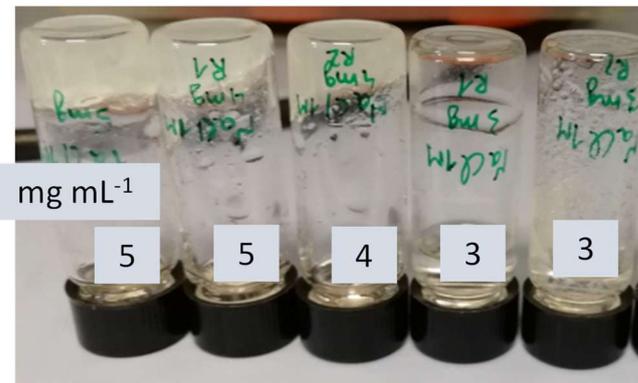


Figura 17. Geles formados en agua/NaCl.

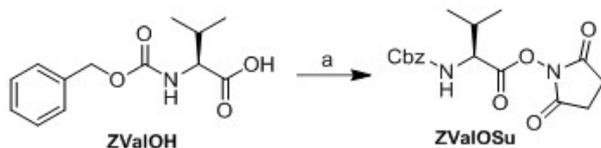
#### **4. Conclusiones**

- SucVal6 fue sintetizado, caracterizado y purificado con éxito
- SucVal6 no forma geles en los disolventes orgánicos estudiados, que incluyen un abanico amplio de polaridad.
- La concentración mínima de verificación de SucVal6 en medios acuosos fue determinada mediante el test de inversión de vial. Se obtuvieron valores en torno a 4-5 mg/mL, sin observarse diferencias relevantes por el aumento de la fuerza iónica con sales de litio o sodio.

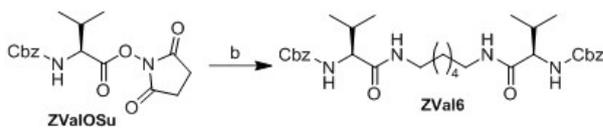


## 5. Parte experimental

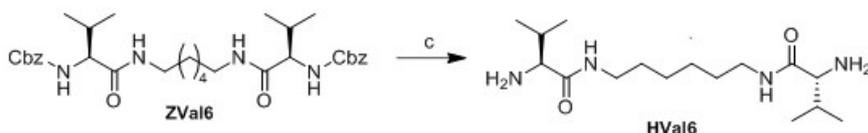
### 5.1. Síntesis de SucVal6



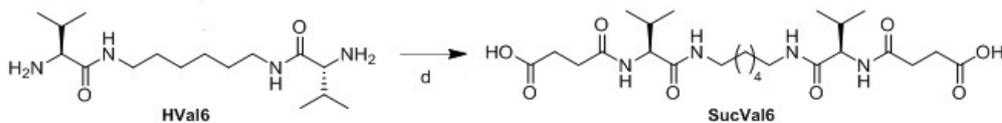
Se pesan 4,4g (37,3 mmol, 1eq) de N-hidroxisuccinimida y 9,4g de Z-(L)-Val (37,3 mmol) en un matraz redondo de 500 mL y se adicionan 100 mL de THF. Posteriormente, se coloca la disolución en un baño de hielo. Se disuelven 7,9 g de DCC (37,3 mmol, 1,01 eq) en 40mL de THF y se adiciona esta disolución gota a gota durante 1 hora al matraz redondo bajo atmósfera de nitrógeno. Seguidamente se deja la muestra tapada a aproximadamente 4 °C (frigorífico) durante toda la noche. A continuación, se separa por filtración la DCU formada. Se elimina el disolvente del filtrado en el rotavapor obteniéndose un sólido blanquecino, el cual es recristalizado dos veces de isopropanol (50 mL aproximadamente). Los cristales obtenidos se secan a 40 °C en un horno de vacío durante toda la noche. Se obtiene 10,74 g de Z-ValOSuc (30,8 mmol), correspondiendo a un rendimiento del 83%. El espectro de <sup>1</sup>H RMN coincide con el descrito previamente en el grupo.



Se ponen 21 mL de THF y 2,07 g de Z-ValOSu (5,74 mmol, 2eq) en un matraz de fondo redondo. A la disolución obtenida se le añaden lentamente 0,37 g (2,88 mmol, 1eq) de 1,6-hexildiamina bajo agitación. Se deja agitar a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno toda la noche. Se evapora el disolvente en el rotavapor y el residuo se suspende en 100 mL de HCl acuoso 1M, separando los productos insolubles por filtración. El filtrado se trata NaOH acuoso 1M hasta conseguir pH básico. Precipita un sólido blanco que se separa por filtración y se lava con agua fría. Tras secar toda la noche en vacío a 40 °C se obtiene Z-Val6 como un sólido blanco. 1.50 g (2,45 mmol), 85%. El espectro de <sup>1</sup>H RMN coincide con el descrito previamente en el grupo.



Se introducen en un matraz fondo redondo 1,50 g de Z-Val 6 (2,45 mmol) y 0.33 g de Pd/C junto 100 mL de CH<sub>3</sub>OH. Se desgasifica la muestra con ultrasonidos y se purga con nitrógeno gas. Se conecta un globo de látex lleno de hidrógeno a la muestra y se deja agitando toda la noche. La suspensión obtenida se filtra sobre tierra de diatomeas (Celite) para eliminar el carbón activo. Se elimina el disolvente de filtrado en el rotavapor y se deja secando a vacío el aceite obtenido durante toda la noche. Este aceite se utiliza directamente en la reacción siguiente.



El aceite/cera de HVal6 obtenido en el paso anterior se disuelve en un matraz de fondo redondo con 150 mL de THF. Se añaden 1,99 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2,45 mmol, 7,6 eq) y, gota a gota, una disolución de 1.00 g de ácido succínico (2,45 mmol, 4 eq) en 150 mL de THF. Se deja reaccionar toda la noche. Se elimina el disolvente en el rotavapor y se disuelve el residuo en 200 mL de agua. A la disolución obtenida se le adiciona lentamente HCl acuoso concentrado (37%). Se extrae ahora la suspensión obtenida con diclorometano (3 x 100) y se recogen las fases orgánicas que se secan con sulfato de sodio anhidro. Tras eliminar el disolvente en el rotavapor se obtiene el producto deseado, SucVal6 como un sólido blanco 0,885 g, (1,72 mmol), 70 %.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 12.15$  (brs, 2H), 7.8 (brm, 4H), 4.1 (dd,  $J=8.9, 7.0$  Hz, 2H), 3.1 (dt,  $J=13, 6.8$  Hz, 4H), 2.4 (m,  $J=4.8, 8$ Hz), 1.9 (m, 2H), 1.1-1.4 (m, 8H),  $\delta=0.8$  (dd,  $J=6.8$ Hz, 2.3Hz, 12H)

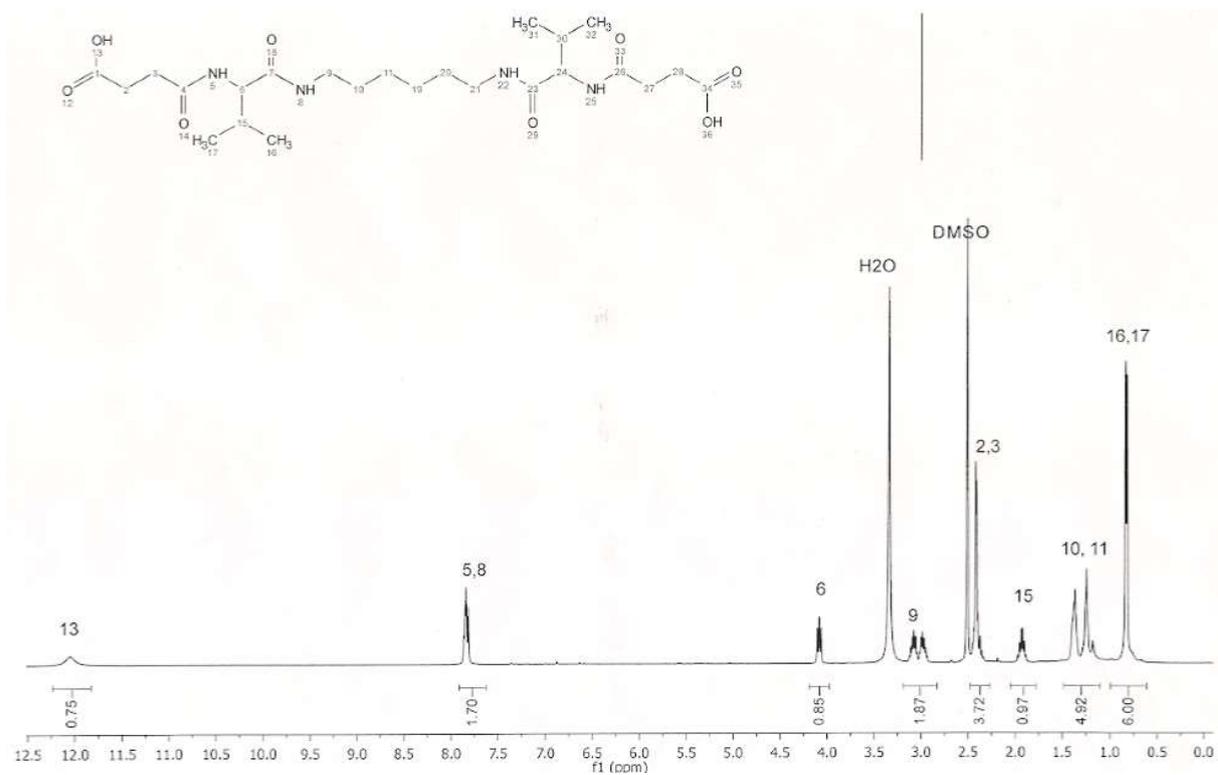
## 5.2. Preparación de geles

Para el caso de la gelificación en  $\text{H}_2\text{O}$  se colocan 10 mg de SucVal6 en un vial de 4mL con tapón PTFE. Se añade 1mL de NaOH 0.1M/ $\text{H}_2\text{O}$  y se sonica para homogenizar. Seguidamente se adicionan 20 $\mu\text{L}$  de HCl concentrado. Se agita y se sonica 1 min. Se deja reposar diez minutos y se comprueba la formación de gel mediante inversión de vial. En el caso de las muestras con disoluciones salinas conteniendo NaCl y LiBr el procedimiento es similar, utilizando el medio salino correspondiente para preparar la disolución de NaOH 0.1 M.

Para los disolventes orgánicos (EtOH, THF, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, hexano, tolueno, CH<sub>3</sub>CN y 1,4-dioxano) se pesan 10 mg de SucVal6 en el vial de 4mL con tapón PTFE. Se adiciona 1mL de cada disolvente orgánico y se sonica aproximadamente 1min. Se calienta con cuidado el vial cerrado usando una pistola de aire caliente a 200°C (decapadora) unos dos minutos. Se deja enfriar la disolución 10 minutos y se comprueba si gelifica.

## 6. Anexo

### 6.1. Espectro de $^1\text{H}$ RMN



**Figura 18:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto SucVal6