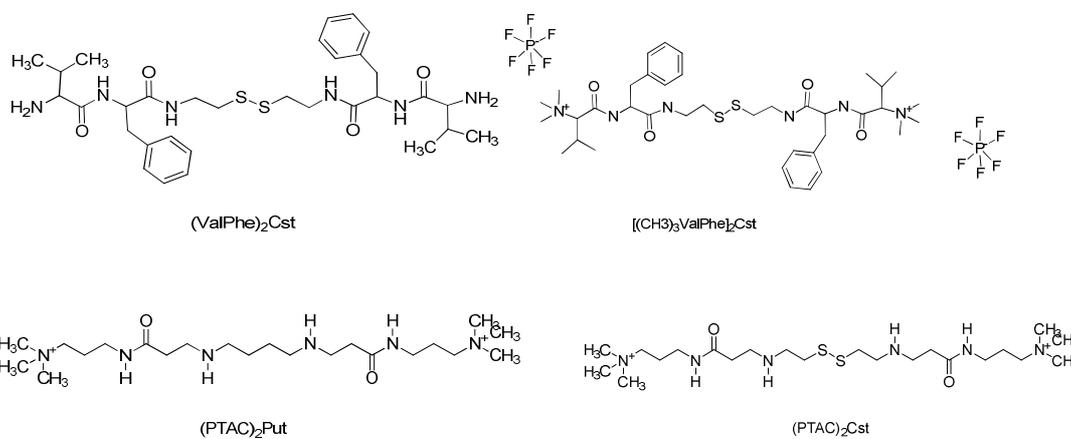


## PREPARACIÓN Y ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DE MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS CON GRUPOS TERMINALES TRIMETILAMONIO



MARÍA JOSÉ ARBELÁEZ CARDONA  
MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA  
TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER  
CASTELLÓN, OCTUBRE 2021



**Escuela superior de Tecnología y Ciencias Experimentales  
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica  
Grupo de Nanomateriales Moleculares Orgánicos con  
Aplicaciones Biomédicas**



**PREPARACIÓN Y ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN  
DE MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS CON  
GRUPOS TERMINALES TRIMETILAMONIO**

**MARIA JOSÉ ARBELÁEZ CARDONA  
MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA  
TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER  
CASTELLÓN, OCTUBRE 2021**



El Dr. Juan Felipe Miravet Celades, catedrático perteneciente al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón de la Plana,

## **CERTIFICA**

Que el trabajo fin de grado con el título **PREPARACIÓN Y ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DE MOLÉCULAS BOLAANFÍLICAS CON GRUPOS TERMINALES TRIMETILAMONIO** ha sido realizado por María José Arbeláez Cardona bajo su dirección, en el grupo de Nanomateriales Moleculares Orgánicos con Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón de la Plana.

Lo que certifico a los efectos oportunos en Castellón de la Plana a los 15 días del mes de octubre del año 2021.

Fdo. Dr. Juan F. Miravet Celades



## Agradecimientos

- Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Juan F. Miravet Celades por sus valiosas y constructivas sugerencias durante la planificación y desarrollo de este trabajo de investigación, por su disposición a dar su tiempo, también por su paciente orientación y su entusiasta aliento.
- Al concluir una etapa maravillosa de mi vida quiero extender un profundo agradecimiento a quienes hicieron posible este sueño, aquellos que junto a mí caminaron en todo momento y siempre fueron fuente de inspiración, apoyo y fortaleza. Esta mención en especial para DIOS, mis padres, mi hermana y mi sobrino. Muchas gracias a ustedes por demostrarme que siempre puedo cumplir mis sueños no importa que tan altos parezcan.
- Mi gratitud también a la Universidad Jaume I, al Banco Santander por la beca otorgada para la realización de mis estudios de máster, gracias a mis compañeros de laboratorio por su constante ayuda y a cada docente quienes con su apoyo y enseñanzas constituyen la base de mi vida profesional.
- Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a Yasmine, mi compañera de risas, estudios, mi consejera profesional y amiga incondicional, por estar siempre para mí y hacer que esta experiencia fuera maravillosa.
- Por último, a mis amigas de la beca quienes estuvieron en cada proceso y vivieron conmigo tan maravillosa experiencia.



## Abreviaturas

**ARN** Acido ribunocleico

**ATAC** (3-Acrylamidopropyl) trimethyl-ammoniumchloride

**ATP** Adenosintrifosfato

**Boc** Radical ter-butiloxicarbonil

**Bop** Benzotriazoliloxitris[dimetilamino] fosfonio

**CDM** Anhidrido carboxidimetil maleico

**CMC** Concentración critica micelar

**CN** Cinuro

**COSY** Correlation Spectroscopy

**Cst** Cistamina

**D<sub>2</sub>O** Agua deuterada

**DCC** N,N'-diciclohexilcarbodiimida

**DMF** N,N-dimetilformamida

**DMSO-d<sub>6</sub>** Dimetilsulfóxidodeuterado

**DMSO** Dimetilsulfoxido

**EDCI** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

**HMPA** Hexametilfosforamida

**NPs** Nanopartículas

**OSu** Radical N-oxisuccinimida

**PBS** Tampon fosfato salino

**Phe** Fenilalanina

**Put** Putrescina

**QAS** Sales de amonio cuaternario

**RMN** Resonancia magnética nuclear

**TFA** Ácido trifluoroacético

**THF** Tetrahidrofurano

**Val** Radical valina



# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introducción</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Actividad de las sales de amonio cuaternario (QAS) contra microorganismos.  | 1         |
| 1.1.1. Estructura química y propiedades de las sales de amonio cuaternario diméricas (“gemini”).   | 2         |
| 1.1.2. Actividad antimicrobiana de QAS de tipo dimérico.   | 2         |
| 1.2. La nano medicina contra la resistencia a los antibacterianos.   | 3         |
| 1.3. Breve introducción a química de protección y acoplamiento de aminoácidos.   | 5         |
| 1.4. Reacciones de adición conjugada.  | 8         |
| 1.5. Utilización de pireno como sonda para determinar concentraciones críticas de agregación.  | 9         |
| <b>2. Objetivos</b>  | <b>13</b> |
| <b>3. Resultados y discusión</b>   | <b>17</b> |
| 3.1. Síntesis de (ValPhe) <sub>2</sub> Cst y [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ValPhe] <sub>2</sub> Cst   | 17        |
| 3.2. Síntesis de (PTAC) <sub>2</sub> Put y (PTAC) <sub>2</sub> Cst   | 19        |
| 3.3. Síntesis de ácido 3-(trimetilamino) propiónico  | 23        |
| 3.4. Determinación de la concentración crítica micelar   | 24        |
| <b>4. Conclusiones</b>   | <b>33</b> |
| <b>5. Sección experimental</b>   | <b>37</b> |
| 5.1. Síntesis de Bromuro de ácido N-trimetil-3-aminopropionico (Acetonitrilo)  | 40        |
| 5.2. Síntesis de N,N,N-trimethyl-2-((3 (propylamino) propanoyl)oxy) ethanaminium   | 41        |
| 5.3. Síntesis de N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> ,N <sup>20</sup> ,N <sup>20</sup> -hexamethyl-5,16-dioxo-4,8,13,17-tetrazaicosane-1,20-diaminium                                 | 41        |
| 5.4. Síntesis de N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> ,N <sup>22</sup> ,N <sup>22</sup> ,N <sup>22</sup> -hexamethyl-5,18-dioxo-11,12-dithia-4,8,15,19-tetraazadocosane-1,22-diaminium | 42        |
| 5.5. Procedimiento de preparación muestras para fluorescencia  | 42        |
| <b>6. Bibliografía</b>   | <b>45</b> |
| <b>7. Anexos</b>   | <b>49</b> |
| 7.1. ESPECTROS RMN   | 49        |
| 7.2. COSY.   | 64        |
| 7.2.1. (PTAC) <sub>2</sub> Putrescina  | 65        |
| 7.2.2. (PTAC) <sub>2</sub> CISTAMINA   | 66        |



# **Introducción**

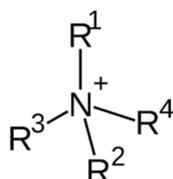


## 1. Introducción

Una de las potenciales aplicaciones de las moléculas que se describen en este trabajo es como agentes antibacterianos. Por ello, en esta introducción se comenta brevemente la utilización contra microorganismos de sales de amonio relacionadas con las moléculas preparadas en este proyecto. Asimismo, dichas moléculas forman nanopartículas catiónicas. Por esta razón en el punto 1.2 se describe la utilización de nanopartículas en general como bactericidas.

Adicionalmente, en los puntos 1.3-1.4 se hace un breve repaso tipos de reacciones que se utilizan en la preparación de los compuestos estudiados: N-protección de aminoácidos, acoplamiento peptídico y adición conjugada. Finalmente, en el apartado 1.5 se comenta brevemente la utilización del pireno como sonda fluorescente para evaluar concentraciones críticas de agregación, ya que este es un procedimiento que se emplea en el estudio de la agregación de las moléculas preparadas.

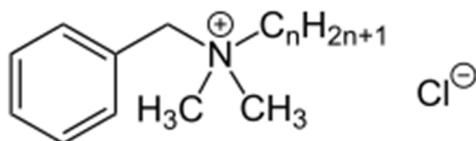
### 1.1. Actividad de las sales de amonio cuaternario (QAS) contra microorganismos.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Sal de amonio cuaternario

Las sales de amonio cuaternario (QAS es su abreviatura basada en el nombre en inglés: Quaternary ammonium salts) están compuestas por una parte hidrófila (catión amonio) y una parte hidrófoba, que consiste comúnmente en una cadena de alquilo de diversa longitud que determina la hidrofobicidad. Esta estructura permite la interacción de los tensioactivos catiónicos con la membrana celular de los microorganismos mediante la incorporación de su cadena hidrófoba en la bicapa lipídica de la membrana. Asimismo, pueden tener lugar interacciones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente.<sup>2</sup> Por otro lado, las QAS también puede causar inhibición o desnaturalización de las proteínas de la membrana celular. Por lo tanto, las QAS pueden ser bactericidas y fungicidas (contra las formas planctónicas y de biopelícula), esporostáticas y activas contra virus envueltos (VIH, VHB) y células tumorales, pero no afectan a los bacilos ácido-resistentes (tuberculosis) ni a la viabilidad de las esporas.

Un ejemplo conocido de QAS es el cloruro de benzalconio, cuya estructura se muestra en la Figura 2.<sup>3</sup>



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

**Figura 2.** Estructura química del cloruro de benzalconio

Cloruro de benzalconio, también conocido como n-alquilmetilbencil cloruro de amonio, es un nombre genérico que incluye derivados con diferentes cadenas alquílicas, siendo aquellas moléculas con 12 y 14 carbonos las que tienen mayor poder antibacteriano.

Debido a su actividad antimicrobiana, el cloruro de benzalconio es un ingrediente activo en muchos productos de consumo:

- Productos farmacéuticos como gotas o aerosoles para ojos, oídos y nasales, como conservante.
- Productos para el cuidado personal como desinfectantes para manos, toallitas húmedas, champús, jabones, desodorantes y cosméticos.
- Antisépticos para la piel y aerosoles para lavar heridas.
- Pastillas para la garganta y enjuagues bucales, como biosida
- Cremas espermicidas.
- Limpiadores para suelos y superficies duras como desinfectante, como los aerosoles y toallitas antibacterianas.
- Alguicidas para la limpieza de algas, musgos, líquenes de caminos, tejas, piscinas, mampostería, etc.

### **1.1.1. Estructura química y propiedades de las sales de amonio cuaternario diméricas (“gemini”).<sup>4</sup>**

Las sales de amonio cuaternario diméricas o “gemini” son compuestos formados por dos moléculas QAS monoméricas conectadas por un espaciador entre cabezas hidrófilas o colas hidrófobas. El efecto de los tensioactivos catiónicos diméricos sobre los microorganismos depende de la estructura química del compuesto: arquitectura de la cabeza hidrófila, longitud de la cadena hidrófoba, tipo de espaciador y contraión. Los tensioactivos diméricos con 10 y 12 carbonos dentro de las cadenas hidrofóbicas exhiben la mayor actividad biológica contra los microorganismos.

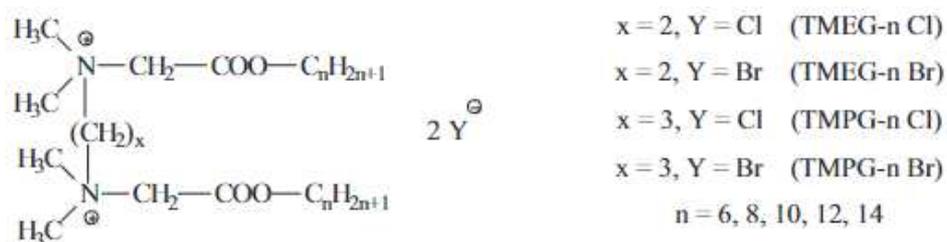
Además, estos compuestos se caracterizan por una mayor humectabilidad, propiedades superficiales más fuertes y una biodegradabilidad más rápida, en comparación con los QAS convencionales. Estos tensioactivos tienen valores de CMC más bajos que los mono-QAS.<sup>5</sup>

### **1.1.2. Actividad antimicrobiana de QAS de tipo dimérico.<sup>6</sup>**

El amplio uso de sales de amonio cuaternario como desinfectantes y agentes de limpieza contribuyó al desarrollo de la resistencia microbiana a los antisépticos comunes, haciendo que las QAS no sean tan efectivas como solían. Por eso los investigadores se centraron en los tensioactivos con estructura química más compleja. Dado que las sales de amonio cuaternario diméricas poseen dos cadenas de alquilo hidrófobas y dos grupos de cabeza catiónicos, se cree que sus propiedades antimicrobianas deberían ser mejores en comparación con los monómeros correspondientes. Sin embargo, se ha demostrado que la actividad biológica depende en gran medida de su estructura química, principalmente la longitud de las cadenas de alquilo, la estructura de los grupos de cabeza y el espaciador, y el tipo de contraión.

La figura 3 muestra la estructura de varias QAS diméricas. Estos compuestos inhibieron la filamentación de *Candida albicans*. Uno de los compuestos probados erradicó biopelículas de *C. albicans* y *Rhodotorula mucilaginosa*, lo que podría ser importante para superar las infecciones asociadas al catéter. También se demostró que estos

tensioactivos mejoraron la sensibilidad de *C.albicans* a azoles y polienos, por lo que podrían usarse potencialmente en terapia combinada contra hongos.



**Figura 3.** Estructura de algunas sales de amonio cuaternario diméricas.

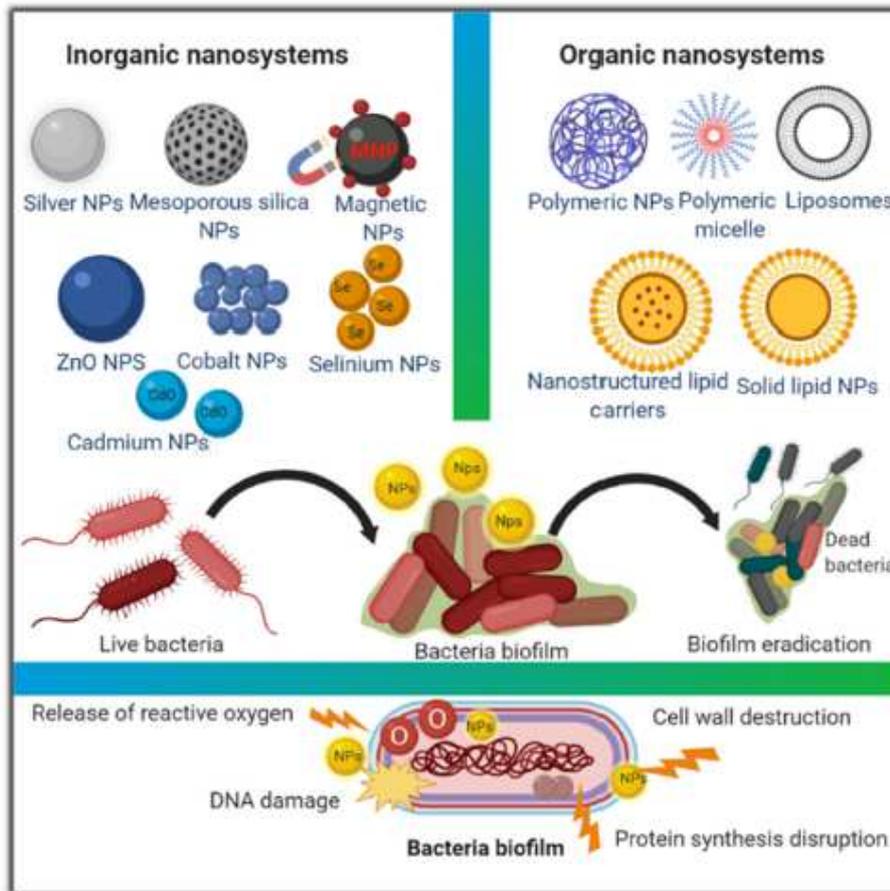
## 1.2. La nano medicina contra la resistencia a los antibacterianos.

La resistencia a los antibióticos se define como la capacidad de las bacterias que causan efectos terapéuticos de medicamentos antibacterianos, juega un papel vital en la mejora de la efectividad de las terapias existentes, mejorando las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de los antibióticos.<sup>7</sup>

La nanomedicina juega un papel vital en la mejora de la efectividad de las terapias existentes, mejorando las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de los antibióticos. Las propiedades fisicoquímicas de los nanosistemas, el tamaño de las partículas, la carga superficial y la solubilidad son los factores clave que controlan los procesos vitales, por ejemplo, la absorción, la bio-distribución o la eliminación intracelular. Las partículas de tamaño nanométrico permiten una mejor carga de fármacos eficiencia de antibióticos hidrófilos y lipófilos y, por lo tanto, mejora la eficacia antibacteriana.<sup>8</sup>

Los nanosistemas pueden clasificarse inorgánicos y orgánicos.<sup>9</sup>

- Los nanosistemas inorgánicos comúnmente se originan a partir de óxidos inorgánicos. Su técnica de síntesis depende de la reducción química de sales metálicas con un reductor.
- los nanosistemas orgánicos como los liposomas, las nanopartículas a base de lípidos, las micelas y las nanopartículas poliméricas tienen características preferibles de biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo que los convierte en candidatos adecuados para uso clínico.



**Figura 4.** Esquema gráfico de varias clases de nano sistemas con ilustración de su posible mecanismos anti-biofilm

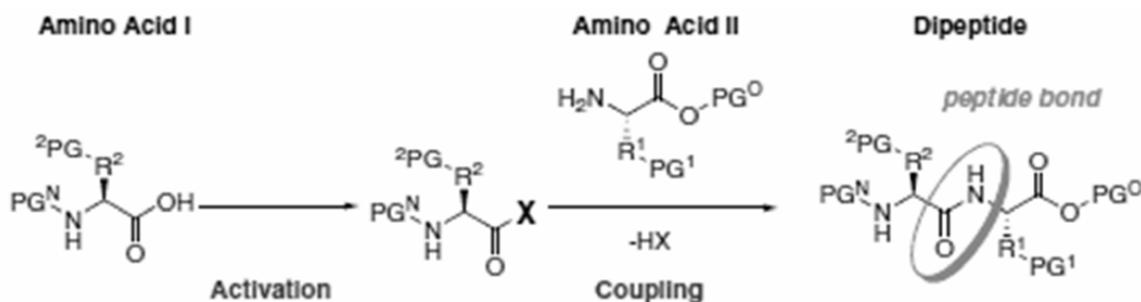
Los liposomas se consideran los nanosistemas de administración de fármacos antimicrobianos más evaluados. Se caracterizan por ser estructuras esféricas formadas por bicapa de fosfolípidos que rodean un espacio acuoso que varía en tamaño 0,02 a 10 micrómetros. Los liposomas demostraron ser útiles para el manejo de típicos, infecciones bacterianas vaginales, pulmonares y oculares.<sup>10</sup>

Por otro lado, las nanopartículas sólidas de lípidos (SLN) y los portadores de lípidos nanoestructurados (NLC) representan los dos subtipos principales de nanopartículas compuestas por lípidos. Los SLN son sistemas de administración de fármacos en forma coloide compuestos de lípidos de alta estabilidad de fusión que se desarrollaron para superar los problemas de inestabilidad de los liposomas.<sup>10</sup>

Otro grupo importante de nanopartículas son las micelas poliméricas. Típicamente, la unión de un bloque hidrófilo a un bloque lipófilo da como resultado la formación de copolímeros anfifílicos. El tamaño de las micelas poliméricas se puede controlar fácilmente variando el peso molecular y la relación en peso entre las partes hidrófilas e hidrófobas.<sup>10</sup>

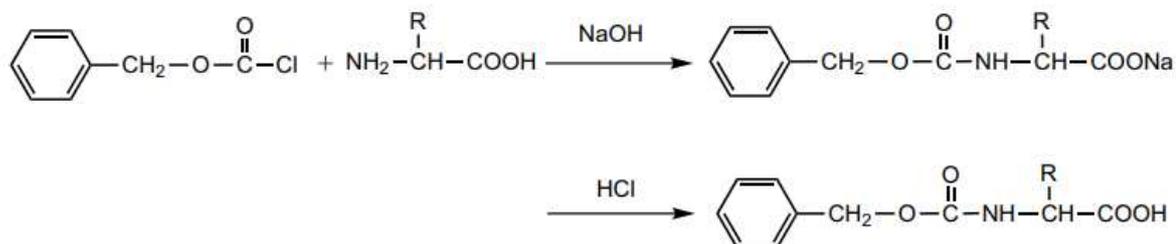
### 1.3. Breve introducción a química de protección y acoplamiento de aminoácidos.

Como se muestra en el esquema 1, la formación controlada de un enlace peptídico requiere el acoplamiento entre un aminoácido N-prottegido y otro C-activado. Después de la formación del enlace amida, el dipéptido protegido se aísla, purifica y se caracteriza.<sup>11</sup>



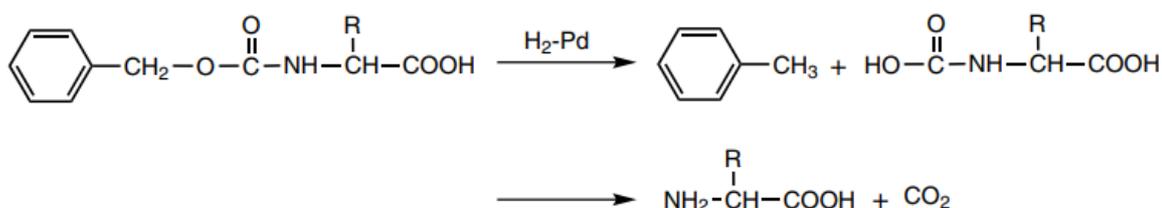
**Esquema 1.** Formación de un enlace peptídico

El grupo Z fue introducido por Bergmann y Zervas para la protección de grupos amino. Para la preparación de Z-aminoácidos, se permite que el cloruro de benciloxicarbonilo reaccione con los aminoácidos en las condiciones de la reacción de Schotten-Bauman como se muestra en el esquema 2.<sup>12</sup>



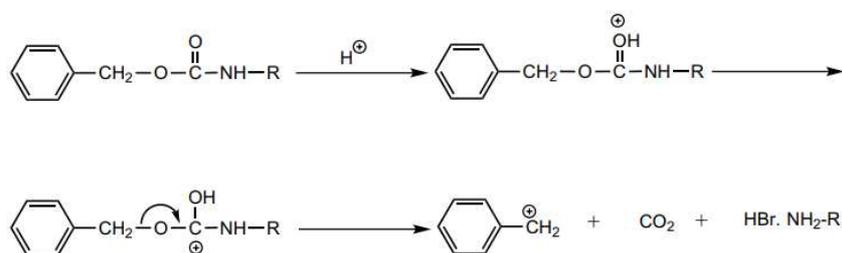
**Esquema 2.** Ruta sintética a los aminoácidos Z.

Este grupo protector puede eliminarse mediante una variedad de métodos, que incluyen hidrogenólisis, reducción con sodio en amoníaco líquido, HF líquido, etc. Sin embargo, la hidrogenólisis y la acidólisis con HBr son los procedimientos más utilizados. El grupo Z se puede eliminar mediante hidrogenólisis catalítica a temperatura ambiente y presión atmosférica, un proceso que no afecta el enlace peptídico y las diversas funciones de la cadena lateral y genera solo subproductos relativamente inofensivos, tolueno y dióxido de carbono, como se muestra en el esquema 3.<sup>13</sup>



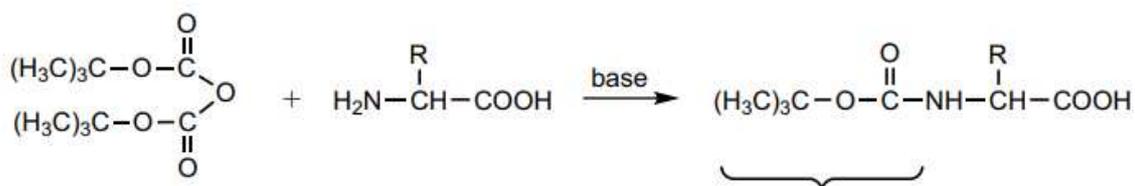
**Esquema 3.** Eliminación del grupo Z por hidrogenólisis catalítica.

El grupo Z también se puede eliminar mediante acidólisis con HBr. Como paso inicial, se protona el oxígeno del carbonilo, seguido de la fisión del enlace bencilo-oxígeno. La descarboxilación del intermedio de ácido carbámico conduce a la liberación del grupo amino en forma protonada, como se muestra en el esquema 4.



**Esquema 4.** Eliminación del grupo Z por HBr.

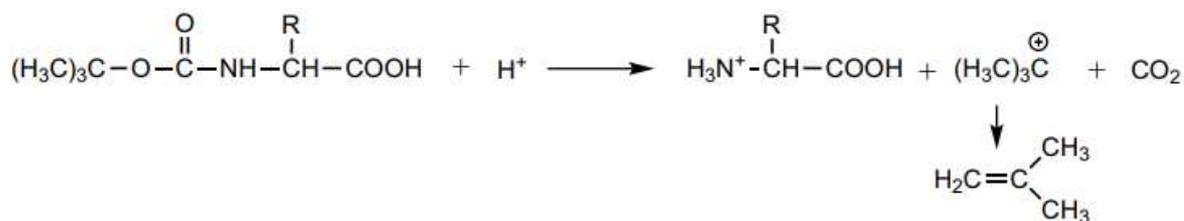
El grupo Boc fue introducido por McKay y Albertson. A diferencia del bencilcloroformiato, el terc-butilcloroformiato es inestable excepto a baja temperatura. Por lo tanto, se investigaron varios métodos alternativos para la preparación de aminoácidos Boc. Entre estos, el dicarbonato de di-terc-butilo se emplea popularmente como reactivo para la preparación de aminoácidos Boc como se muestra en el esquema 5.<sup>14</sup>



**Esquema 5.** Preparación de aminoácidos Boc-protectidos

El grupo Boc es estable a la hidrogenación catalítica, el sodio en el amoníaco líquido y alcalino, pero se puede eliminar en condiciones ácidas suaves como el TFA. El grupo Boc se escinde mediante tratamiento con TFA a temperatura ambiente durante 30-60 min. También es escindido por HBr en 1 min. El tratamiento de los derivados de Boc con HCl (aproximadamente 10 equivalentes.) en ácido acético, acetato de etilo o dioxano puede eliminar el grupo Boc en 30 min. En estas condiciones, el grupo Z permanece intacto o la escisión es insignificante. Dado que el grupo Z se elimina mediante hidrogenólisis catalítica y es estable a las condiciones ácidas leves, esos grupos Z y Boc se utilizan como grupos protectores ortogonales en la síntesis de péptidos complejos.

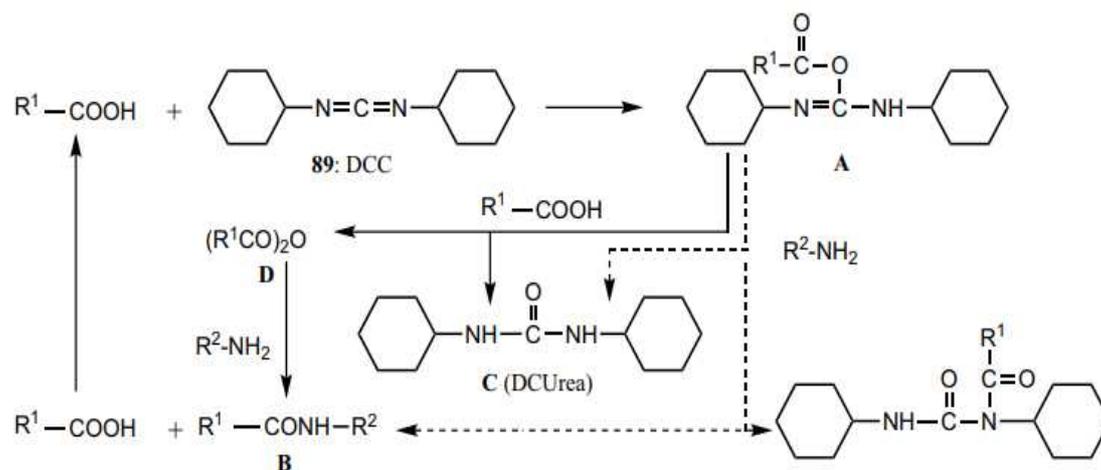
La escisión por tratamiento ácido procede a través de la formación del catión tert-butil (tBu), que sufre pérdida de H para formar isobutileno. Los otros productos son dióxido de carbono y una sal del aminoácido o péptido libre.<sup>15</sup>



**Esquema 6. Escisión del grupo Boc por acidólisis**

La protección del extremo C-terminal es la principal diferencia entre la síntesis de péptidos en fase sólida y la síntesis de péptidos en disolución. En el primer caso, se puede considerar que el soporte polimérico insoluble es el grupo protector del extremo C, mientras que en la síntesis de péptidos en disolución se utilizan grupos protectores más convencionales. El extremo C-terminal está protegido comúnmente como un éster de alquilo o arilo. Los ésteres metílicos y etílicos pueden eliminarse por saponificación y también se convierten en la amida C-terminal del péptido correspondiente mediante tratamiento con amoníaco y en la hidrazida peptídica correspondiente mediante hidrazinólisis. Las hidrazidas peptídicas se pueden convertir en las correspondientes acilazidas para el acoplamiento de segmentos. El éster bencílico (-OBzl) se prepara fácilmente en condiciones suaves por ácido con alcohol bencílico o por reacción del aminoácido carboxilato de cesio con bromuro de bencilo. La escisión del éster bencílico puede producirse mediante acidólisis con ácido fuerte o una alternativa más suave utilizada con más frecuencia es la hidrogenólisis catalítica. El éster bencílico también se puede eliminar por saponificación o se puede convertir en la correspondiente amida C-terminal mediante tratamiento con amoníaco o la correspondiente hidrazida mediante tratamiento con hidrato de hidrazina.<sup>16</sup>

Durante muchos años, la DCC (N, N'-diciclohexilcarbodiimida) ha sido el reactivo de acoplamiento más útil y popular en la síntesis de péptidos para métodos tanto en fase sólida como en solución. Es muy reactivo y da altos rendimientos en poco tiempo. La desventaja del uso de DCC es la formación de diciclohexilurea insoluble durante la activación / acoplamiento. Para superar los problemas de separación del subproducto de urea insoluble, el uso de diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), que es igualmente eficaz y forma un subproducto de urea más soluble. Un mecanismo de reacción con DCC se resume en el esquema 6.<sup>17</sup>

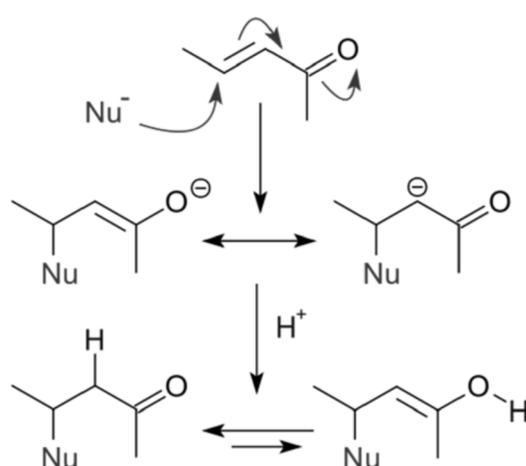


**Esquema 7.** Vía de acoplamiento mediada por DCC

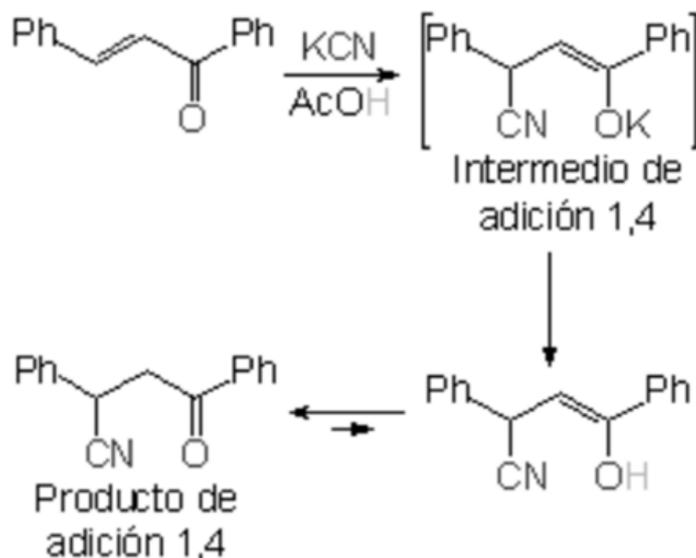
#### 1.4. Reacciones de adición conjugada.<sup>18</sup>

Una adición conjugada es un tipo de reacción química orgánica en la que tiene lugar una adición nucleófila sobre un sistema conjugado formado por un doble enlace sustituido con un grupo aceptor de electrones por resonancia. Usualmente, el grupo aceptor de electrones es un carbonilo y el ataque nucleófilo se produce en la posición  $\beta$  al mismo. En el caso de una enona conjugada, el ataque nucleófilo conduce al enolato, que se protona a enol y tautomeriza a la forma ceto. Si existiera catálisis ácida, el ataque nucleófilo conduciría directamente al enol.

Como ejemplo, se puede considerar la adición de cianuro que se muestra en el esquema. Se forma un enolato que es inmediatamente neutralizado por el ácido acético, para dar un enol que está en equilibrio tautomérico con la forma cetónica. El resultado final es la adición 1,4 de cianuro a la 1,3-difenilpropenona.



**Esquema 8.** Mecanismo típico de la adición conjugada.

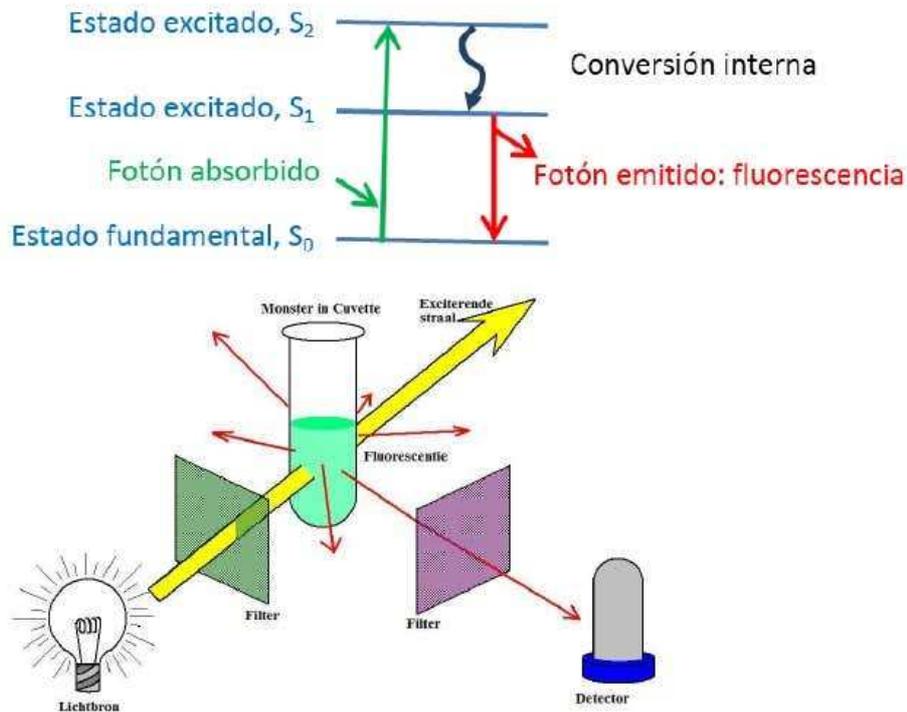


**Esquema 9.** Adición de cianuro

### 1.5. Utilización de pireno como sonda para determinar concentraciones críticas de agregación.

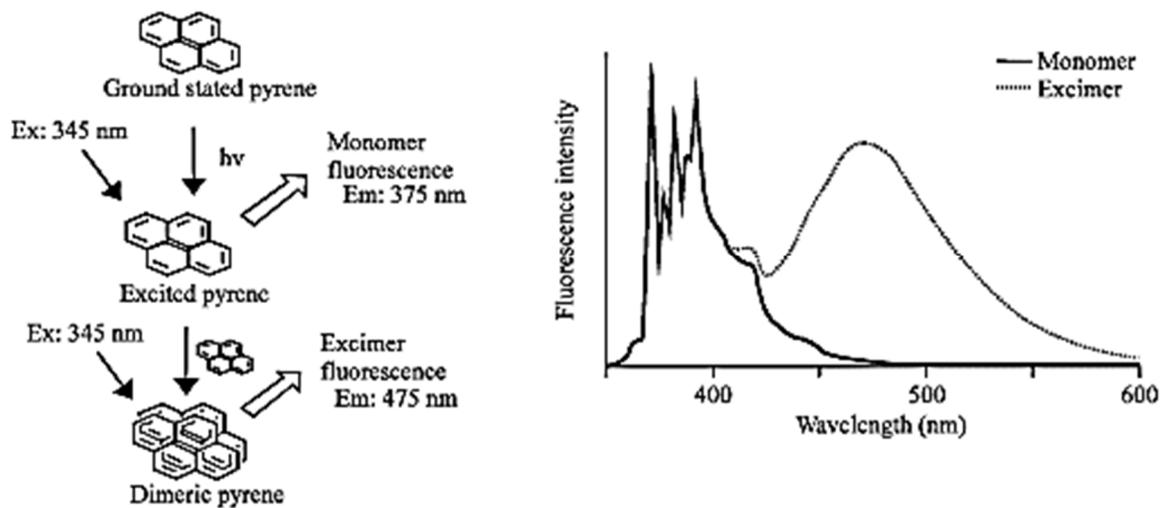
La fluorescencia es una técnica espectrofotométrica que se basa en la absorción de radiación por parte del analito y su posterior emisión. En el fenómeno de fluorescencia, una molécula absorbe radiación electromagnética y debido a ello los electrones pasan de un estado basal otro excitado. Al ser la longitud de onda de la radiación emitida diferente de la longitud de onda de absorción, puede utilizarse ésta tanto para identificar como para cuantificar sustancias.

La fluorescencia se emite en todas direcciones, lo que puede aprovecharse al diseñar los aparatos de medida que, en principio, son similares a los usados en espectroscopia de absorción, con la diferencia de que, para evitar las interferencias que pueda causar la transmisión de la radiación incidente sobre la muestra, se sitúa el sistema de detección en ángulo recto respecto a la luz incidente.<sup>19</sup>



**Figura 5.** Esquema del fundamento de la espectroscopia de fluorescencia.

El pireno es un fluoróforo hidrofóbico con propiedades fotofísicas únicas. Presenta un espectro vibracional resuelto característico muy sensible al entorno. La relación de intensidades de dos bandas vibracional de su espectro de emisión fluorescente permite estimar la polaridad del medio. Las bandas típicamente utilizadas son la primera y la tercera, a 371 nm y 382 nm, respectivamente. El pireno tiene una alta afinidad para las micelas de tensioactivos. El cambio en la relación de las bandas vibracionales al pasar del medio acuoso al interior menos polar de las micelas es muy frecuentemente utilizado para detectar la formación de micelas.<sup>20</sup>



**Figura 6.** Estructura del pireno y espectro de emisión fluorescente.

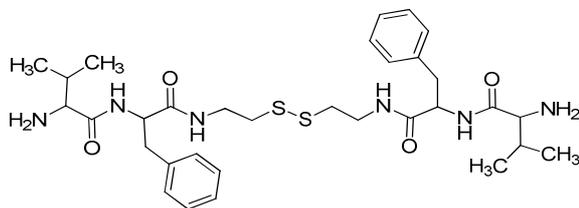
# Objetivos



## 2. Objetivos

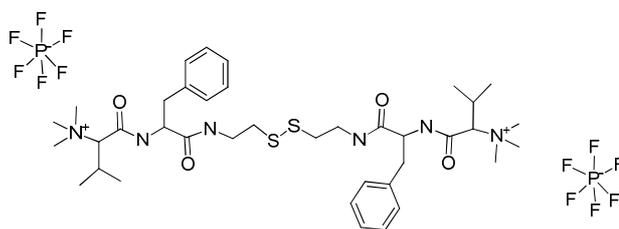
- Sintetizar (ValPhe)<sub>2</sub>Cst y [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst

(ValPhe)<sub>2</sub>Cst



(ValPhe)<sub>2</sub>Cst

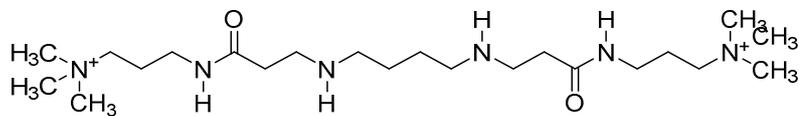
[(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst



[(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst

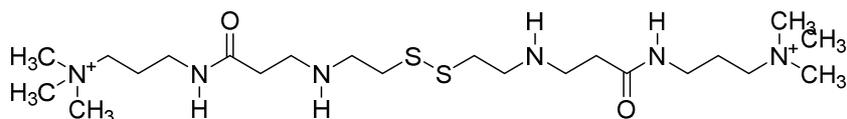
- Sintetizar los compuestos (PTAC)<sub>2</sub>Put y (PTAC)<sub>2</sub>Cst

(PTAC)<sub>2</sub>Putrescina



(PTAC)<sub>2</sub>Put

(PTAC)<sub>2</sub>Cistamina



(PTAC)<sub>2</sub>Cst

- Estudiar la formación de agregados en medio acuoso de estos compuestos utilizando pireno como sonda fluorescente

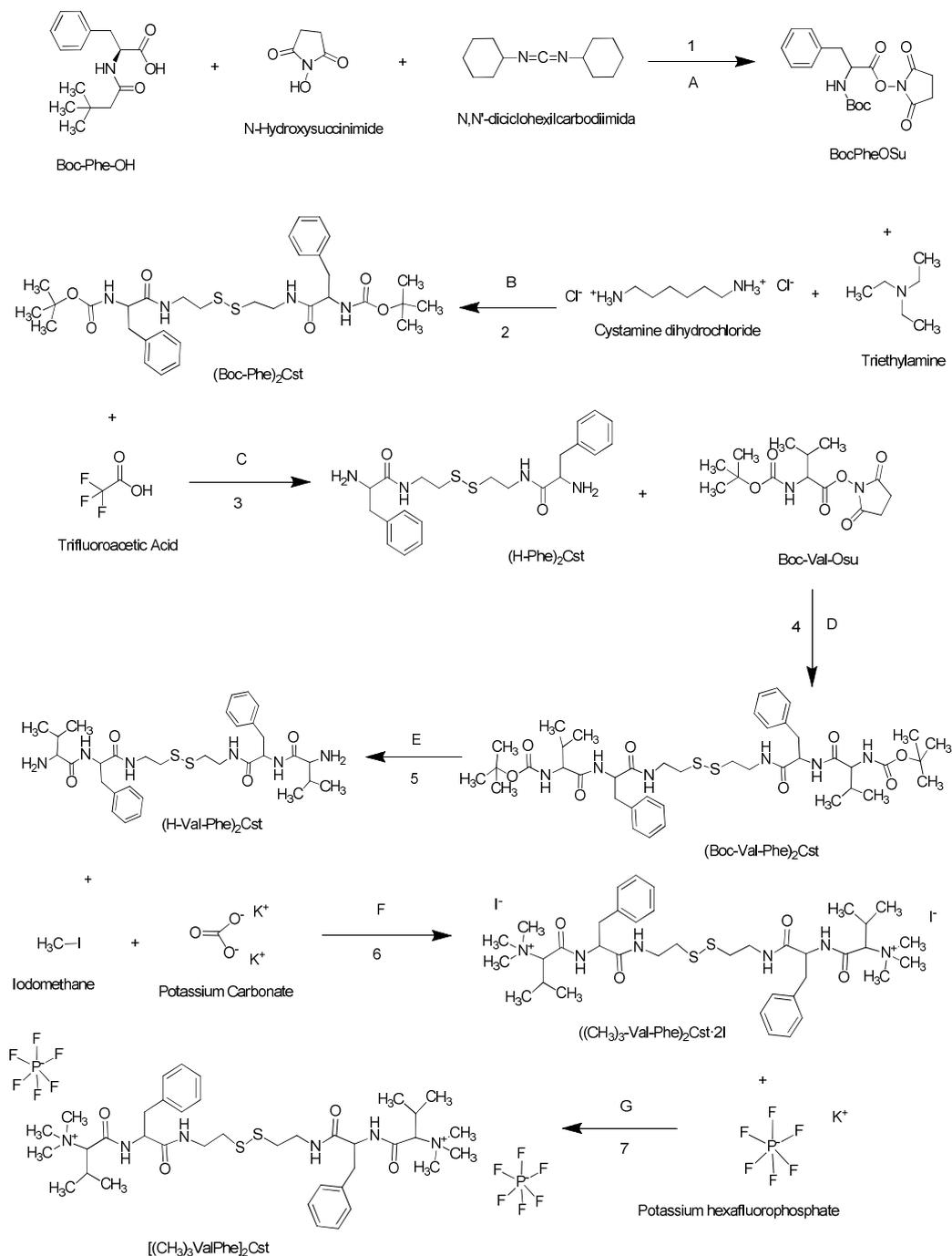


## **Resultados y discusión**



### 3. Resultados y discusión

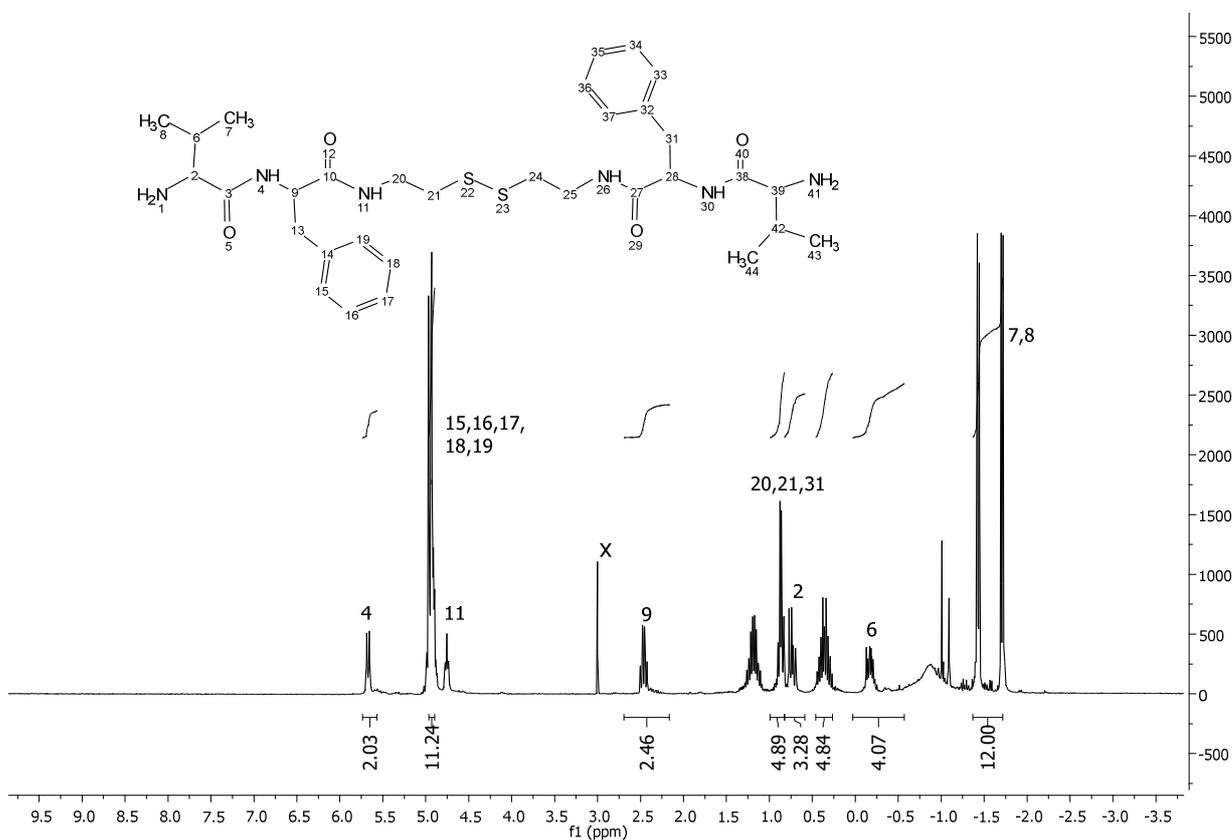
#### 3.1. Síntesis de (ValPhe)<sub>2</sub>Cst y [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst



**Esquema 10.** Reactivos y condiciones en la síntesis de (ValPhe)<sub>2</sub>Cst y [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst: **A)** 5°C, 2 horas, **B)** 55°C, 24 horas, THF, **C)** 24 horas, diclorometano, **D)** 5°C, 24 horas, THF, **E)** 24 horas, TFA, **F)** temperatura ambiente, 24 horas, acetonitrilo **G)** 24 horas, temperatura ambiente, acetonitrilo.

El paso 1 es en la activación de **BocPheOH**, el producto es el compuesto **BocValOsu**. El paso 2 corresponde al ataque nucleofílico de **BocPheOSu** a la cistamina para formar un enlace peptídico, el producto es **BocPheCst**. El paso 3 consiste en la desprotección del grupo amino con ácido trifluoroacético, obteniéndose el siguiente producto **(H-Phe)<sub>2</sub>Cst**. El paso 4 es otro ataque nucleofílico de **(H-Phe)<sub>2</sub>Cts** al **BocValOSu** para formar un enlace peptídico, en este caso el producto es **(Boc-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst**. El paso 5 consiste en la desprotección del grupo amino de la Valina mediante una hidrogenólisis, obteniéndose como producto **(H-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst**. El paso 6 indica corresponde a la trimetilación de la amina obteniéndose como producto **((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPheCst-2I**. El paso 7 que corresponde al paso final es el intercambio del anion yoduro por hexafluorofosfato obteniéndose como producto final el **((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPheCst**. El rendimiento global de la síntesis fue de 35%

El espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto **(ValPhe)<sub>2</sub>Cst**, muestra que se ha obtenido con pureza aceptable. Puede, por ejemplo, observarse la presencia dos señales de amida a aproximadamente 8.2 ppm y 7.3 ppm que corresponden, respectivamente a los protones unidos a los átomos de N de los aminoácidos valina y fenilalanina.



**Figura 7.** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) de **(ValPhe)<sub>2</sub>Cst**

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto  $[(\text{CH}_3)_3\text{ValPhe}]_2\text{Cst}$  muestra que se ha obtenido con pureza aceptable después de la realización de varias columnas para purificar el compuesto final. Puede observarse, por ejemplo, la presencia de un singulete a aproximadamente 3.0 ppm que integra 18 hidrógenos correspondientes a los metilos introducidos.

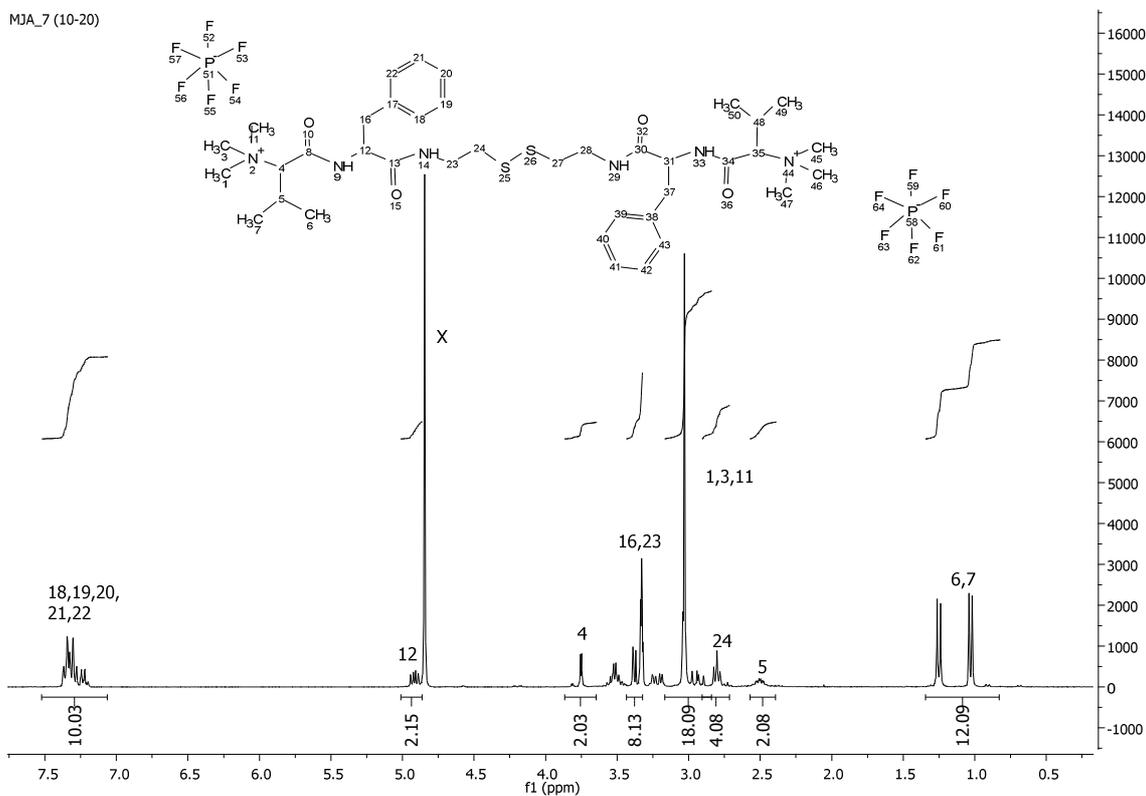
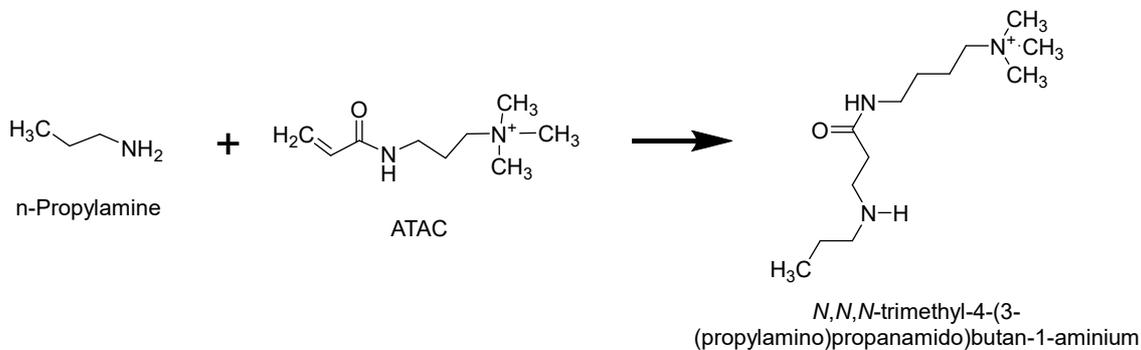


Figura 8.  $^1\text{H}$  RMN (MeOD) de  $[(\text{CH}_3)_3\text{ValPhe}]_2\text{Cst}$

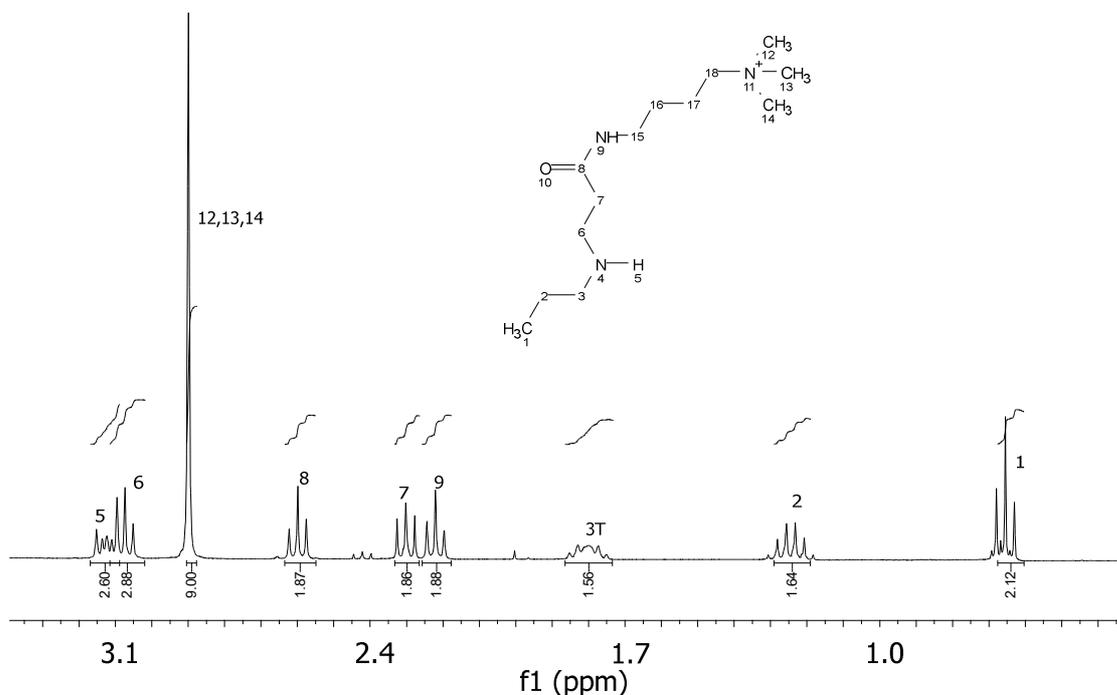
### 3.2. Síntesis de $(\text{PTAC})_2\text{Put}$ y $(\text{PTAC})_2\text{Cst}$

Antes de realizar la síntesis de  $(\text{PTAC})_2\text{Put}$  y  $(\text{PTAC})_2\text{Cst}$  se llevó a cabo una síntesis donde se utilizó la N-propilamina comprobar la factibilidad de la adición conjugada al ATAC, como se observa en el esquema 11.



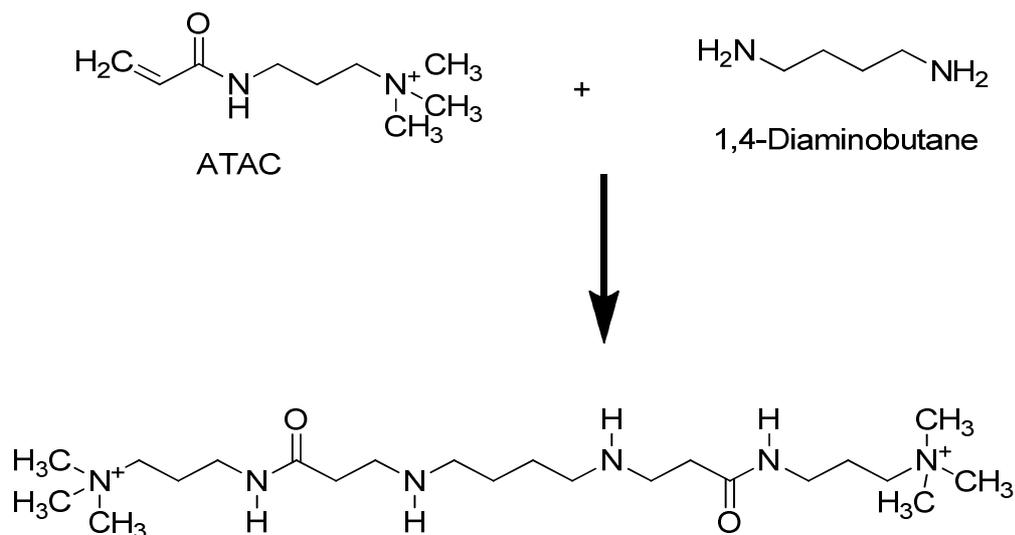
Esquema 11. Síntesis de  $(\text{PTAC})$ -*n*-Propilamina

En el espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto (PTAC)-*n*-Propilamina se puede observar la ausencia de señales vinílicas y que se han transformados en señales de hidrógeno correspondientes a átomos de carbono saturados. El espectro, correspondiente al crudo de reacción confirma que la reacción ha funcionado y que la adición conjugada de aminas al doble enlace conjugado del ATAC es factible.



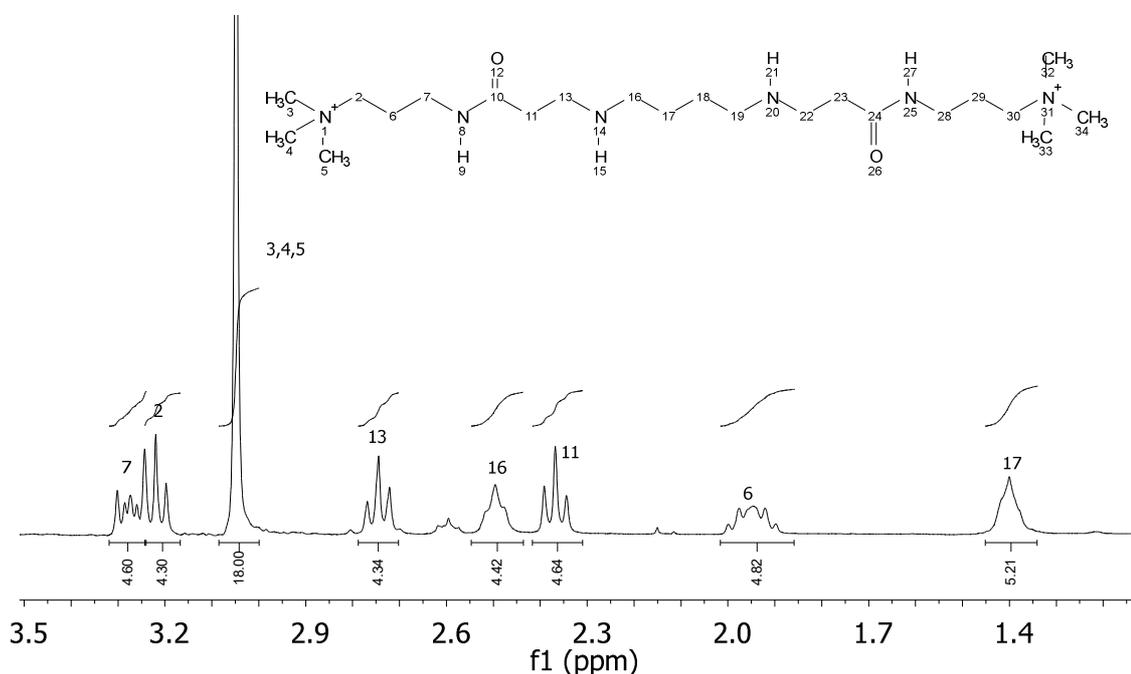
**Figura 9.**  $^1\text{H}$  RMN (DMSO) de (PTAC)-*N*-Propilamina

- **(PTAC)<sub>2</sub>Putrescina** se obtuvo por reacción de la 1,4-diaminobutano con el ATAC siguiendo el procedimiento mostrado en el Esquema 12. El proceso implica un solo paso.



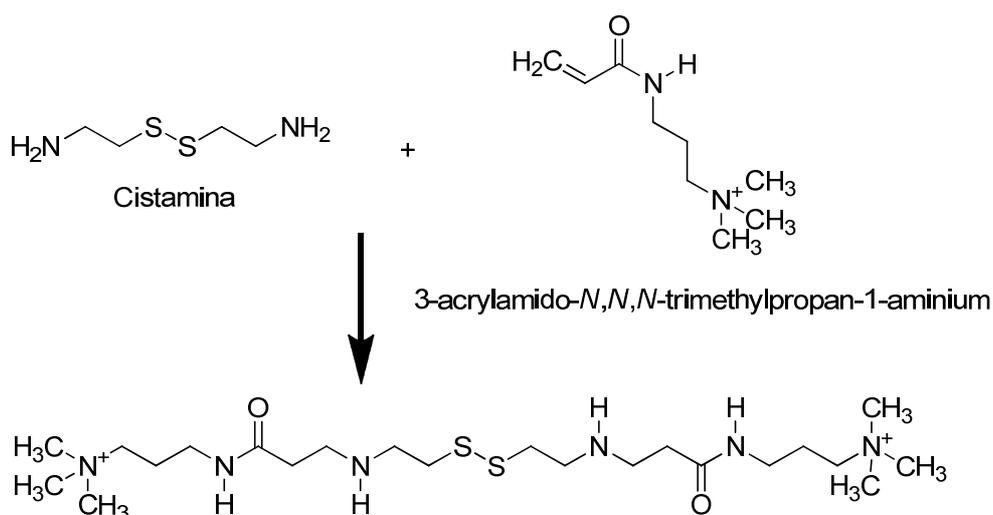
**Esquema 12.** Síntesis de (PTAC)<sub>2</sub>Put

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto  $(\text{PTAC})_2\text{Putrescina}$ , muestra de nuevo que el crudo de reacción presenta una pureza aceptable, no observándose señales importantes de subproductos ni material de partida.



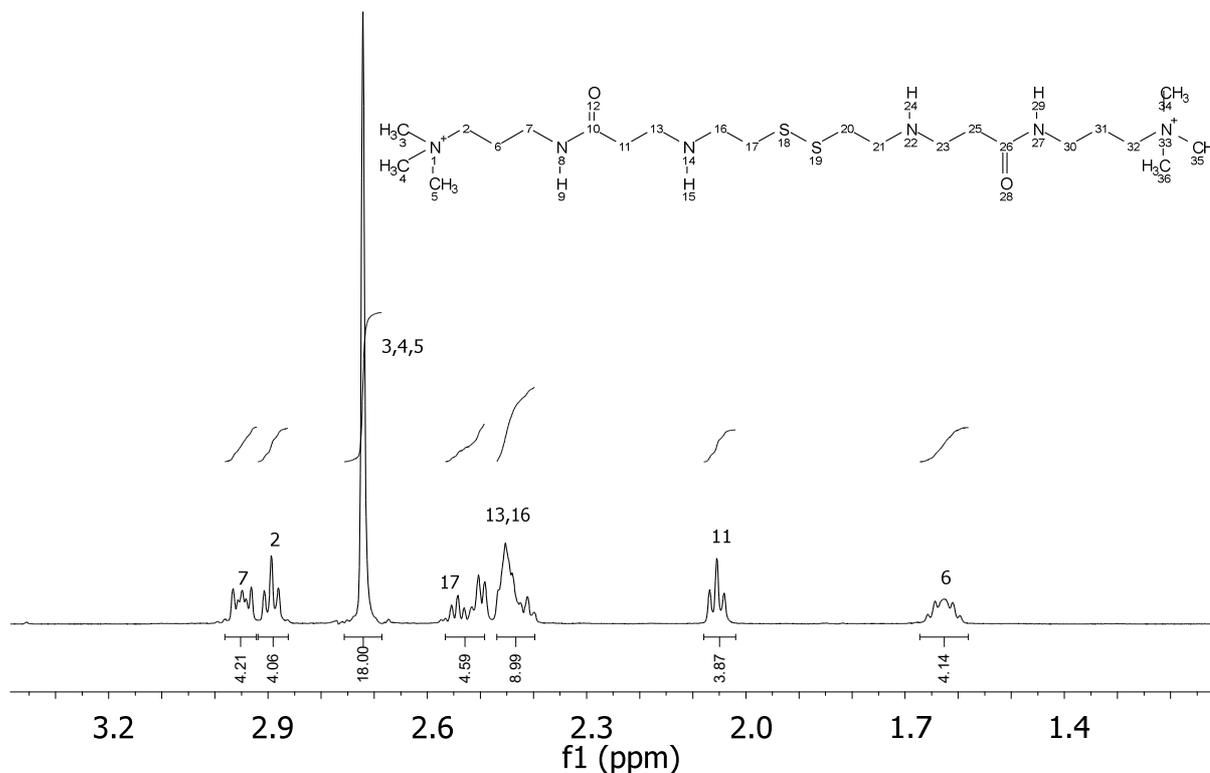
**Figura 10.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de  $(\text{PTAC})_2\text{Putrescina}$

- **$(\text{PTAC})_2\text{Cst}$**  se obtuvo por reacción de la cistamina con el ATAC siguiendo el procedimiento mostrado en el Esquema 13. El primer paso consiste en la conversión del clorhidrato de cistamina en cistamina en forma de amina libre. El segundo paso consiste en el ataque nucleofílico de la cistamina al ATAC para obtener el compuesto  **$(\text{PTAC})_2\text{Cst}$** .



**Esquema 13.** Síntesis de  $(\text{PTAC})_2\text{Cst}$

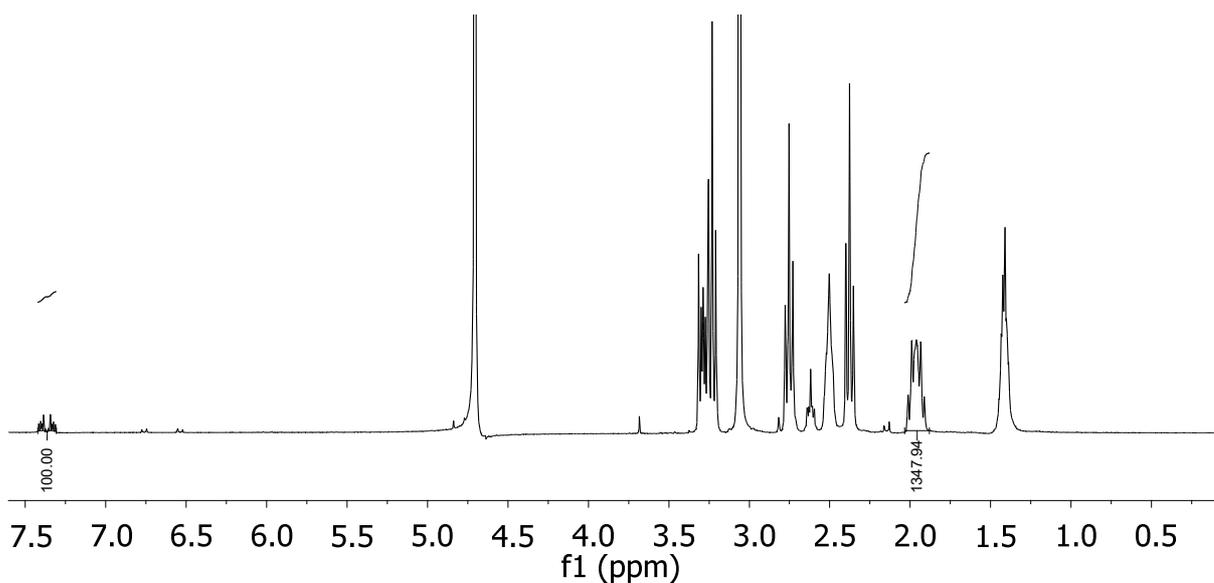
Al igual que los casos anteriores, el espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **(PTAC) $_2$ Cistamina**, muestra que se ha obtenido con pureza aceptable.



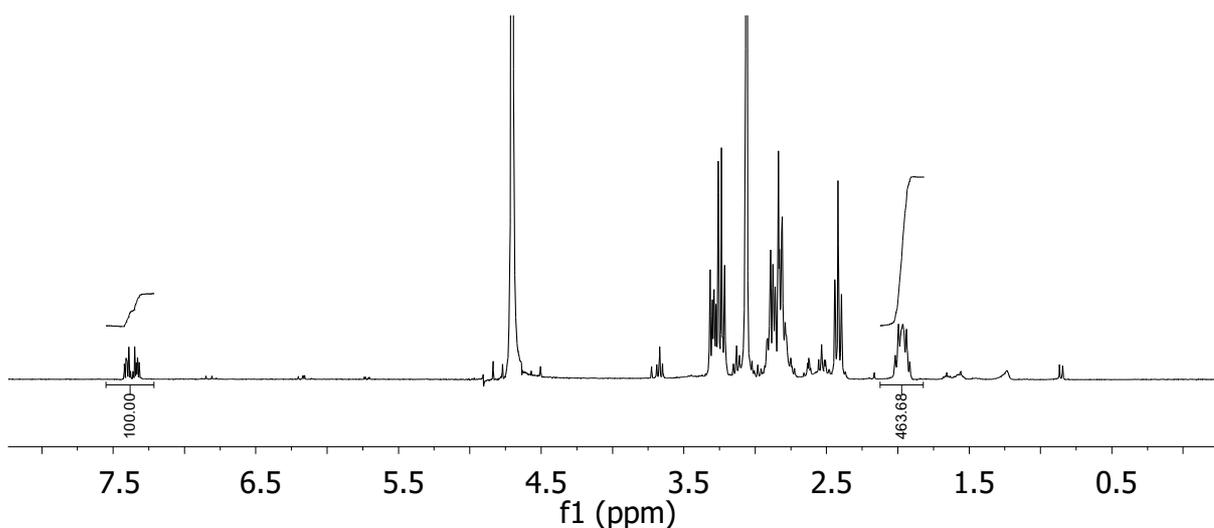
**Figura 11.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de **(PTAC) $_2$ Cistamina**

Hay que tener en cuenta que en los productos finales de las reacciones con ATAC final hay agua presente originalmente en el reactivo comercial, que se suministra al 75% de concentración en peso en agua. Para evaluar la concentración del producto en el crudo de reacción se realizó un estudio de RMN, utilizando como patrón de integración ftalato ácido de potasio. Se preparó una muestra con cantidades medidas con precisión de décimas de miligramo de ftalato y el crudo de reacción. La concentración calculada de esta manera fue de **77%** en peso para el compuesto **(PTAC) $_2$ Cistamina** y **68%** para el compuesto **(PTAC) $_2$ Putrescina**

En los siguientes espectros de RMN se pueden observar las señales utilizadas para la integración necesaria para calcular el contenido de producto en los crudos de reacción. Las señales del ftalato ácido de potasio aparecen a aproximadamente 7.4 ppm, y por otro lado aparece la banda más característica del compuesto **(PTAC) $_2$ Putrescina** la cual aparece aproximadamente en 2 ppm.



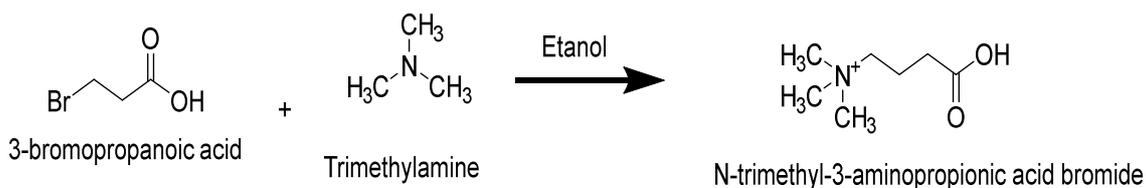
**Figura 12.**  $^1\text{H}$  RMN de  $(\text{PTAC})_2$ Putrescina y ftalato como patrón de integración (señales aromáticas).



**Figura 13.**  $^1\text{H}$  RMN de  $(\text{PTAC})_2$ Cistamina y ftalato como patrón de integración (señales aromáticas)

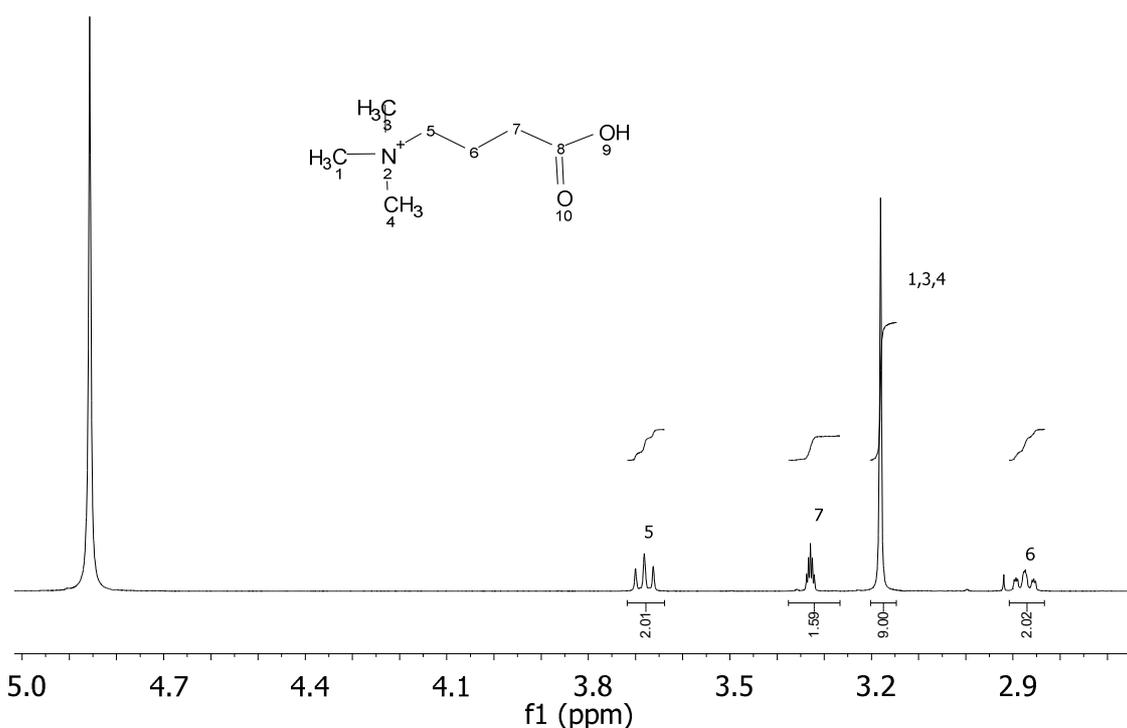
### 3.3. Síntesis de ácido 3-(trimetilamino) propiónico

Se planteo la síntesis de este compuesto para obtener un sintón que permitiese obtener compuestos con la unidad trimetilamonio mediante acilación. La obtención del ácido 3-(trimetilamino) propiónico siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía<sup>22</sup> fue exitosa. Sin embargo, los ensayos iniciales de la formación de amidas a partir de este compuesto no funcionaron y no se han incluido en esta memoria.



**Esquema 14. Síntesis del ácido 3-(trimetilamino) propiónico**

El espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto ácido 3-(trimetilamino)propiónico se obtuvo de manera aceptable ya que se observa claramente que las señales típicas de esta molécula se encuentran presentes, tales como, la señal de los metilos terminales unidos al nitrógeno que integran para 9 hidrógenos y aparece aproximadamente en 3,1 ppm. Las demás señales corresponden a los carbonos de la cadena principal los cuales integran todos para 2 hidrógenos, con esto se deduce que el compuesto se encuentra puro y tiene un espectro similar al que encuentra en la bibliografía.



**Figura 14.**  $^1\text{H}$  RMN (MeOD) de Bromuro de ácido N-trimetil-3-aminopropiónico

### 3.4. Determinación de la concentración crítica micelar

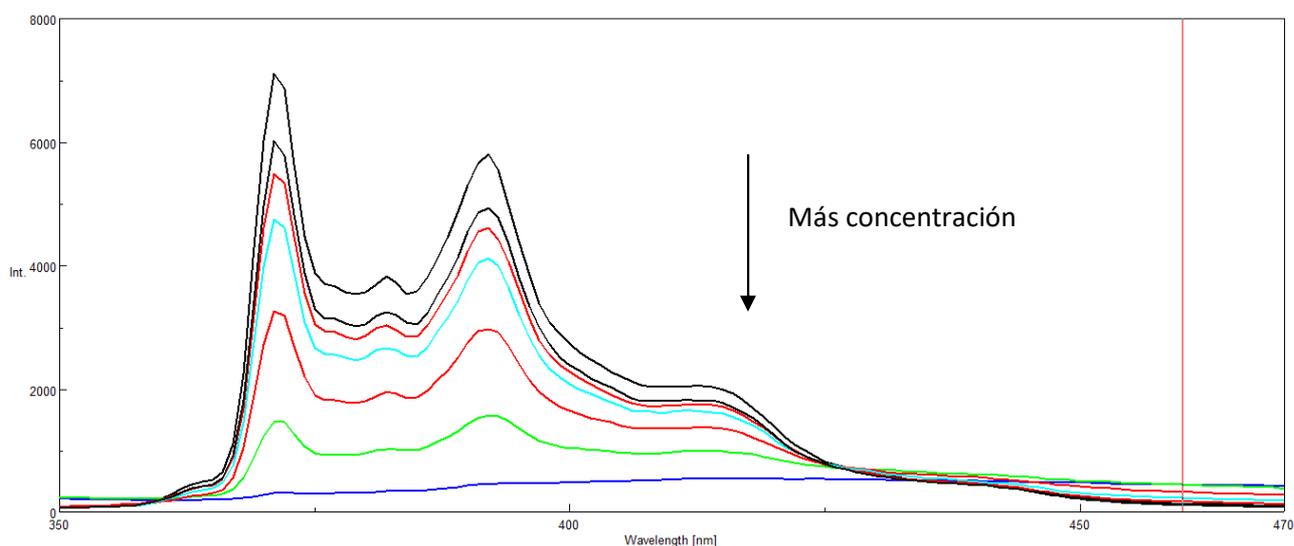
La concentración crítica micelar (CMC) es una de las propiedades esenciales de los surfactantes, definida como la concentración de surfactante en un disolvente por encima de la cual las micelas se forman de forma espontánea. Cuanto más por encima de esta concentración, mayor número de micelas se formarán. Esta concentración crítica depende de la naturaleza tanto del surfactante como del disolvente, así como de otras propiedades físicas como la temperatura. Una de las formas de determinar esta propiedad es por medio de la fluorescencia, utilizando una sonda fluorescente hidrofóbica que exhiba distintas características fluorescentes dependiendo de las propiedades del medio de disolución. Un ejemplo de ello es el pireno, el cual es sensible

a la polaridad del medio y muestra un comportamiento fluorescente distinto en soluciones micelares y no micelares.<sup>23</sup>

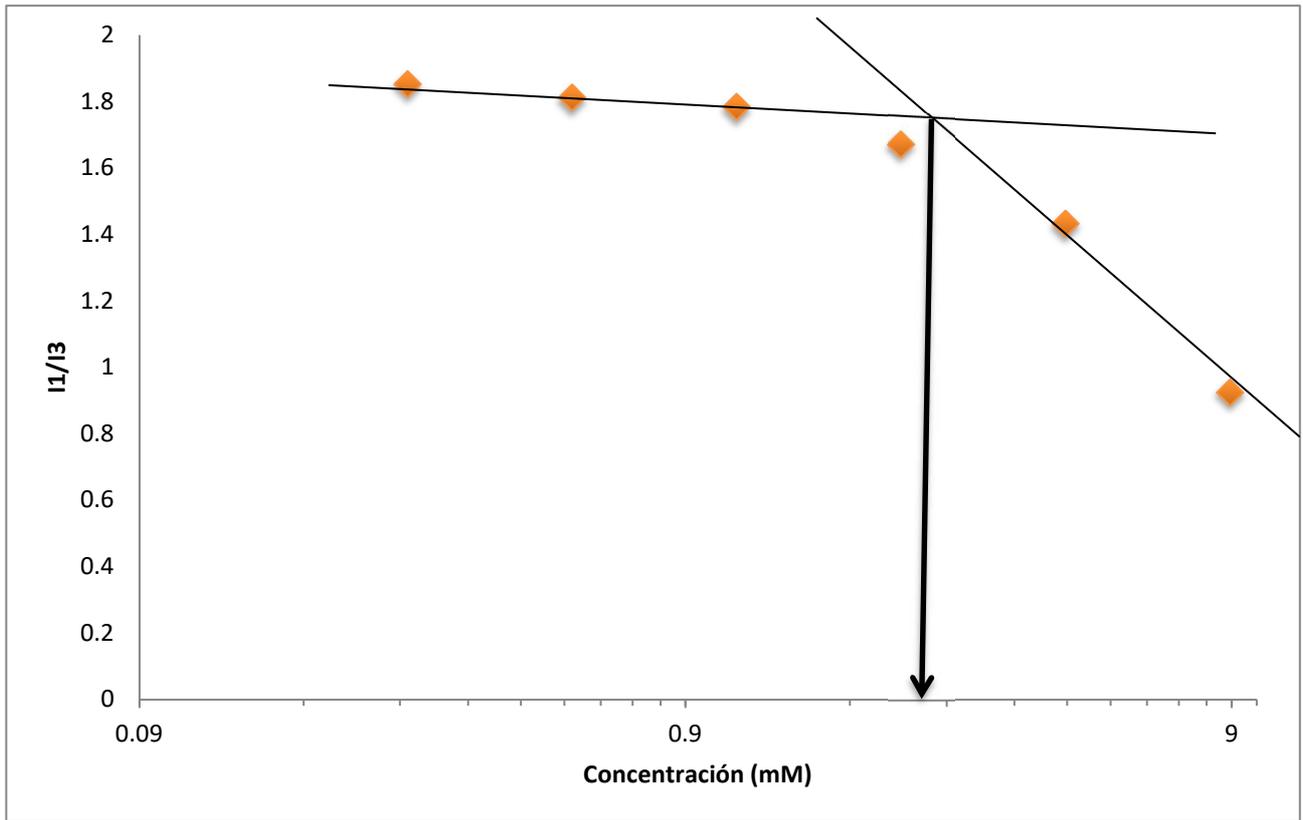
La concentración crítica de agregación se determinó mediante la medida de la fluorescencia de una disolución de  $1\mu\text{M}$  de pireno en presencia de distintas concentraciones del compuesto estudiado en un tampón de PBS 0.1 M a pH 7.4. Los valores obtenidos fueron respectivamente de **3,4 mg/mL** para ***(ValPhe)<sub>2</sub>Cst*** y **0,5mg/mL** para ***[(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst***.

A continuación, se muestran los espectros de emisión fluorescente obtenidos y la representación gráfica de la intensidad relativa de los picos ( $I_1/I_3$ ). Puede observarse que la intensidad de emisión disminuye con el aumento de la concentración del compuesto estudiado en todos los casos. Esto es debido al “quencheo” parcial de la emisión fluorescente causado probablemente por los grupos disulfuro y amonio.

- ***(ValPhe)<sub>2</sub>Cst***

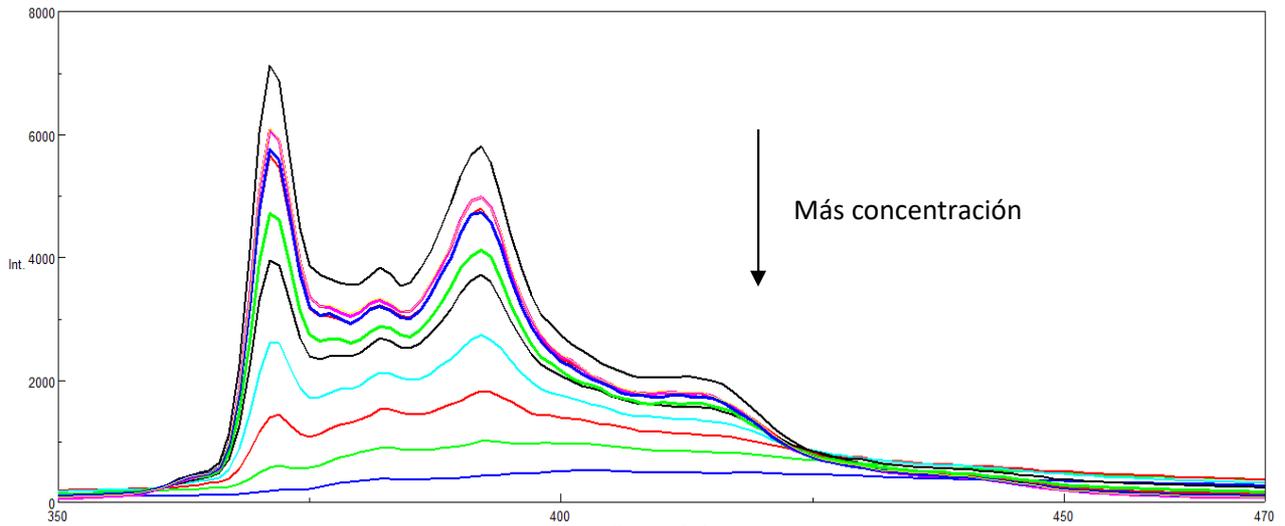


**Gráfica 1.** Superposición de espectros de fluorescencia del pireno obtenidos para distintas concentraciones de ***(ValPhe)<sub>2</sub>Cst***

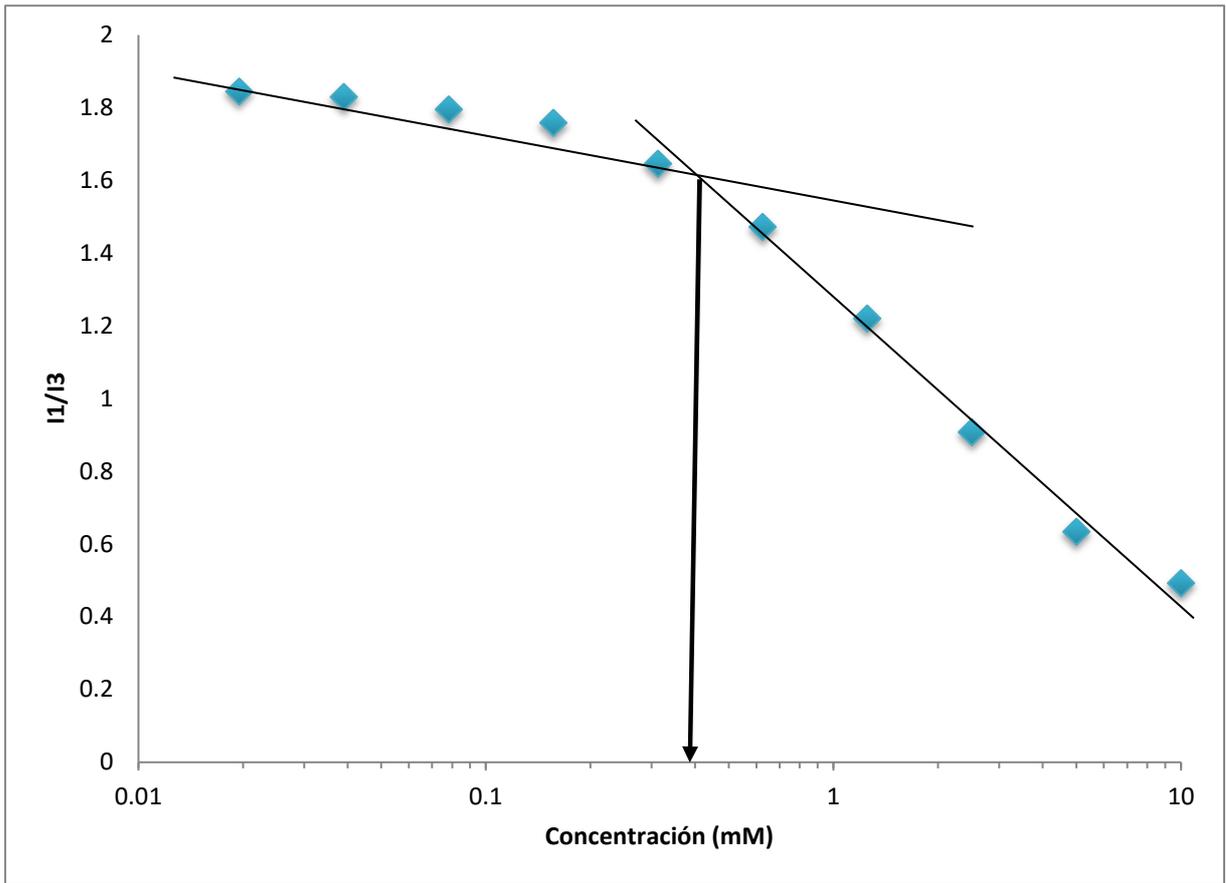


**Grafica 2.** Concentración  $(\text{ValPhe})_2\text{Cst}$  vs Ratio I1/I3 de la fluorescencia del pireno

- $[(\text{CH}_3)_3\text{ValPhe}]_2\text{Cst}$



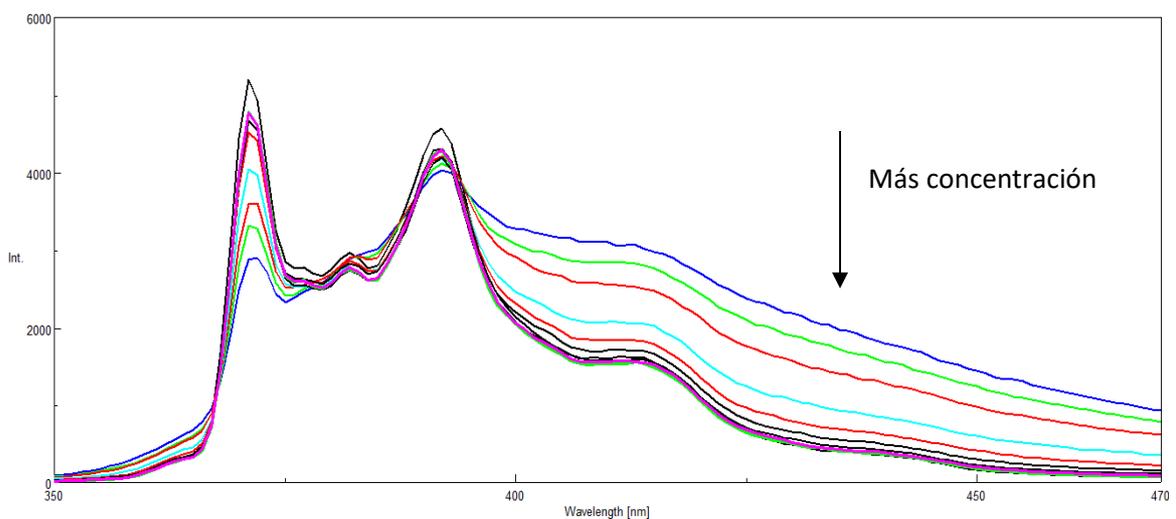
**Grafica 3.** Superposición de espectros de fluorescencia del pireno obtenidos para distintas concentraciones de  $[(\text{CH}_3)_3\text{ValPhe}]_2\text{Cst}$



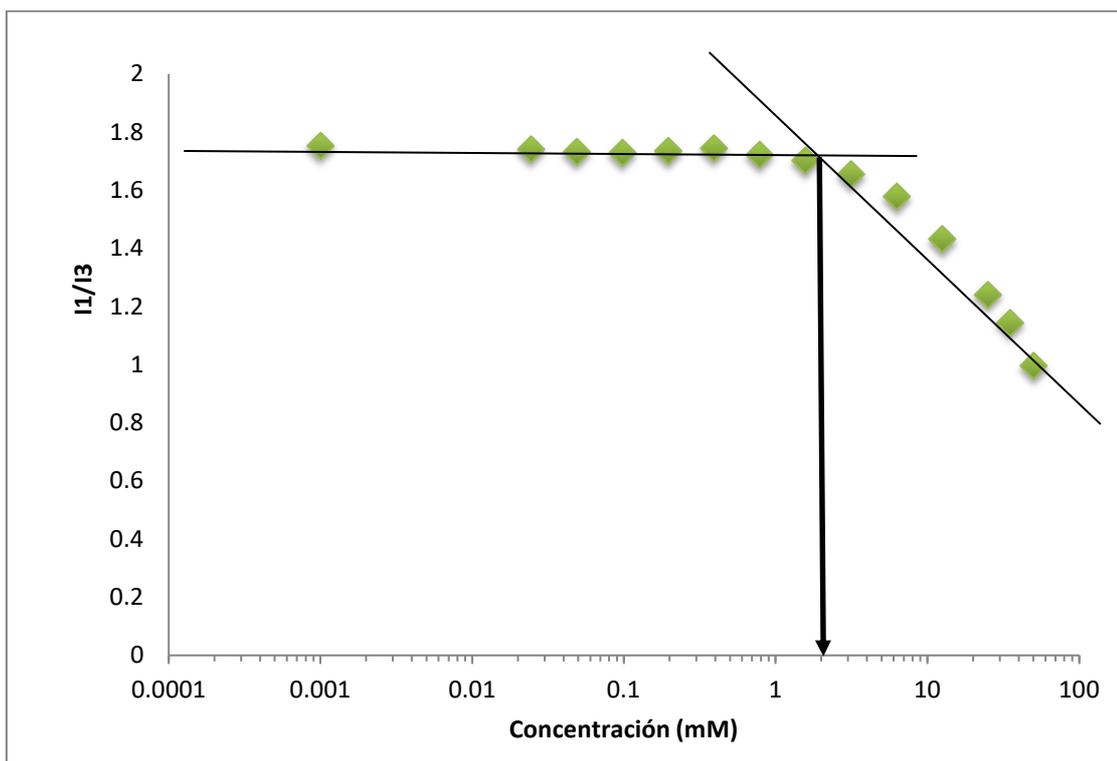
**Grafica 4.** Concentración  $[(CH_3)_3ValPhe]_2Cst$  vs Ratio I1/I3 de la fluorescencia del pireno

De igual manera, se determinaron la concentración crítica de agregación de  $(PTAC)_2Put$  y  $(PTAC)_2Cst$ , con valores respectivamente de 1,2 mg/mL y 4,7 mg/mL.

- $(PTAC)_2Put$

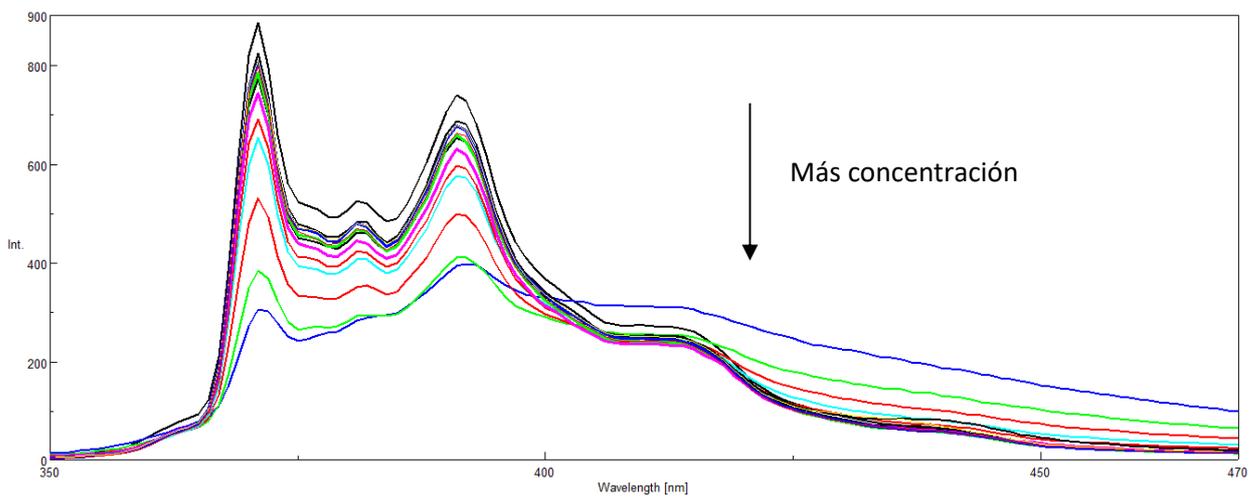


**Grafica 5.** Superposición de espectros de fluorescencia del pireno obtenidos para distintas concentraciones de  $(PTAC)_2Put$

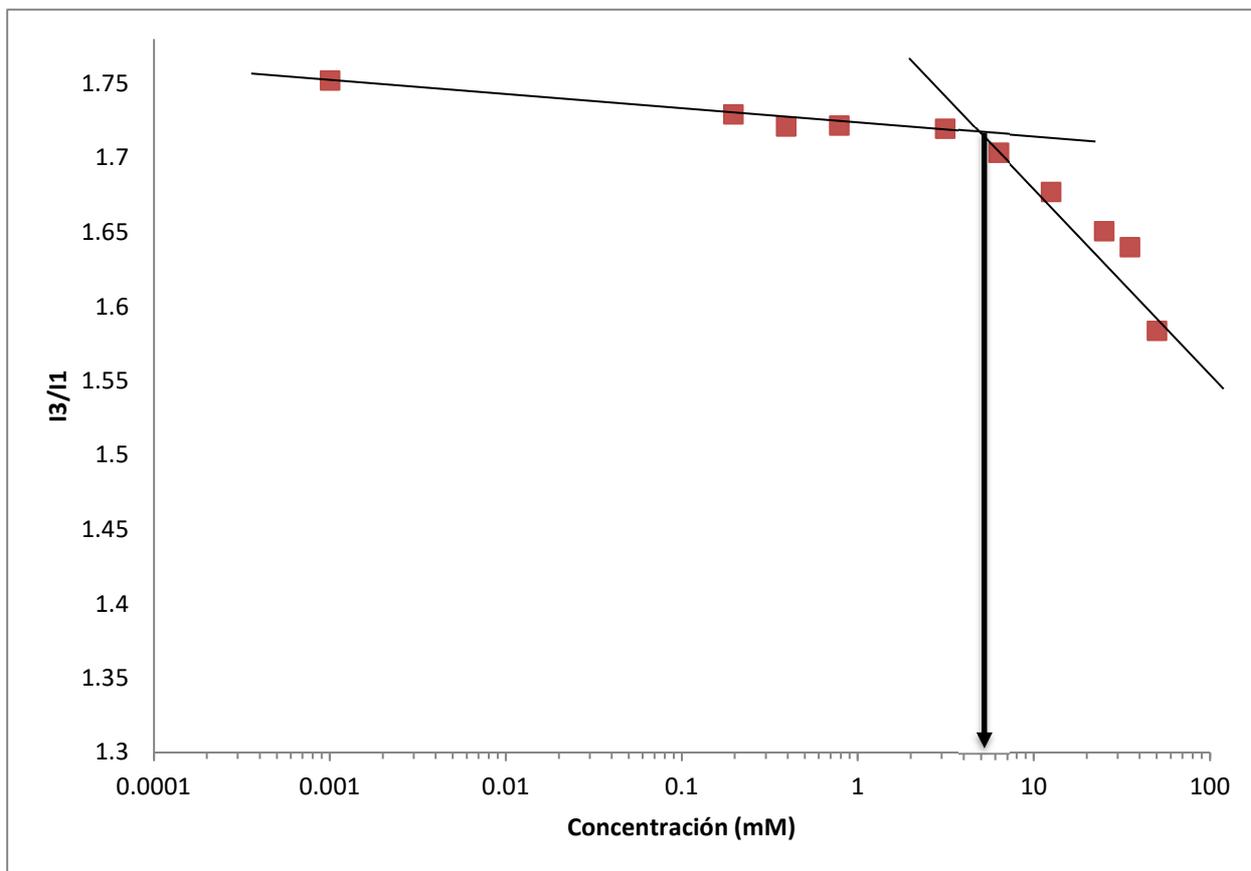


**Grafica 6.** Concentración  $(PTAC)_2Put$  de vs Ratio  $I1/I3$  de la fluorescencia del pireno

- $(PTAC)_2Cst$



**Grafica 7.** Superposición de espectros de fluorescencia del pireno obtenidos para distintas concentraciones de  $(PTAC)_2Cst$



**Grafica 8.** Concentración de  $(\text{PTAC})_2\text{Cst}$  vs Ratio I1/I3 de la fluorescencia del pireno

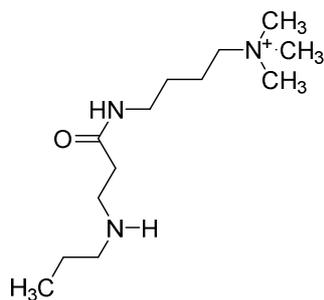


## **Conclusiones**

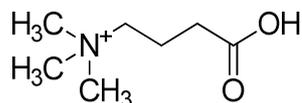


## 4. Conclusiones

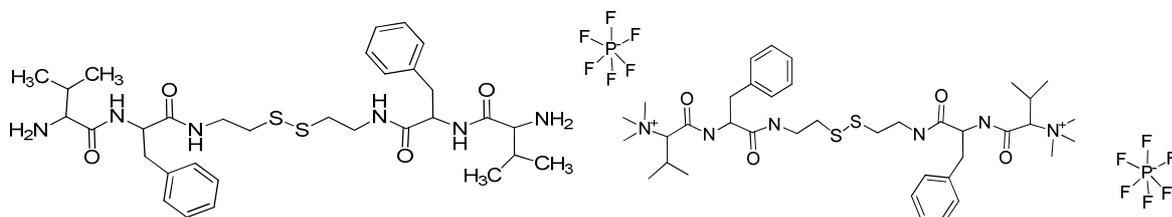
- Se han sintetizado y caracterizado los siguientes compuestos:



ATAC-N-Propilamina

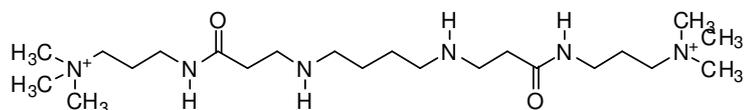


N-trimethyl-3-aminopropionic acid bromide

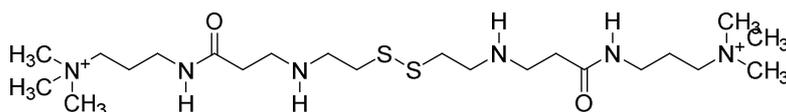


(ValPhe)<sub>2</sub>Cst

[(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ValPhe]<sub>2</sub>Cst



(PTAC)<sub>2</sub>Put



(PTAC)<sub>2</sub>Cst

- Se ha determinado la concentración crítica micelar para los siguientes compuestos:

Tabla. CMC de los compuestos sintetizados.

| Compuesto   | CMC (mg/mL) |
|---|-------------|
| (ValPhe) <sub>2</sub> Cst                                 | 3,4         |
| [(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ValPhe] <sub>2</sub> Cst | 0,5         |
| (PTAC) <sub>2</sub> Putrescina                            | 1,2         |
| (PTAC) <sub>2</sub> Cistamina                             | 4,7         |

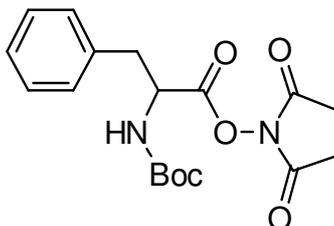


## **Sección experimental**



## 5. Sección experimental

- Síntesis de Boc-Phe-Osu



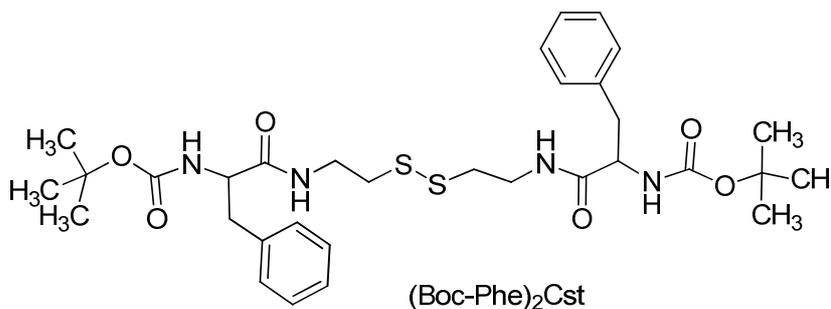
BocPheOSu

Se disuelve Boc-Phe-OH (8.000 g, 0.030 mol, 1.000 eq) y N-Hydroxysuccinimide (3.506 g, 0.030 mol, 1.000 eq) en 40 mL de THF y se pone en un baño de hielo con agitación y en atm=N<sub>2</sub>. Tras 10 min, se le añade gota a gota, mediante un embudo de adición compensada, una disolución de DCC (6.222 g, 0.030 mol, 1.000 eq) en 50 mL de THF. Se mantiene en agitación durante 1h, en baño de hielo y atm=N<sub>2</sub>. Tras ese tiempo se le pone un septum al matraz y se guarda en el congelador durante todo el fin de semana.

Work up: se filtra en frío, el sólido se deshecha (DCU) y las aguas se concentran en el rota vapor, obteniéndose un precipitado, secarlo a vacío. El sólido se cristaliza en isopropanol (100mL a 100°C). Filtrar a vacío y dejar secar en la estufa (rendimiento 65,7%); el espectro RMN fue consistente con el descrito en la literatura.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.88 – 6.74 (m, 5H), 4.45 (d, *J* = 21.5 Hz, 1H), 2.77 (ddd, *J* = 19.3, 14.1, 5.7 Hz, 2H), 2.38 (s, 4H), 1.25 – 1.03 (m, 2H), 0.94 (s, 9H).

- Síntesis de Boc-PheCst

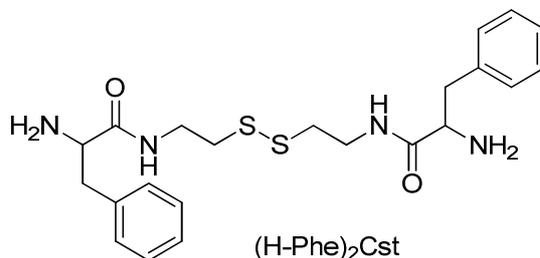


Se disuelve la cistamina (0,932 g, 4,139 moles, 1,000 eq) en 40mL de THF y se adiciona 1,15mL de *ET*<sub>3</sub>*N* (0,838 g, 0,728 mL, 0,828 moles, 2,000 eq) la mezcla se mantiene en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. se añade gota a gota, mediante un embudo de adición compensada, una disolución de BocPheOSu (2,287 g, 8,278 moles, 2,000 eq) en 55 mL de THF. la reacción se mantiene en agitación a 55°C y en una atmósfera = N<sub>2</sub> durante la noche.

Al día siguiente se rota evapora, se filtra al vacío, se realizaron lavados con agua destilada y NaOH 0,1 M en igual cantidad y lavados solo con agua destilada hasta alcanzar un pH = 7 (neutro); finalmente se colocó el sólido en la estufa de vacío a 50°C y se 24 horas. (Rendimiento 82,7%)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.48 – 7.04 (m, 10H), 4.37 (d, *J* = 85.6 Hz, 2H), 3.41 (dd, *J* = 65.6, 35.4 Hz, 4H), 3.12 (d, *J* = 75.9 Hz, 4H), 2.62 (dd, *J* = 65.1, 21.1 Hz, 4H), 1.57 – 1.26 (m, 18H).

- **Síntesis de (H-Phe)<sub>2</sub>Cst**

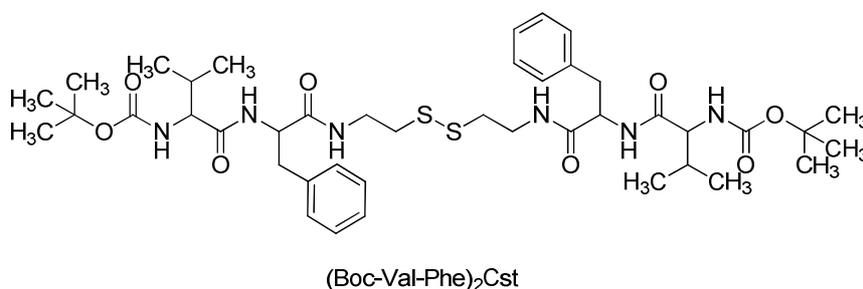


Se disuelven los 2.214 gramos (3,423 moles, 1,000 eq) de Boc-PheCst con 10 mL de diclorometano y se ponen mediante agitación con atmósfera de nitrógeno y se le adiciona 13 mL de TFA mediante jeringa dejando reaccionar por 24 horas.

Pasado el tiempo se rota evapora hasta obtener un aceite. Seguidamente se le adiciono agua destilada y se colocó en el ultrasonido para disolver el aceite y se adiciono un NaOH 1 M hasta que se observó la precipitación de un sólido blanco que se separó por filtración. (Rendimiento 78,5%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.10 (d, *J* = 39.3 Hz, 2H), 8.86 – 8.62 (m, 12H), 4.86 – 4.59 (m, 4H), 4.28 (dq, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 4H), 4.21 – 4.04 (m, 4H), 2.94 (d, *J* = 20.2 Hz, 4H).

- **Síntesis de (Boc-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst**

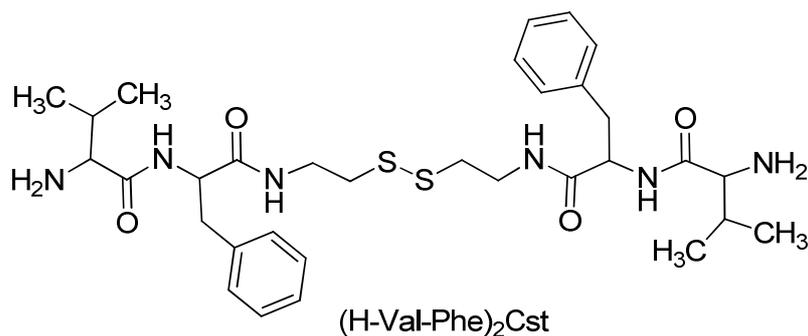


Se adiciona 1,2 gramos (2,687 moles, 1,000 eq) de (H-Phe)<sub>2</sub>Cst y se disuelven con 50 mL de THF. Se pone en agitación a 55°C, se adiciona gota a gota con embudo una disolución de 1,689 gramos (5,374 moles, 2,000 eq) de Boc-Val-Osu y 30 mL de THF, se pone en atmosfera de nitrógeno y se deja 24 horas.

Al día siguiente se rota evapora donde se observa la formación de un gel, el cual se le adiciona una disolución 50 mL de HCl y se coloca en el ultrasonido para obtener un sólido el cual será seguidamente filtrado y lavado con agua destilada hasta obtener un pH = 7. (Rendimiento 97.3%)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.34 – 7.18 (m, 10H), 4.89 (dd, *J* = 15.3, 7.4 Hz, 2H), 4.25 – 3.26 (m, 7H), 3.10 – 2.95 (m, 4H), 2.60 (ddd, *J* = 28.3, 13.5, 6.9 Hz, 4H), 2.07 (tt, *J* = 21.2, 10.6 Hz, 2H), 1.45 – 1.28 (m, 18H), 0.96 – 0.70 (m, 12H).

- **Síntesis de (Val-Phe)<sub>2</sub>Cst**

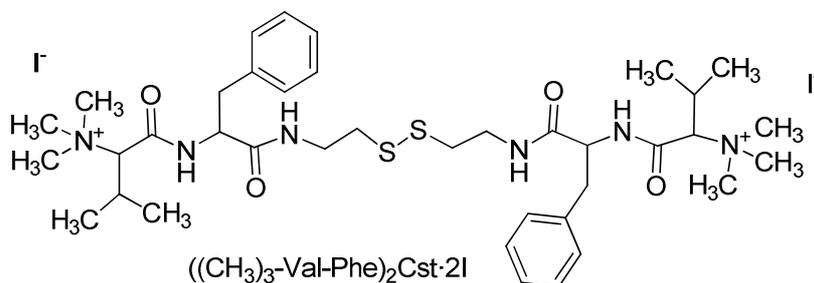


Se pesaron 2.209 gramos (2,614 moles, 1,000 eq) de (Boc-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst, se adicionaron 10 mL de diclorometano y seguidamente 10 mL de TFA con jeringa, por 24 horas en atmosfera de nitrógeno.

Pasado el tiempo se rota evapora, se obtuvo un aceite que se disuelve con agua, se le adiciona NaOH 1 M para precipitar el compuesto como un sólido que se separa por filtración. (rendimiento 95 %)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.23 (dd, *J* = 27.9, 8.5 Hz, 2H), 7.59 – 7.49 (m, 11H), 5.32 – 4.77 (m, 2H), 3.59 – 3.44 (m, 4H), 3.38 – 3.19 (m, 2H), 3.06 – 2.88 (m, 4H), 2.66 – 2.02 (m, 4H), 1.30 – 0.87 (m, 12H).

- **Síntesis de ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Val-Phe)<sub>2</sub> Cst·2I**

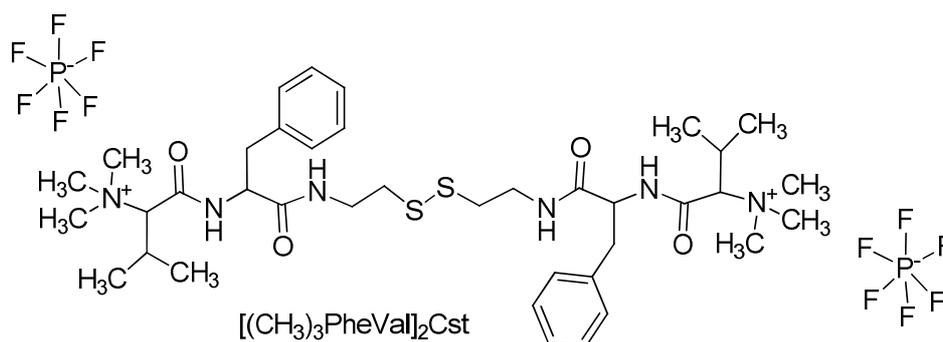


Se disolvió (H-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst (1,850 g, 0,003 moles, 1,000 eq) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,965 g, 0,029 moles, 10,000 eq) en MeCN y se adiciono MeI (4,072 g, 0,029 moles, 10,000 eq). La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno por 24 horas

Work up: Eliminar el carbonato por filtración y evaporar el disolvente, formándose un sólido blanquecino. (rendimiento 97%)

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD)** δ 7.35 – 7.04 (m, 10H), 4.74 (s, 2H), 3.85 – 3.60 (m, 2H), 3.53 – 3.32 (m, 4H), 3.06 (ddd, *J* = 12.3, 10.3, 3.6 Hz, 4H), 2.93 – 2.83 (m, 18H), 2.78 – 2.60 (m, 4H), 2.40 (dtd, *J* = 13.8, 6.9, 2.7 Hz, 2H), 1.22 – 0.89 (m, 12H).

- **Síntesis de  $[(\text{CH}_3)_3\text{ValPhe}]_2\text{Cst}$**

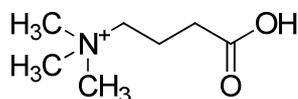


Se disuelve  $(\text{CH}_3)_3\text{Val-Phe})_2\text{Cst}\cdot 2\text{I}$  (2,730 g, 0,003 moles, 1,000 eq) en acetonitrilo (2.3 mL) y se adiciona Hexafluorurofosfato de potasio (1,145 g, 0,006 moles, 2,000 eq) Se deja en agitación y a temperatura ambiente durante toda la noche.

Work up: filtrar a vacío y evaporar el disolvente en el rota vapor, obteniéndose un sólido blanco. Se deja secar el sólido, Se realizan separación cromatográfica para purificar el producto (metanol-acetato de etilo) (rendimiento 35,3%)

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, MeOD)  $\delta$  7.47 – 7.04 (m, 10H), 5.07 – 4.78 (m, 2H), 3.92 – 3.61 (m, 2H), 3.38 (ddt,  $J = 14.9, 3.3, 1.7$  Hz, 8H), 3.16 – 2.88 (m, 18H), 2.89 – 2.71 (m, 4H), 2.56 – 2.38 (m, 2H), 1.36 – 0.83 (m, 12H).

### 5.1. Síntesis de Bromuro de ácido N-trimetil-3-aminopropionico (Acetonitrilo)

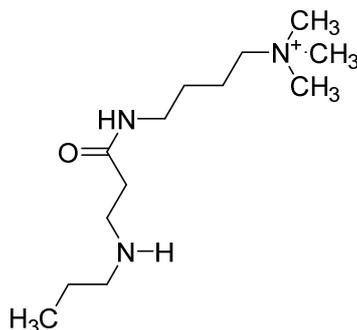


N-trimethyl-3-aminopropionic acid bromide

Se peso 1 gramo (0,007 moles, 1,000 eq) de ácido 3-bromopropionico y se adiciono 5 mL de acetonitrilo, seguidamente se adiciono 2,5 mL (1,171 g, 0,007 moles, 1,000 eq) de trimetilamina y se dejó en agitación a temperatura ambiente hasta el día siguiente se rota evaporó y se observó la formación de un sólido blanco y se puso a secar a vacío. (Rendimiento 100%)

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  3.72 – 3.63 (m, 2H), 3.37 – 3.26 (m, 2H), 3.18 (s, 9H), 2.88 (ddd,  $J = 8.7, 2.8, 1.4$  Hz, 2H).

## 5.2. Síntesis de N,N,N-trimethyl-2-((3 (propilamino) propanoyl)oxy) ethanaminium

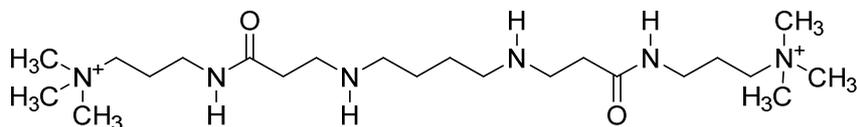


ATAC-N-Propilamina

Se pusieron 2,8 mL (2,010 g, 0,034 moles, 1,000 eq) de propilamina y se adiciono 5,2 mL (5,772 g, 0,025 moles, 0,743 eq) de ATAC se puso en baño de hielo toda la noche en agitación, al día siguiente se rota evaporó hasta disminuir su volumen, se tomó el espectro RMN en DMSO deuterado.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)** δ 0.97 – 0.87 (m, 2H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 0.68 (s, 9H), 0.41 – 0.29 (m, 2H), 0.08 (dd, *J* = 8.3, 6.3 Hz, 2H), -0.35 – -0.54 (m, 2H), -0.90 – -1.06 (m, 2H), -1.51 – -1.63 (m, 2H).

## 5.3. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>20</sup>,N<sup>20</sup>-hexamethyl-5,16-dioxo-4,8,13,17-tetrazaicosane-1,20-diaminium



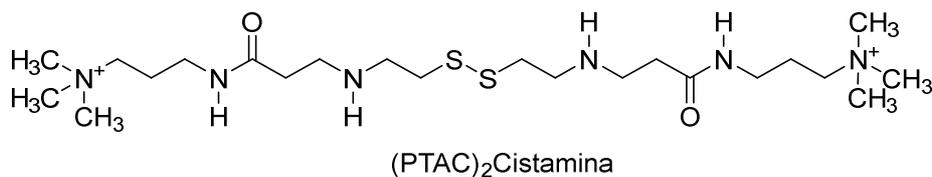
(PTAC)<sub>2</sub>Putrescina

Se adiciono 11.437gramos (10,3 mL, 50,087 moles, 2,00 eq) de ATAC junto con 2,230 gramos (2,5 mL, 25,044 moles, 1,000 eq) 1,4-diamonobutano y se colocó en baño de hielo 24 horas.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 3.35 – 3.23 (m, 4H), 3.24 – 3.15 (m, 4H), 3.05 (s, 18H), 2.83 – 2.68 (m, 4H), 2.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.04 – 1.84 (m, 4H), 1.40 (s, 4H).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)** δ 8.60 – 8.19 (m, 1H), 3.58 – 3.23 (m, 8H), 3.24 – 2.92 (m, 18H), 2.83 – 2.58 (m, 4H), 2.51 – 2.39 (m, 4H), 2.20 (dd, *J* = 30.5, 23.6 Hz, 4H), 2.02 – 1.60 (m, 4H), 1.33 (ddd, *J* = 16.6, 8.9, 2.9 Hz, 4H).

#### 5.4. Síntesis de N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>22</sup>,N<sup>22</sup>,N<sup>22</sup>-hexamethyl-5,18-dioxo-11,12-dithia-4,8,15,19-tetraazadocosane-1,22-diaminium.



Se adiciono 2 gramos (2,5 mL, 0,012 moles, 2,222 eq) de (ATAC) con cistamina (0,840 g, 0,006 moles, 1,000 eq) y se colocó en baño de hielo hasta el siguiente día.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.98 – 2.92 (m, 4H), 2.91 – 2.86 (m, 4H), 2.72 (s, 18H), 2.56 – 2.49 (m, 4H), 2.47 – 2.40 (m, 8H), 2.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H), 1.68 – 1.58 (m, 4H).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.40 (dt, *J* = 11.4, 5.7 Hz, 2H), 3.40 – 3.31 (m, 8H), 3.17 – 2.98 (m, 18H), 2.83 – 2.43 (m, 12H), 2.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H), 1.82 (tt, *J* = 21.7, 10.8 Hz, 4H).

#### 5.5. Procedimiento de preparación muestras para fluorescencia

Todas las mediciones de fluorescencia se realizaron en cubetas de trayectoria óptica de 10 mm en un espectro fluorómetro JASCO FP-8300 a 25 °C. Se preparó una solución de 1 μM de pireno diluyendo 475 μL de una disolución de pireno de 53 μM en THF en tampón PBS pH=7,4.

## **Bibliografía**



## 6. Bibliografía

1. EwaObląka, AgataPiecucha, Anna Krasowskab, Jacek Łuczyńskic, Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salt, *Microbiological Research* 168 (2013) 630–638, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.001>.
2. G, M. & AD, R. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews* **12**, 147–179 (1999).
3. Bureš, F. Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Topics in Current Chemistry* 2019 377:3 **377**, 1–21 (2019).
4. Sekhon, B. S. Gemini (dimeric) surfactants. *Resonance* 2004 9:3 **9**, 42–49 (2004).
5. Wang, C. *et al.* Investigation of complexes formed by interaction of cationic gemini surfactants with deoxyribonucleic acid. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 1616–1628 (2007).
6. Campanhã, M. T. N., Mamizuka, E. M. & Carmona-Ribeiro, A. M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: The physical- chemistry of the bactericidal action. *Journal of Lipid Research* **40**, 1495–1500 (1999).
7. Willyard, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature* **543**, 15 (2017).
8. Patra, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* 2018 16:1 **16**, 1–33 (2018).
9. Baranwal, A. *et al.* Prospects of Nanostructure Materials and Their Composites as Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology* **0**, 422 (2018).
10. Öztürk, A. A., Aygül, A. & Şenel, B. Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **54**, 101240 (2019).
11. Sheehan, J. C. & Hess, G. P. A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1067–1068 (1955).
12. Stawikowski, M. & Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* **CHAPTER**, Unit (2002).
13. Ben-Ishai, D. & Berger, A. Cleavage of n-carbobenzoxy groups by dry hydrogen bromide and hydrogen chloride. *Journal of Organic Chemistry* **17**, 1564–1570 (1952).
14. DS, T., Y, Y. & BM, P. New Method to Prepare N-t-Butoxycarbonyl Derivatives and the Corresponding Sulfur Analogs from di-t-Butyl Dicarboxate or di-t-Butyl

- Dithiol Dicarbonates and Amino Acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**, 730–732 (1972).
15. Carpino, L. A. Oxidative Reactions of Hydrazines. II. Isophthalimides. New Protective Groups on Nitrogen<sup>1,2</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 98–101 (2002).
  16. Okada, Y. Synthesis of Peptides by Solution Methods. *Current Organic Chemistry* **5**, 1–43 (2005).
  17. Armstrong, A., Brackenridge, I., Jackson, R. F. W. & Kirk, J. M. A new method for the preparation of tertiary butyl ethers and esters. *Tetrahedron Letters* **29**, 2483–2486 (1988).
  18. Vollhardt, K. P. C., Albericio Palomera, F., Andreu Martínez, D. & Pons Vallès, M. *Química orgánica*. (1990).
  19. YUE, B., LU, P., MA, Y. & XIE, Z. The organic photoelectric functions and applications in organic light-emitting diodes of aggregation-induced emission molecules. *SCIENTIA SINICA Chimica* **43**, 1065–1077 (2013).
  20. Ananthapadmanabhan, K. P., Goddard, E. D., Turro, N. J. & Kuos, P. L. Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* **1**, 352–355 (1985).
  21. Eleraky, N. E., Allam, A., Hassan, S. B. & Omar, M. M. Nanomedicine fight against antibacterial resistance: An overview of the recent pharmaceutical innovations. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
  22. Rydzik, A. M. *et al.* Comparison of the substrate selectivity and biochemical properties of human and bacterial  $\gamma$ -butyrobetaine hydroxylase. *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**, 6354–6358 (2014).
  23. Goodman M. 2002. Houben-Weyl Methods of Organic . 4th Edition.
  24. Aue, W. P., Bartholdi, E. & Ernst, R. R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. (1976).

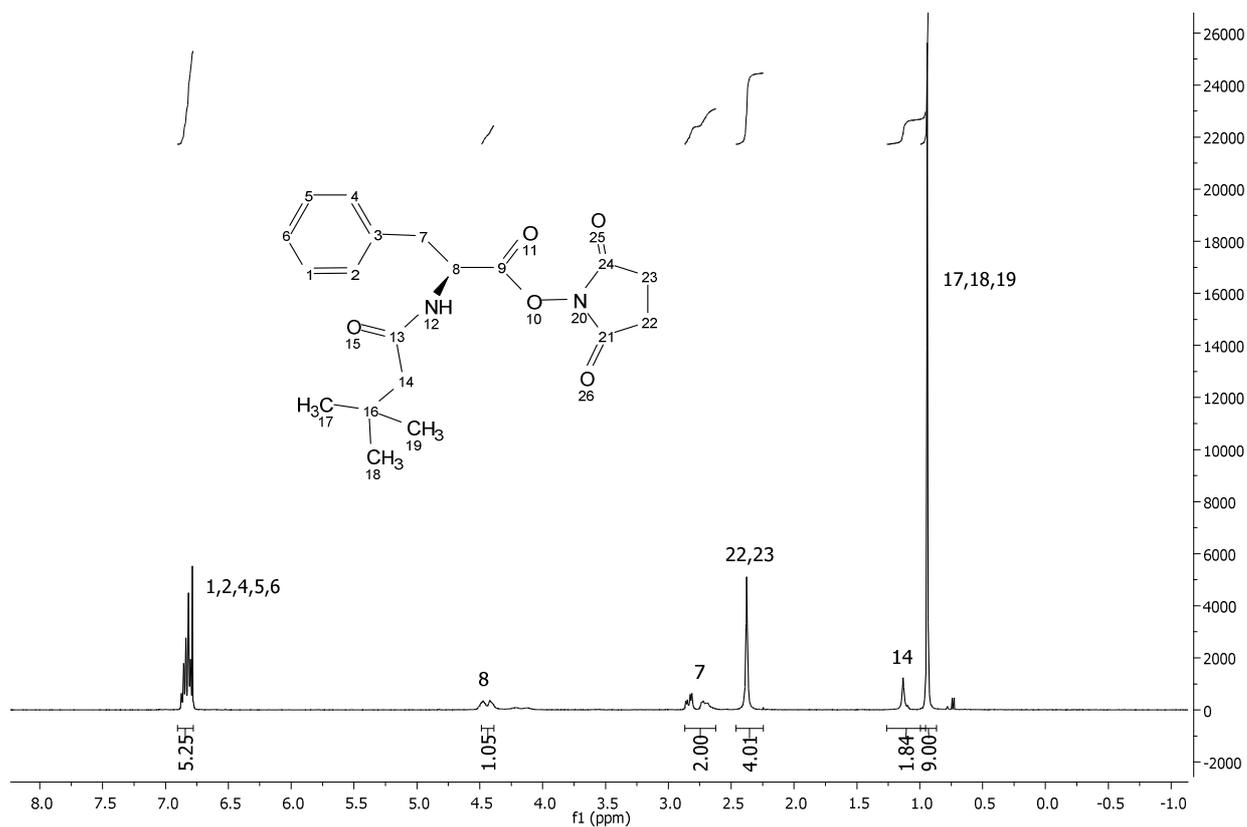
## **Anexos**



## 7. Anexos

### 7.1. ESPECTROS RMN

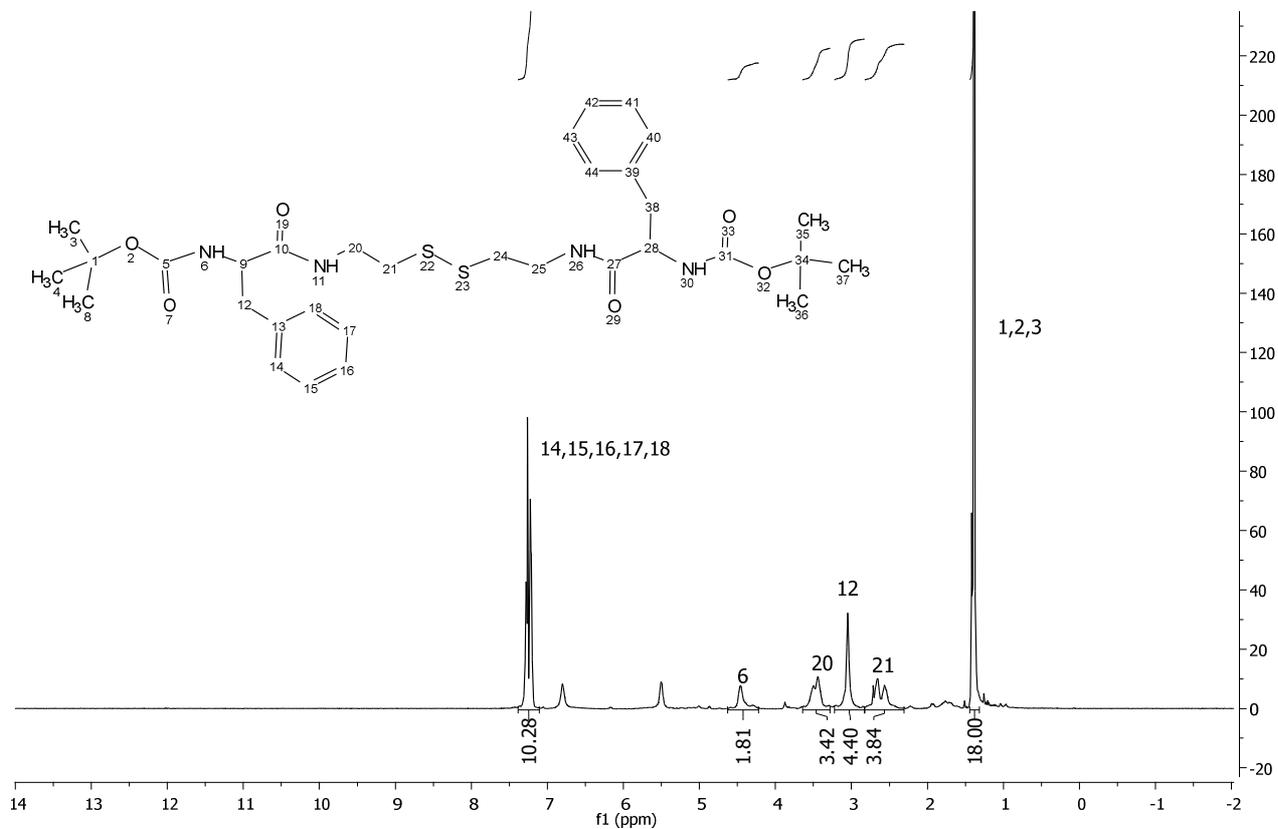
#### 7.1.1. Síntesis de Boc-Phe-Osu



**Figura 15.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) de Boc-Phe-Osu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.88 – 6.74 (m, 5H), 4.45 (d,  $J$  = 21.5 Hz, 1H), 2.77 (ddd,  $J$  = 19.3, 14.1, 5.7 Hz, 2H), 2.38 (s, 4H), 1.25 – 1.03 (m, 2H), 0.94 (s, 9H).

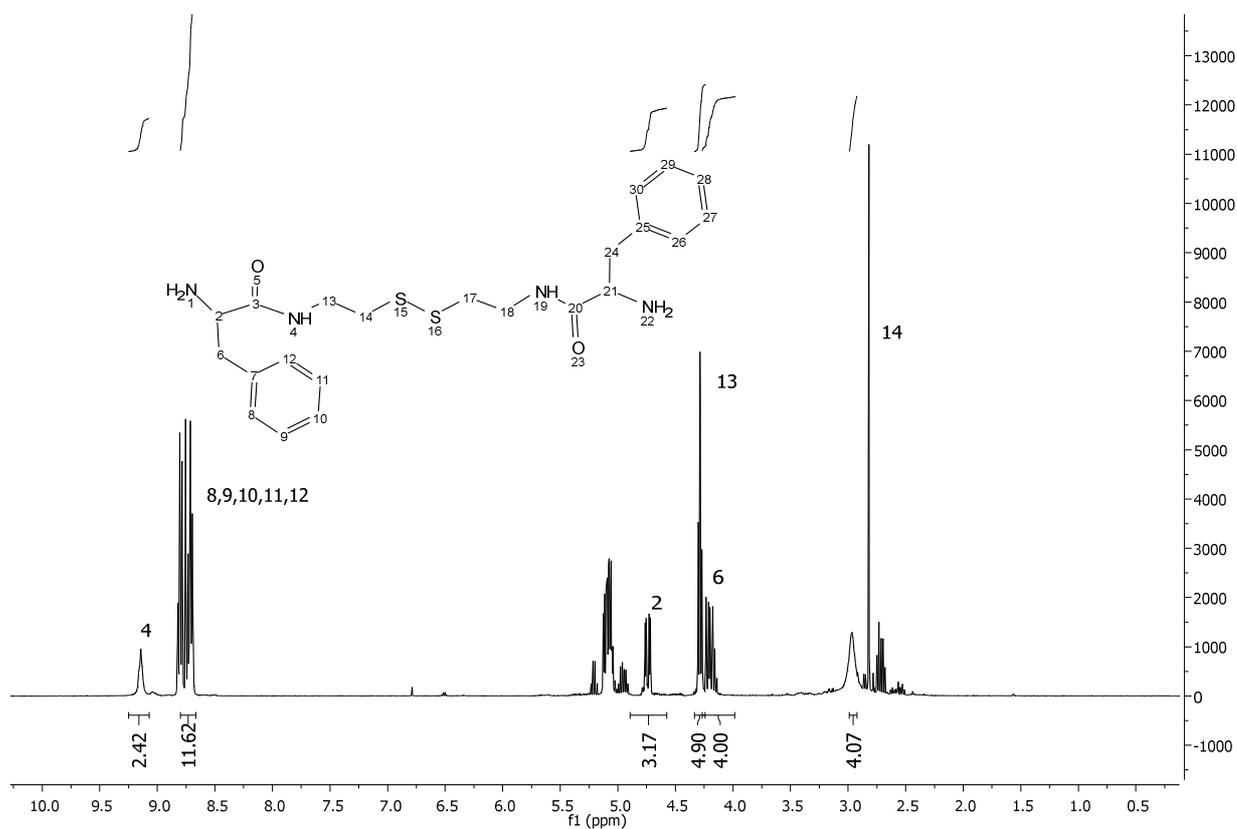
## 7.1.2. Síntesis de (Boc-Phe)<sub>2</sub>Cst



**Figura 16.** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) de (Boc-Phe)<sub>2</sub>Cst

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.48 – 7.04 (m, 10H), 4.37 (d, *J* = 85.6 Hz, 2H), 3.41 (dd, *J* = 65.6, 35.4 Hz, 4H), 3.12 (d, *J* = 75.9 Hz, 4H), 2.62 (dd, *J* = 65.1, 21.1 Hz, 4H), 1.57 – 1.26 (m, 18H).

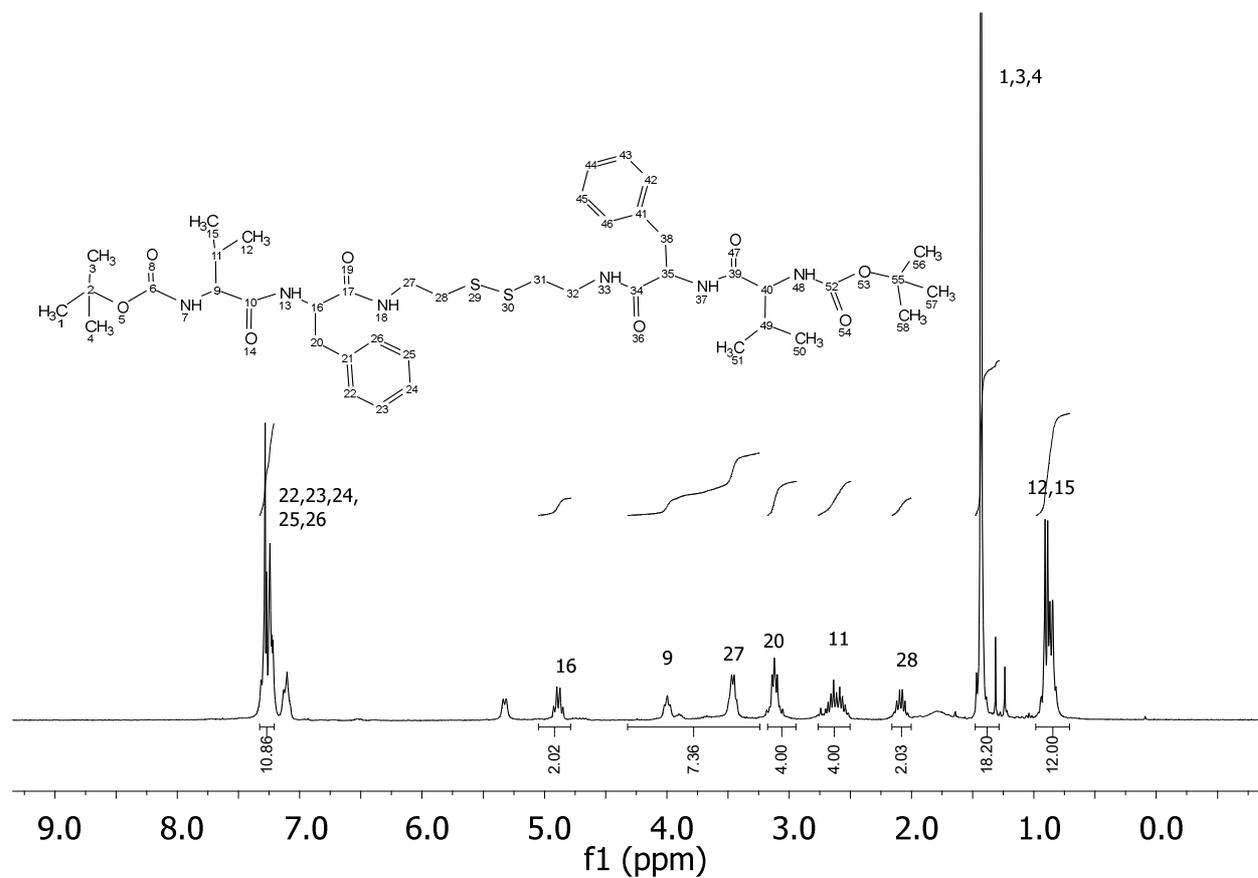
### 7.1.3. Síntesis de (H-Phe)<sub>2</sub>Cst



**Figura 17.** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) de (H-Phe)<sub>2</sub>Cst

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 9.10 (d, *J* = 39.3 Hz, 2H), 8.86 – 8.62 (m, 12H), 4.86 – 4.59 (m, 4H), 4.28 (dq, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 4H), 4.21 – 4.04 (m, 4H), 2.94 (d, *J* = 20.2 Hz, 4H).

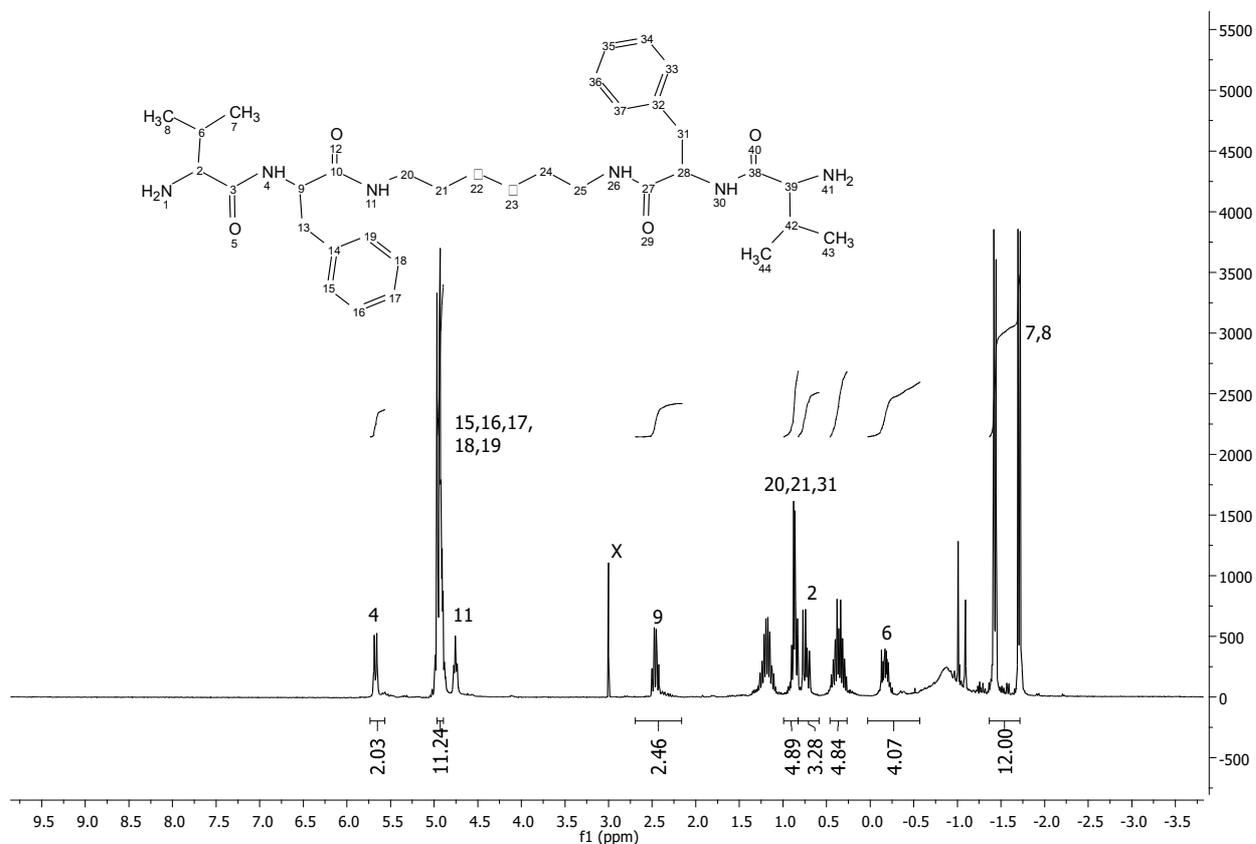
### 7.1.4. Síntesis de (Boc-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst



**Figura 18.** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) de (Boc-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.34 – 7.18 (m, 10H), 4.89 (dd, *J* = 15.3, 7.4 Hz, 2H), 4.25 – 3.26 (m, 7H), 3.10 – 2.95 (m, 4H), 2.60 (ddd, *J* = 28.3, 13.5, 6.9 Hz, 4H), 2.07 (tt, *J* = 21.2, 10.6 Hz, 2H), 1.45 – 1.28 (m, 18H), 0.96 – 0.70 (m, 12H).

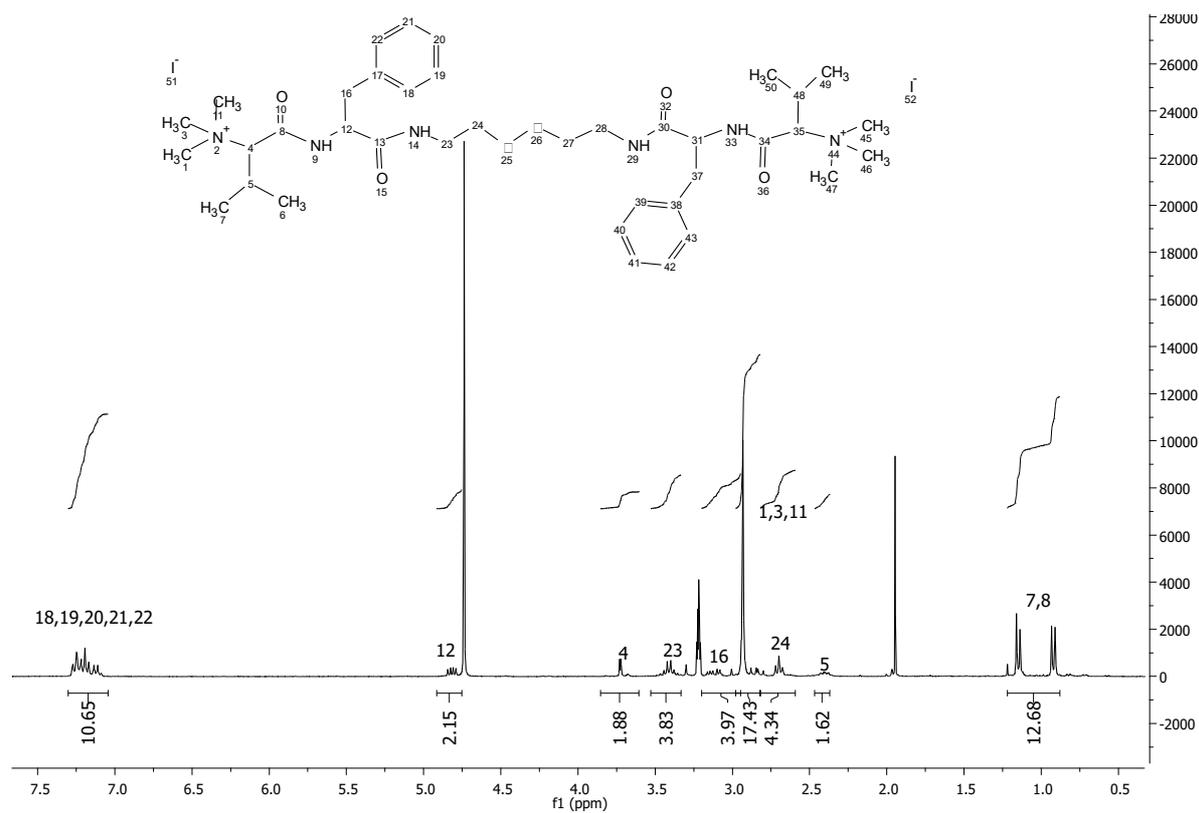
### 7.1.5. Síntesis de (H-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst



**Figura 19.** <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) de (H-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.23 (dd, *J* = 27.9, 8.5 Hz, 2H), 7.59 – 7.49 (m, 11H), 5.32 – 4.77 (m, 2H), 3.59 – 3.44 (m, 4H), 3.38 – 3.19 (m, 2H), 3.06 – 2.88 (m, 4H), 2.66 – 2.02 (m, 4H), 1.30 – 0.87 (m, 12H).

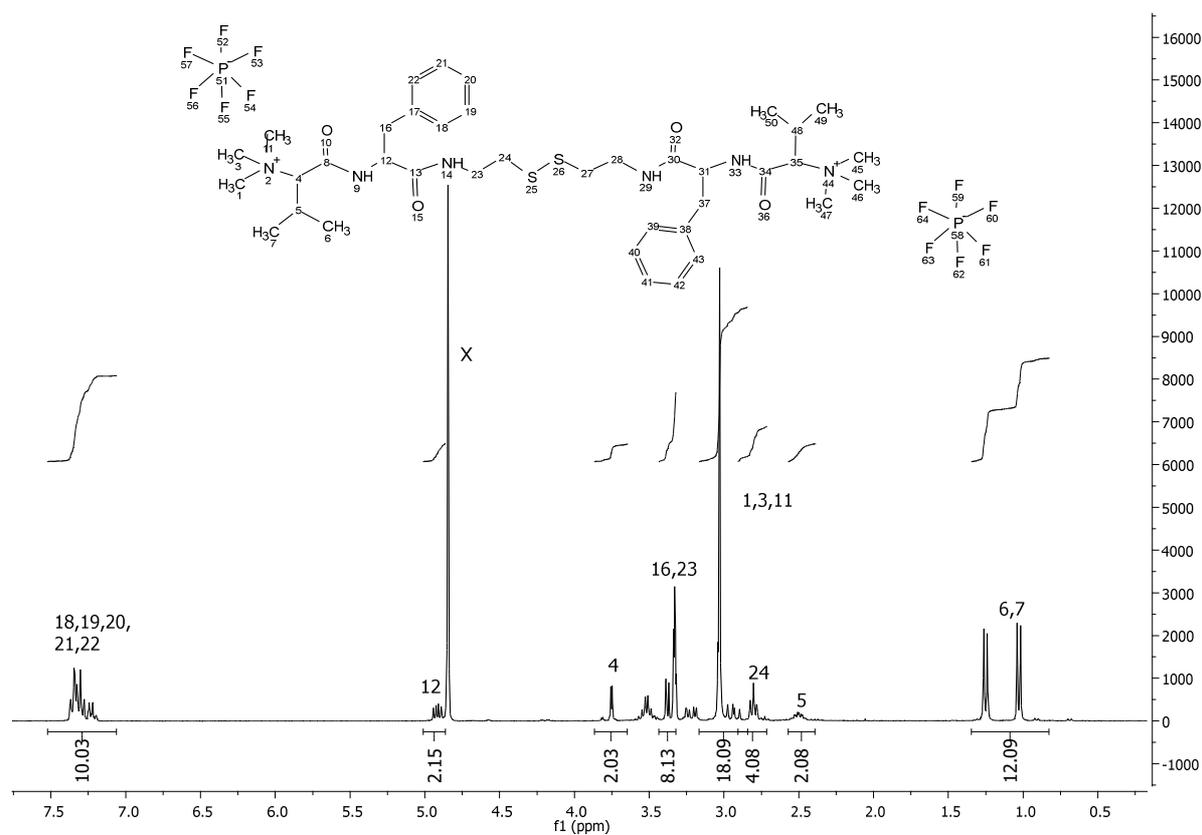
### 7.1.6. Síntesis de ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst-2I



**Figura 20.** <sup>1</sup>H RMN (MeOD) de ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst-2I

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) δ** 7.35 – 7.04 (m, 10H), 4.74 (s, 2H), 3.85 – 3.60 (m, 2H), 3.53 – 3.32 (m, 4H), 3.06 (ddd, *J* = 12.3, 10.3, 3.6 Hz, 4H), 2.93 – 2.83 (m, 18H), 2.78 – 2.60 (m, 4H), 2.40 (dtd, *J* = 13.8, 6.9, 2.7 Hz, 2H), 1.22 – 0.89 (m, 12H).

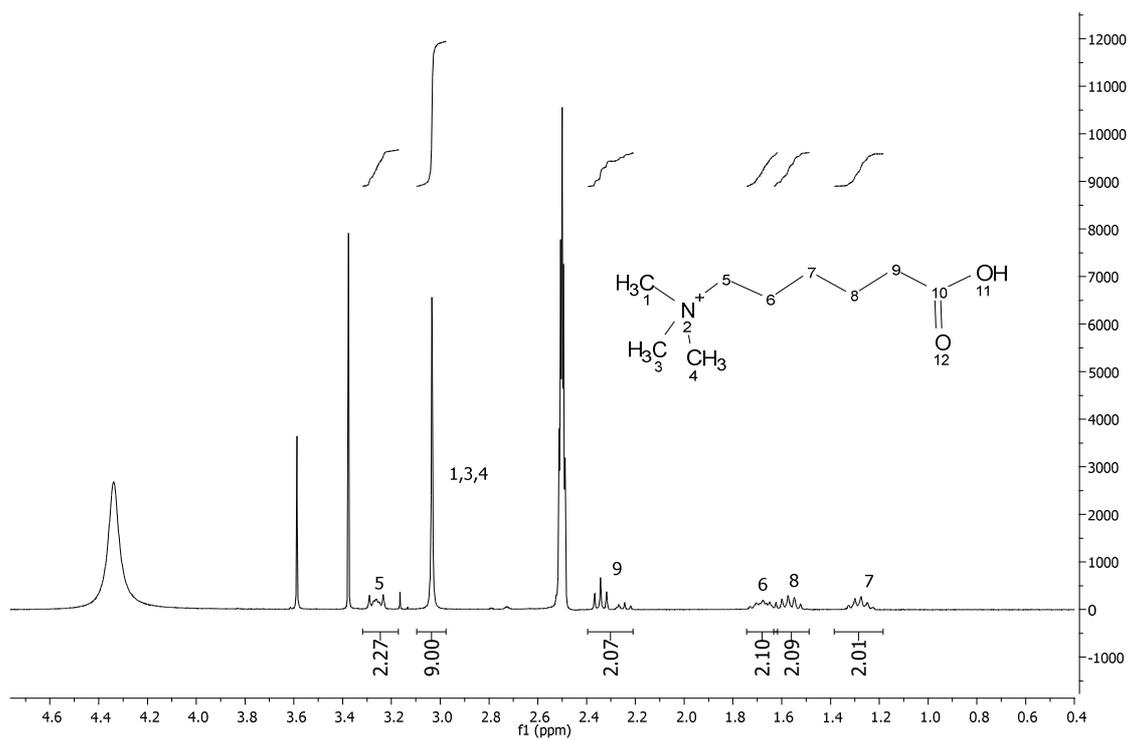
### 7.1.7. Síntesis de ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst



**Figura 21.** <sup>1</sup>H RMN (MeOD) de ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Val-Phe)<sub>2</sub>Cst

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD) δ** 7.47 – 7.04 (m, 10H), 5.07 – 4.78 (m, 2H), 3.92 – 3.61 (m, 2H), 3.38 (ddt, *J* = 14.9, 3.3, 1.7 Hz, 8H), 3.16 – 2.88 (m, 18H), 2.89 – 2.71 (m, 4H), 2.56 – 2.38 (m, 2H), 1.36 – 0.83 (m, 12H).

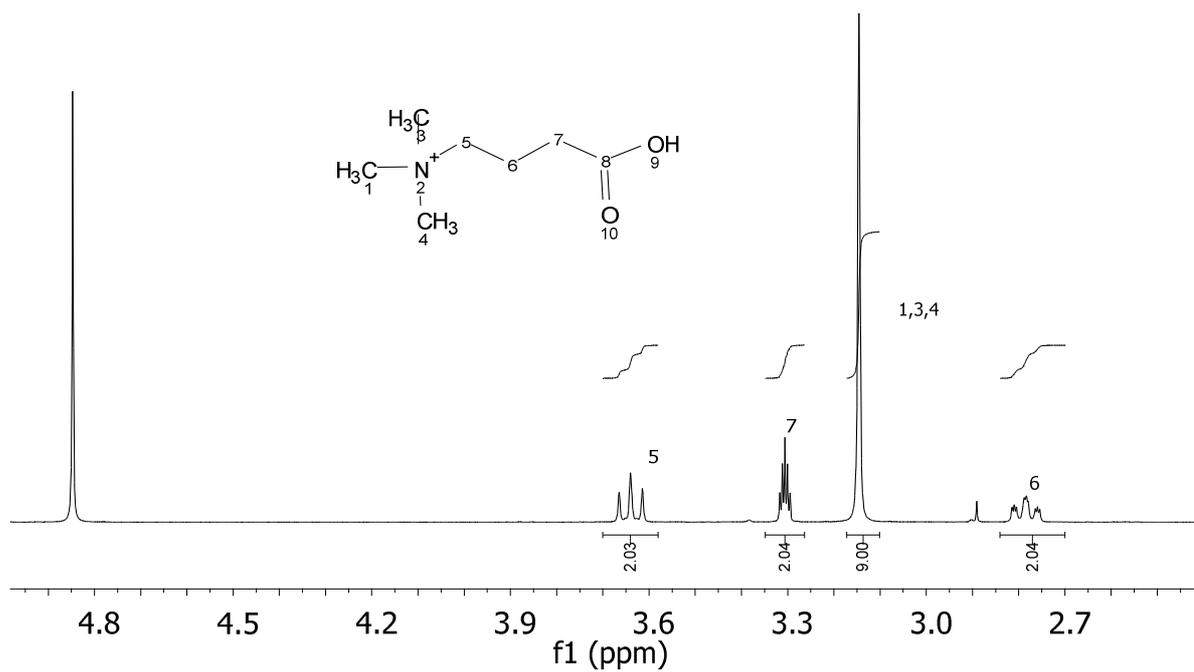
### 7.1.8. Síntesis de 5-carboxipentil(trimetil)azanio



**Figura 22.**  $^1\text{H}$  RMN (DMSO) de 5-carboxipentil(trimetil)azanio

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  3.34 – 3.16 (m, 2H), 3.03 (s, 9H), 2.40 – 2.19 (m, 2H), 1.77 – 1.62 (m, 2H), 1.55 (dt,  $J = 15.7, 7.9$  Hz, 2H), 1.37 – 1.17 (m, 2H).

### 7.1.9. Síntesis de Bromuro de ácido N-trimetil-3-aminopropionico



**Figura 23.** <sup>1</sup>H RMN (MeOD) de Bromuro de ácido N-trimetil-3-aminopropionico

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD)** δ 3.76 – 3.56 (m, 2H), 3.31 (dt,  $J = 3.3, 1.6$  Hz, 2H), 3.15 (s, 9H), 2.85 – 2.69 (m, 2H).



7.1.11. Síntesis N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>20</sup>,N<sup>20</sup>-hexamethyl-5,16-dioxo-4,8,13,17-tetrazaicosane-1,20-diaminium ((PTAC)<sub>2</sub>Putrescina)

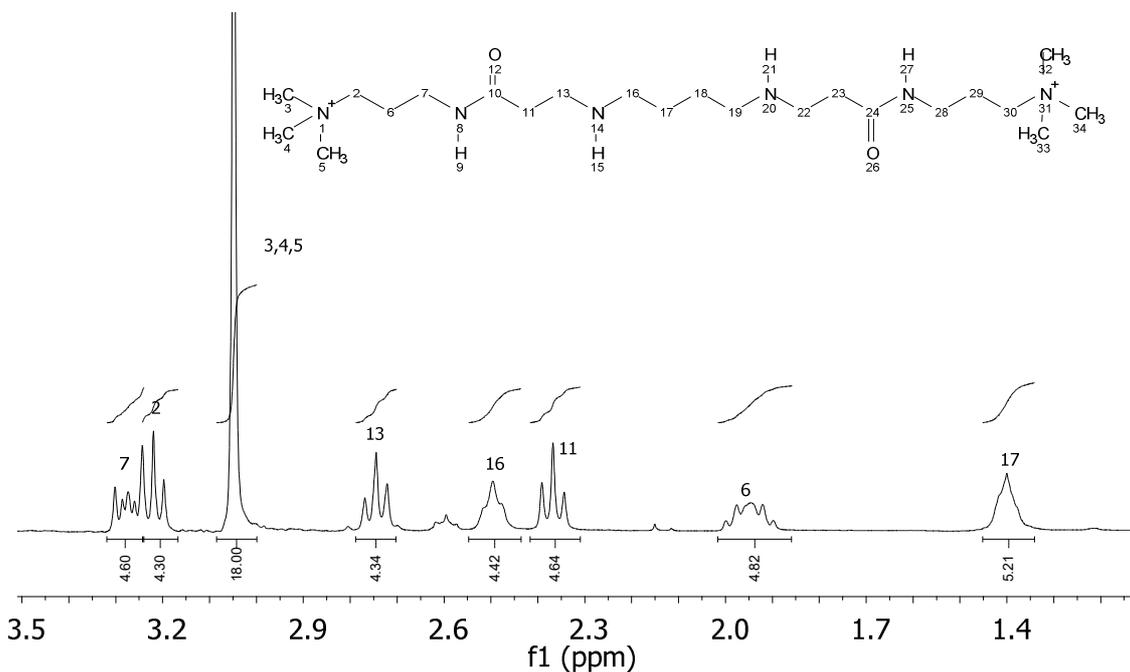


Figura 25. <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) de (PTAC)<sub>2</sub>Putrescina

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.35 – 3.23 (m, 4H), 3.24 – 3.15 (m, 4H), 3.05 (s, 18H), 2.83 – 2.68 (m, 4H), 2.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.04 – 1.84 (m, 4H), 1.40 (s, 4H).

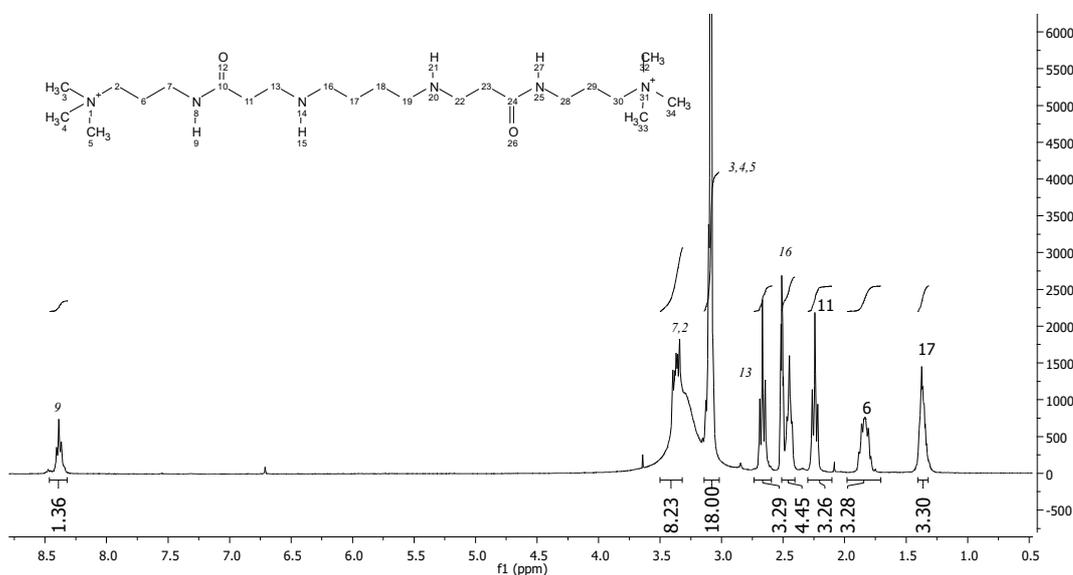
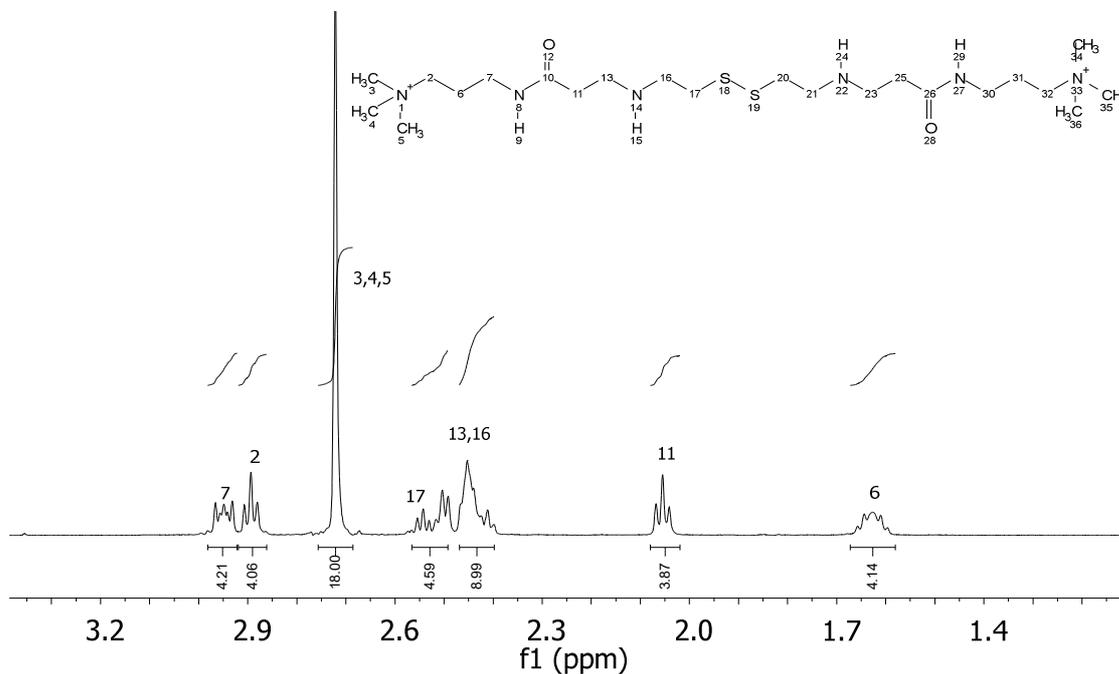


Figura 26. <sup>1</sup>H RMN (DMSO) de (PTAC)<sub>2</sub>Putrescina

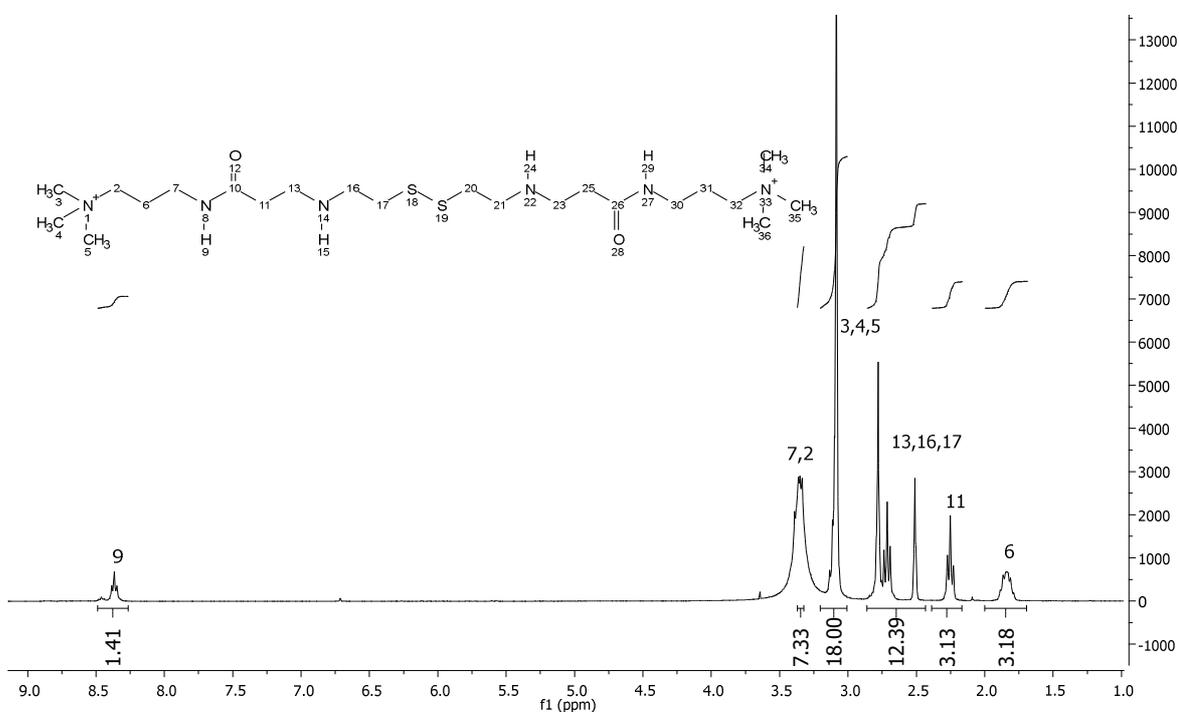
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.60 – 8.19 (m, 1H), 3.58 – 3.23 (m, 8H), 3.24 – 2.92 (m, 18H), 2.83 – 2.58 (m, 4H), 2.51 – 2.39 (m, 4H), 2.20 (dd, *J* = 30.5, 23.6 Hz, 4H), 2.02 – 1.60 (m, 4H), 1.33 (ddd, *J* = 16.6, 8.9, 2.9 Hz, 4H).

**7.1.12. Síntesis (PTAC)<sub>2</sub>Cistamina N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>22</sup>,N<sup>22</sup>,N<sup>22</sup>-hexamethyl-5,18-dioxo-11,12-dithia-4,8,15,19-tetraazadocosane-1,22-diaminium. ((PTAC)<sub>2</sub>Cistamina)**



**Figura 27.** <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O) de (PTAC)<sub>2</sub>Cistamina

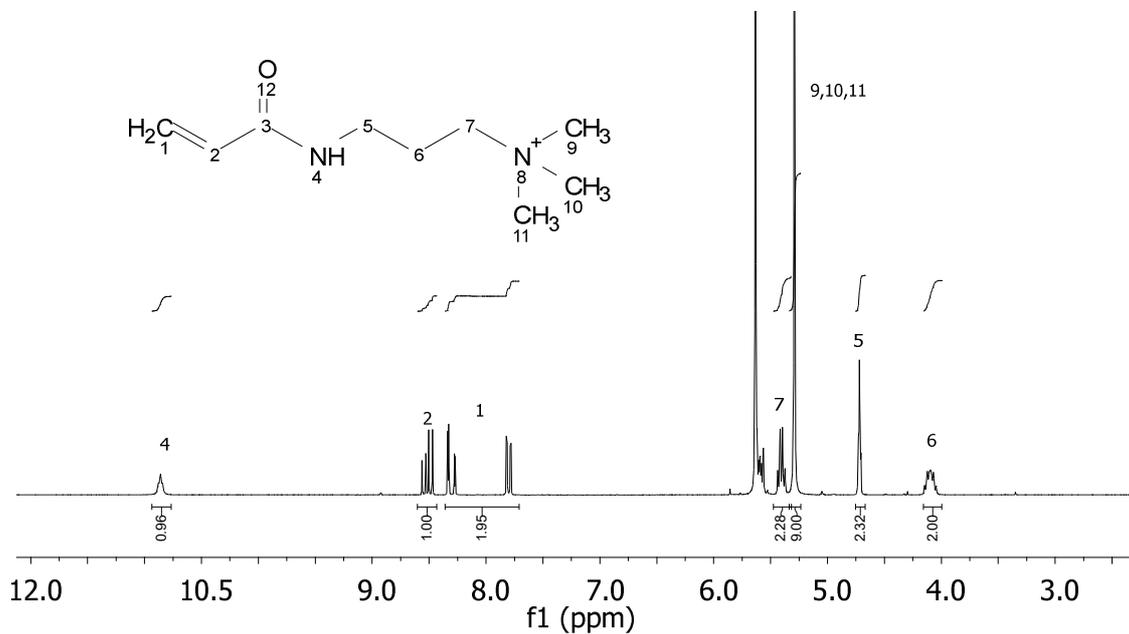
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.98 – 2.92 (m, 4H), 2.91 – 2.86 (m, 4H), 2.72 (s, 18H), 2.56 – 2.49 (m, 4H), 2.47 – 2.40 (m, 8H), 2.05 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 1.68 – 1.58 (m, 4H).



**Figura 28.** <sup>1</sup>H RMN (DMSO) de (PTAC)<sub>2</sub>Cistamina

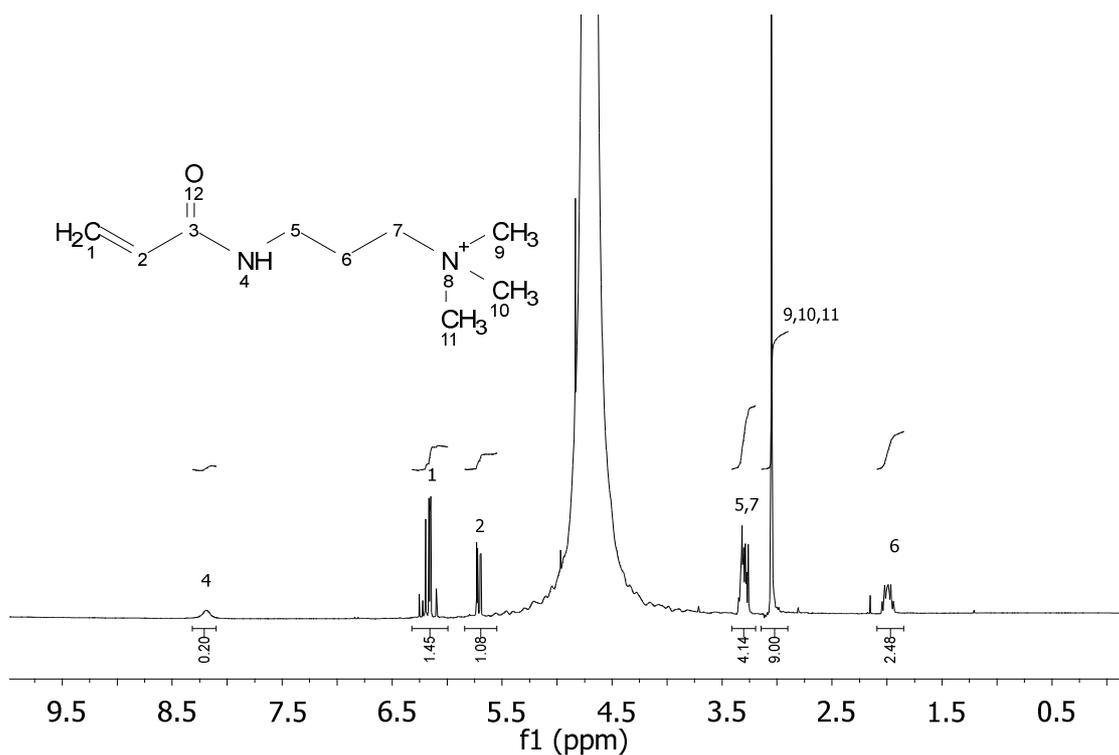
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)** δ 8.40 (dt, *J* = 11.4, 5.7 Hz, 2H), 3.40 – 3.31 (m, 8H), 3.17 – 2.98 (m, 18H), 2.83 – 2.43 (m, 12H), 2.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H), 1.82 (tt, *J* = 21.7, 10.8 Hz, 4H).

**7.1.13. RMN (3-Acrylamidopropyl) trimethyl-ammonium chloride solution(ATAC)**



**Figura 29.** <sup>1</sup>H RMN (DMSO) del ATAC

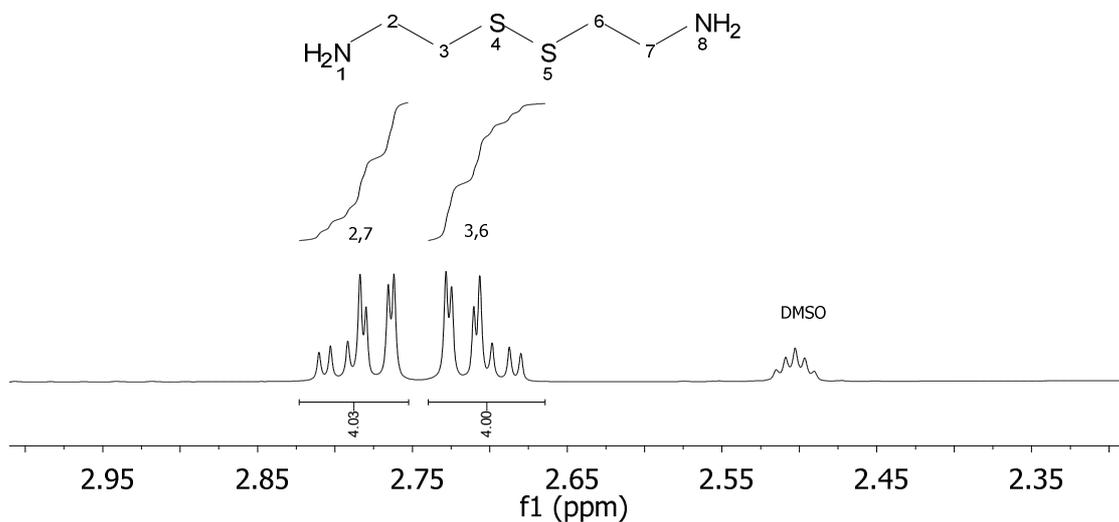
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)** δ 10.86 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 8.52 (dd, *J* = 17.1, 10.1 Hz, 1H), 8.31 – 7.73 (m, 2H), 5.49 – 5.34 (m, 2H), 5.29 (s, 9H), 4.78 – 4.66 (m, 2H), 4.16 – 3.97 (m, 2H).



**Figura 30.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ATAC

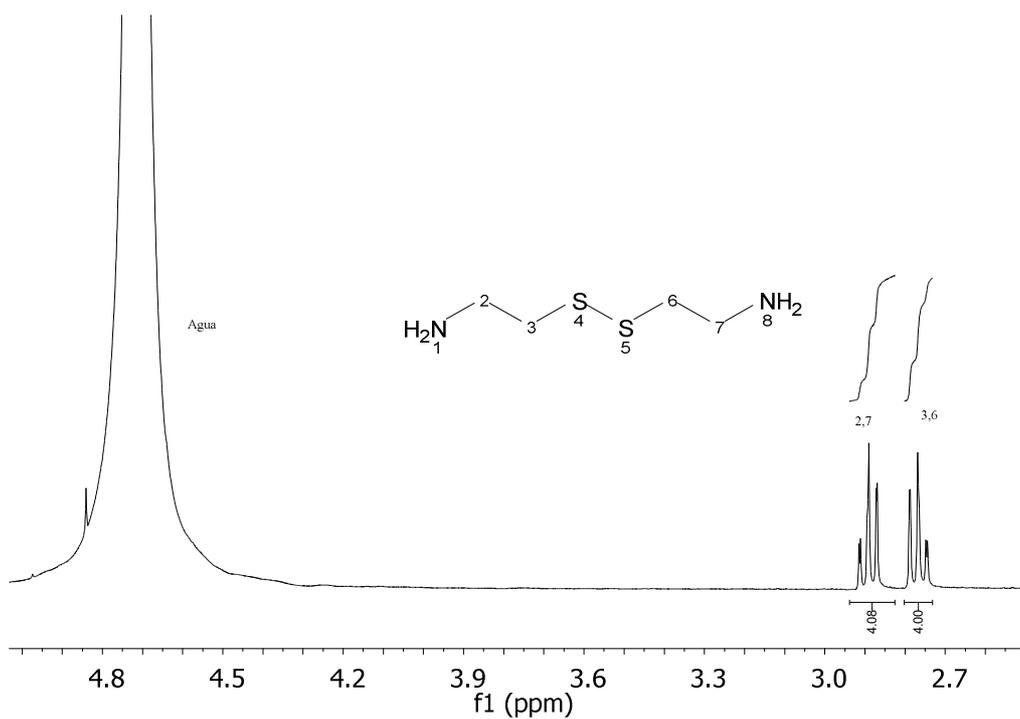
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.13 (d,  $J = 34.4$  Hz, 1H), 6.36 – 5.93 (m, 2H), 5.83 – 5.60 (m, 1H), 3.41 – 3.21 (m, 4H), 3.05 (s, 9H), 2.09 – 1.86 (m, 2H).

#### 7.1.14. RMN de la cistamina



**Figura 31.**  $^1\text{H}$  RMN(DMSO) de la cistamina

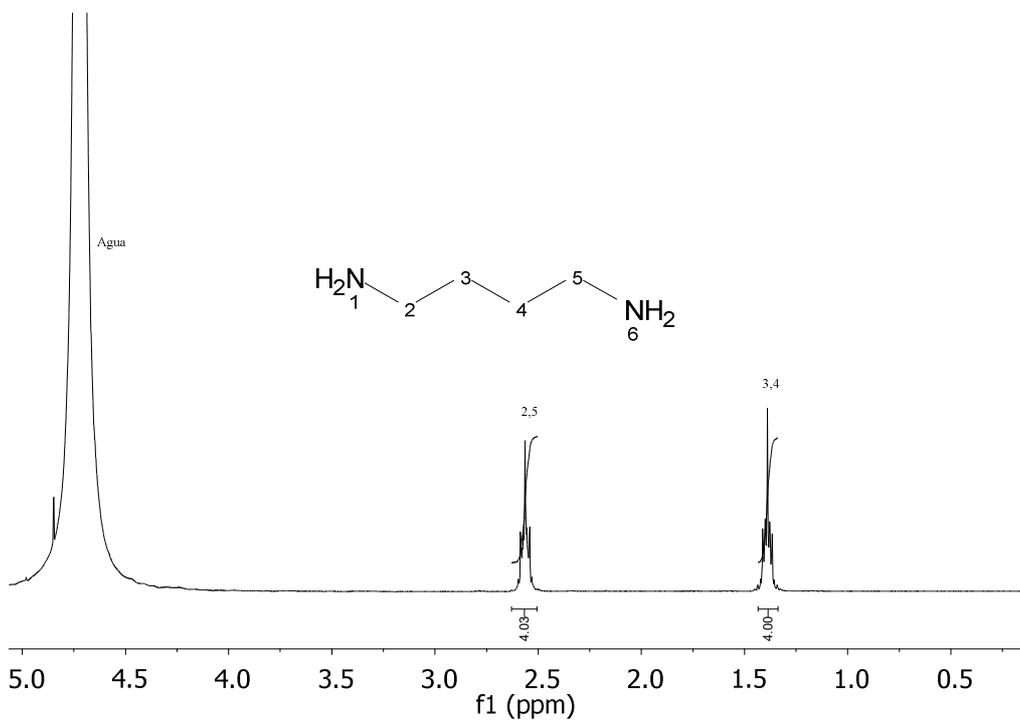
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  2.82 – 2.75 (m, 4H), 2.74 – 2.68 (m, 4H).



**Figura 32.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de la cistamina

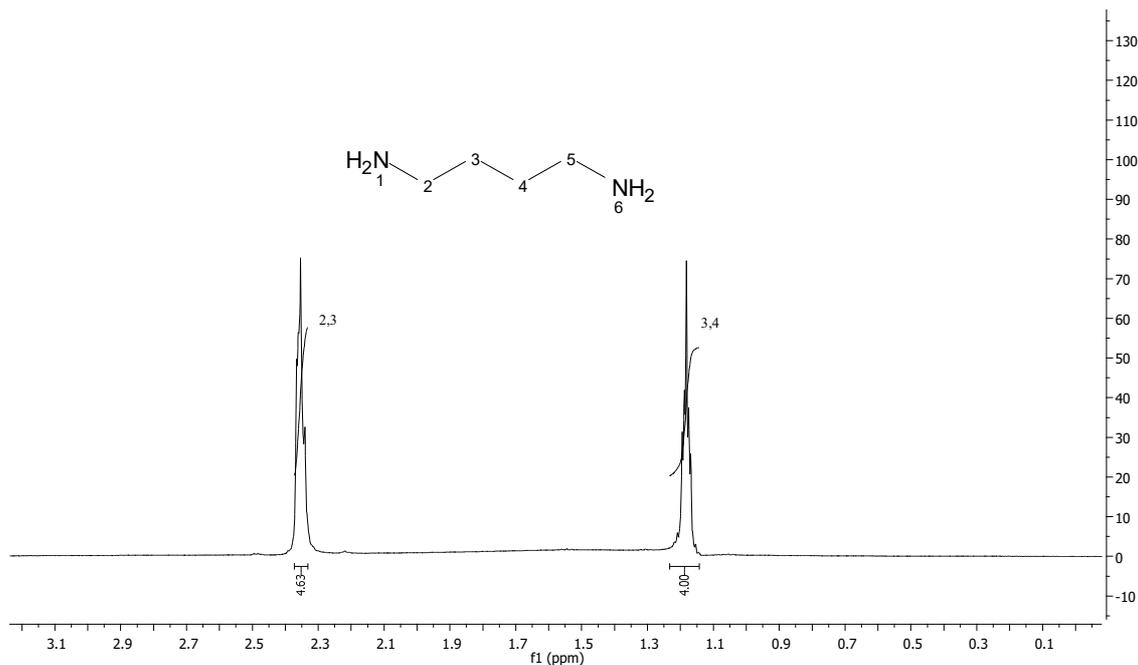
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2.94 – 2.84 (m, 4H), 2.82 – 2.72 (m, 4H).

#### 7.1.15. RMN Putrescina



**Figura 33.**  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de la putrescina

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2.64 – 2.49 (m, 4H), 1.43 – 1.31 (m, 4H).



**Figura 34.**  $^1\text{H}$  RMN (DMSO) de la putrescina

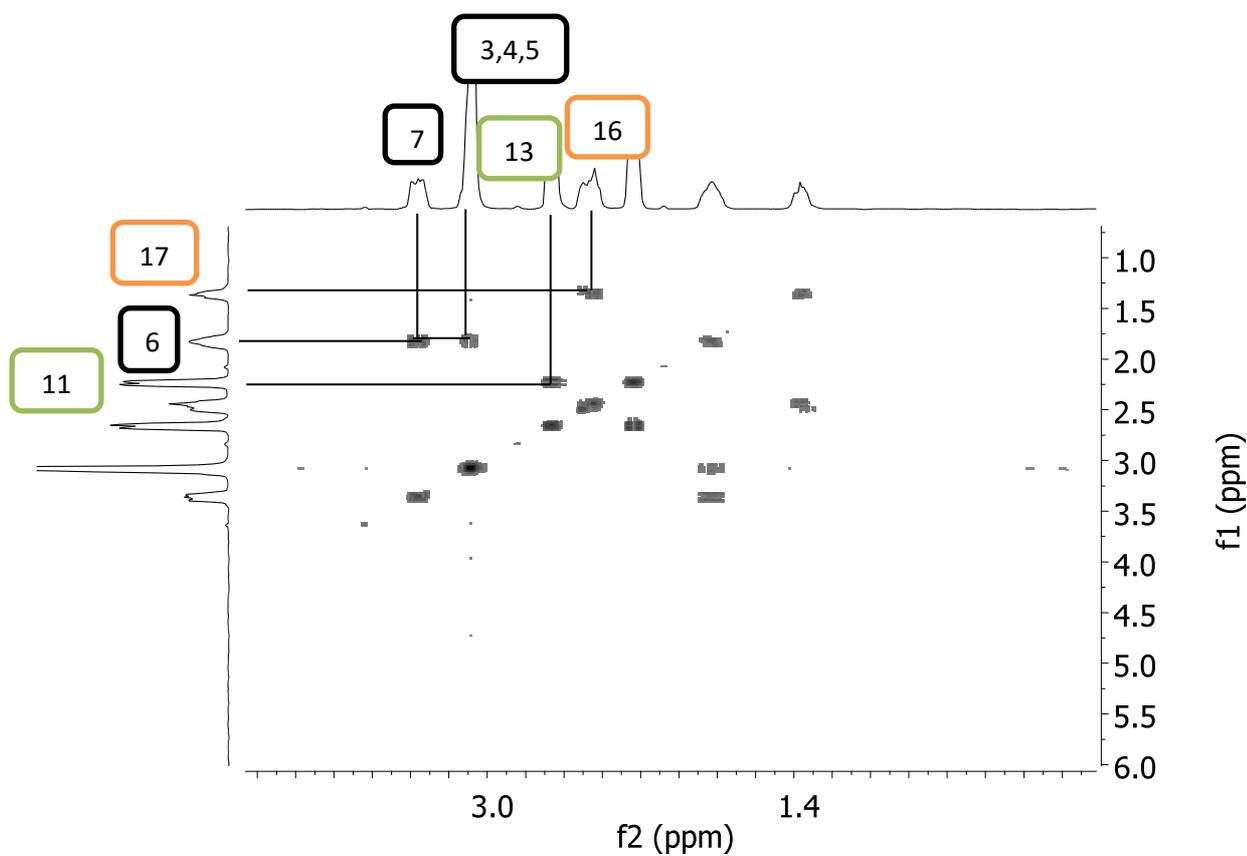
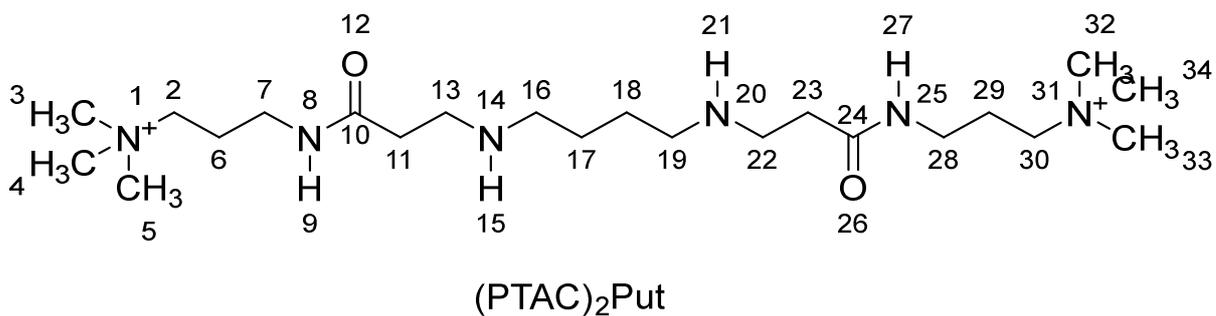
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  2.40 – 2.29 (m, 4H), 1.25 – 1.13 (m, 4H).

## 7.2. COSY.<sup>24</sup>

El primer y más popular experimento de RMN bidimensional es la secuencia de espectroscopia de correlación homonuclear (COSY), que se utiliza para identificar espines que están acoplados entre sí. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional.

Los picos cruzados son el resultado de un fenómeno llamado transferencia de magnetización, y su presencia indica que dos núcleos están acoplados y tienen dos cambios químicos diferentes que forman las coordenadas del pico cruzado. Cada acoplamiento da dos picos cruzados simétricos por encima y por debajo de la diagonal. Es decir, se produce un pico cruzado cuando existe una correlación entre las señales del espectro a lo largo de cada uno de los dos ejes en estos valores. Una forma visual fácil de determinar qué acoplamientos representa un pico cruzado es encontrar el pico diagonal que está directamente encima o debajo del pico cruzado, y el otro pico diagonal que está directamente a la izquierda o derecha del pico cruzado. Los núcleos representados por esos dos picos diagonales están acoplados.

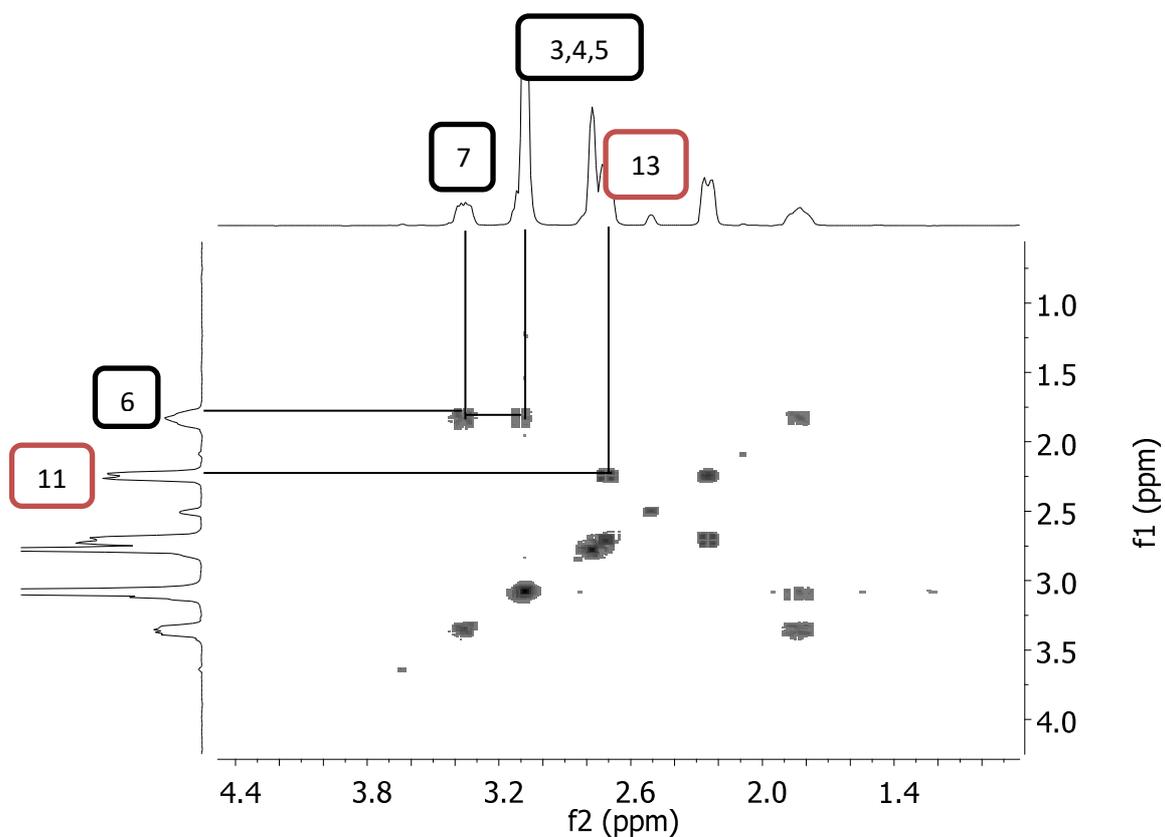
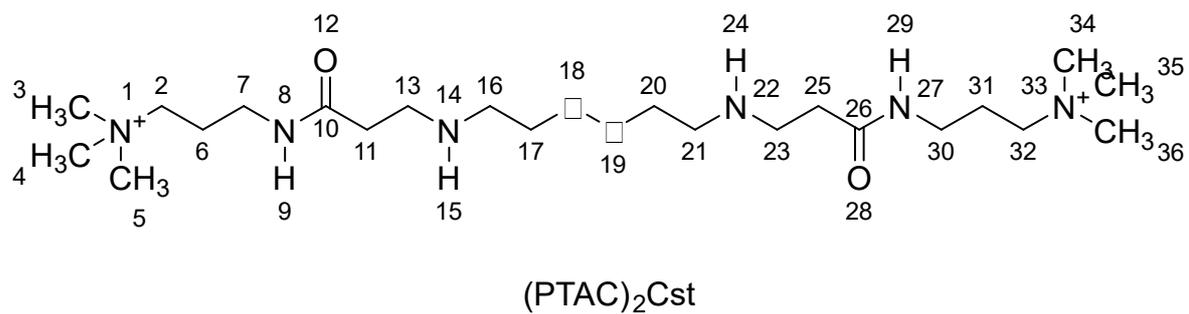
### 7.2.1. (PTAC)<sub>2</sub>Putrescina



**Figura 35.** Espectro RMN 2D COSY PTAC-putrescina

- El hidrogeno del carbono 17 interacciona con el hidrogeno del carbono 16
- El hidrogeno del carbono 6 interacciona con el hidrogeno del carbono 7 y a su vez con los hidrógenos de los carbonos 3,4 y 5.
- El hidrogeno del carbono 13 interacciona con el hidrogeno del carbono 11.

## 7.2.2. (PTAC)<sub>2</sub>CISTAMINA



**Figura 36.** Espectro COSY PTAC-Cistamina

- El hidrogeno del carbono 6 interacciona con el hidrogeno del carbono 7 y a su vez con los hidrógenos de los carbonos 3,4 y 5.
- El hidrogeno del carbono 11 interacciona con el hidrogeno del carbono 13.

