



# **SÍNTESIS Y AGREGACIÓN DE BOLAANFÍFILOS CATIÓNICOS DERIVADOS DE LA CISTINA**

**ALEX SIERRA MARRERO  
MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA  
TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER  
CASTELLÓN, SEPTIEMBRE 2021**



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



# **SÍNTESIS Y AGREGACIÓN DE BOLAANFÍFILOS CATIÓNICOS DERIVADOS DE LA CISTINA**

**ALEX SIERRA MARRERO**

**MÁSTER EN QUÍMICA APLICADA Y FARMACOLÓGICA**

**TRABAJO DE FINAL DE MÁSTER**

**SEPTIEMBRE 2021**



El Dr. Juan Felipe Miravet Celades, Profesor Titular perteneciente al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castelló de la Plana,

#### CERTIFICA

Que el trabajo fin de grado con el título **SÍNTESIS Y AGREGACIÓN DE BOLAANFÍLOS CATIONICOS DERIVADOS DE LA CISTINA** ha sido realizado por Alex Sierra Marrero bajo su dirección, en el grupo de Nanomateriales Moleculares Orgánicos con Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana.

Lo que certifico a los efectos oportunos en Castelló de la Plana a 19 de septiembre de 2021.

Fdo. Dr. Juan F. Miravet Celades



## Agradecimientos

Primeramente me gustaría agradecer a mi tutor Juan, por ser una persona tan cercana y accesible, de la que da gusto aprender, por resolver cualquier duda que pudiera surgir y por promover el buen ambiente dentro de su grupo de investigación en el cual es una gozada trabajar.

A los miembros del grupo del laboratorio, Ana, Diego, Nacho, por hacerme sentir como uno más desde el primer momento, por aclararme cualquier duda que pudiera tener, por explicarme el funcionamiento del laboratorio y hacer que el paso por este (y la cafetería en cada almuerzo, institución sagrada que uno no debía saltarse) haya sido de las mejores experiencias en mi corta carrera como químico.

También agradecer a mis compañeros de máster, tanto los nuevos como los que conozco desde la carrera, en especial Víctor, no podría haber pedido un mejor compañero de estudios, cafés, laboratorio, risas, congreso y vida en general, gracias por ser una fuente de inspiración constante.

Por último no podría faltar agradecer a mi familia, mis padres y mi hermano, por apoyarme en todo, por haber hecho de mi la persona que soy hoy en día, no habría sido capaz de llegar hasta aquí sin su apoyo.



## Abreviaturas

<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato	<b>EPR</b>	“Enhanced permeability and retention” (Permeabilidad y retención mejorada)
<b>BOC</b>	Terc-butoxicarbonilo	<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>BOI</b>	Hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-iloxy)-1,3-dimetilimidazonio	<b>GSSG</b>	Disulfuro de glutaciona
<b>BOP</b>	Benzotriazoliloxitris[dimetilamino]fosfonio	<b>HMPA</b>	Hexametilfosforamida
<b>Bz</b>	Benzoil	<b>PAMAM</b>	Dendrímero de tipo poli(amidoamina)
<b>CDM</b>	Anhídrido carboxidimetilmaleico	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>CMC</b>	“Critic micelar concentration” (Concentración crítica micelar)	<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>Cst</b>	Cistina	<b>PMEOMA</b>	Poli[2(1-metoxietoxi)etilmetacrilato]
<b>CTRT</b>	Tampón de citrato de sodio	<b>PNIPAM</b>	Poli(N-isopropilacrilamida)
<b>DCC</b>	N,N'-diciclohexilcarbodiimida	<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris-pirrolidino-fosfonio
<b>DIPCDI</b>	Diisopropilcarbodiimida	<b>PyBroP</b>	Hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio
<b>DIPEA</b>	N,N-Diisopropiletilamina	<b>PyCloP</b>	Hexafluorofosfato de cloro-tris-pirrolidino-fosfonio
<b>DLS</b>	“Dynamic light scattering” (Dispersión dinámica de luz)	<b>POxs</b>	Poli(2-oxazolina)
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamida	<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>Val</b>	Valina
<b>EDA</b>	Etilendiamina		



# Índice

	Pg
<b>Introducción</b>	1
<b><u>1. Nanoportadores</u></b>	3
1.1 Nanoportadores sensibles a estímulos externos	4
1.2 Nanoportadores sensibles a estímulos internos	7
<b><u>2. Nanoportadores sensibles a la glutatona</u></b>	10
<b>Objetivos</b>	13
<b>Resultados y discusión</b>	17
<b><u>3. Síntesis de bolaanfífilos catiónicos derivados de la cistina</u></b>	19
3.1 Breve introducción a química de N-protección de aminas y C-activación de ácidos carboxílicos	19
3.1.1 Métodos de protección de aminas	19
3.1.2 Métodos de activación de ácidos	22
3.2 Síntesis de BzCstEDA	27
3.3 Síntesis de MeOCstVal	31
<b><u>4. Ensayos de agregación en agua</u></b>	35
4.1 Determinación de propiedades ácido-base	35
4.1.1 Breve introducción a las valoraciones ácido-base potenciométricas	35
4.1.2 Constantes de acidez y diagrama de especies	38
4.2 Determinación de la concentración crítica micelar	39
4.2.1 Concentración crítica de agregación de BzCstEDA	40
4.2.2 Concentración crítica de agregación de MeOCstVal	41

4.3 Determinación del tamaño de partícula por DLS	41
4.3.1 Tamaño de partícula de BzCstEDA	43
4.3.2 Tamaño de partícula de MeOCstVal	44
<b>Conclusiones</b>	45
<b>Sección experimental</b>	49
5.1 Determinación del pKa	51
5.2 Fluorimetría	51
5.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)	51
5.4 Procedimiento experimental para la síntesis de BzCstEDA	52
5.5 Procedimiento experimental para la síntesis de MeOCstVal	55
<b>Anexos</b>	59

# Introducción



## Introducción

### 1. Nanoportadores

Desde el descubrimiento del efecto de permeabilidad y retención mejorada (efecto EPR) en tumores,<sup>1</sup> los nanoportadores se han considerado vehículos de suministro de fármacos prometedores. En general, estas nanopartículas capaces de encapsular fármacos, del rango de 10 a 200 nm, son más propensas a acumularse en los tumores sólidos, a causa de la mayor permeabilidad de su vascularización. Gracias a su capacidad encapsuladora, los nanoportadores pueden proteger compuestos bioactivos en su interior, eludiendo la degradación enzimática, así como la exposición de órganos sanos a su actividad, aumentando su tiempo de vida media y alargando su actividad biológica en tumores.

Hasta la fecha se han desarrollado diversos tipos de nanoportadores para la distribución de los fármacos en oncología, desde dendrímeros, nanopartículas metálicas, micelas poliméricas, liposomas, nanopartículas inorgánicas hasta incluso nanopartículas basadas en la membrana celular (**Fig 1**). Con todo, los nanoportadores deben enfrentarse a las barreras biológicas dentro del organismo en su camino hacia su diana biológica, tanto fuera como dentro de los tumores. Algunos elementos estructurales comúnmente presentes en los nanoportadores se introducen para mejorar su resistencia a la degradación y al reconocimiento y eliminación por el sistema reticuloendotelial. Por ejemplo, la introducción de fragmentos de polietilenglicol (PEG) busca conseguir un efecto “sigilo” (*stealth* en inglés) frente al sistema inmune.

---

<sup>1</sup> Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Control. Release* **2000**, *65* (1–2), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5).

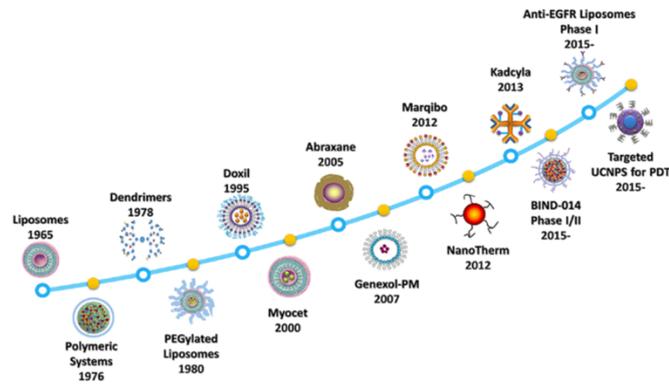


Figura 1. Desarrollo de los nanoportadores en el tiempo <sup>2</sup>

Dentro de los nanoportadores empleados para uso en oncología son especialmente interesantes aquellos con respuesta a estímulos, de forma que liberen su carga directamente en el tumor o en las células cancerígenas. Estos estímulos pueden ser externos, como el campo magnético, la temperatura, la luz o el campo eléctrico o internos, el pH, la concentración de ATP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enzimas, potencial redox, hipoxia, etc.<sup>3</sup>

### 1.1 Nanoportadores sensibles a estímulos externos

Los nanoportadores con respuesta a estímulos externos se pueden acumular en zonas deseadas utilizando fuerzas externas (como el campo magnético), pueden tener una liberación controlada, distribución intracelular, así como terapia y diagnóstico activado. Entre sus ventajas podemos encontrar las siguientes:

- Puede controlarse con precisión la localización y la intensidad del estímulo externo
- El estímulo externo puede añadirse o eliminarse dependiendo del tratamiento requerido

<sup>2</sup> Li, Z.; Tan, S.; Li, S.; Shen, Q.; Wang, K. Cancer Drug Delivery in the Nano Era: An Overview and Perspectives (Review). *Oncol. Rep.* **2017**, *38* (2), 611–624

<sup>3</sup> Mi, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery, Tumor Imaging, Therapy and Theranostics. *Theranostics*. Ivyspring International Publisher **2020**, 4557–4588.

- Se pueden utilizar distintos estímulos externos para conseguir una multifunción en la terapia y el diagnóstico del cáncer
- La posibilidad de proveer de estímulos periódicos o continuos para la liberación de fármacos.

#### **-Nanoportadores sensibles a ultrasonido**

El ultrasonido es un tipo de onda de sonido de alta frecuencia, capaz de afectar a los nanoportadores de forma que liberen su carga en las zonas enfermas, véase los tumores. La intensidad del ultrasonido puede ajustarse para distintas aplicaciones. A bajas frecuencias, el ultrasonido puede utilizarse para el diagnóstico mientras que a altas frecuencias puede aplicarse directamente a los nanoportadores para que liberen su carga o aumentar la permeabilidad de la membrana celular cancerígena.

Para diseñar nanoportadores sensibles al ultrasonido, generalmente o se incorporan gases o agentes de contraste, incluyendo aire, N<sub>2</sub> y compuestos perfluorocarbonados o las mismas partículas generan gas en ambientes biológicos, como por ejemplo las nanopartículas de CaCO<sub>3</sub>.<sup>4</sup>

Este tipo de nanoportadores pueden ser utilizados para el diagnóstico tumoral por medio de ultrasonido, un método seguro, barato y ampliamente utilizado en la clínica, ya que provee imágenes con una gran resolución espacial.

#### **-Nanoportadores sensibles a la temperatura**

Es uno de los sistemas más investigados dentro de las estrategias sensibles a estímulos, y ha sido ampliamente explotado en la oncología. Por lo general, se diseñan de forma que sean estables en regiones con temperatura hasta 37°C, la temperatura corporal, y que sean sensibles a temperaturas superiores (>40°C),

---

<sup>4</sup> Min, K. H., Min, H. S., Lee, H. J., Park, D. J., Yhee, J. Y., Kim, K., Kwon, I. C., Jeong, S. Y., Silvestre, O. F., Chen, X., Hwang, Y. S., Kim, E. C., & Lee, S. C.. PH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: A theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers. *ACS Nano*, **2015** 9(1), 134–145.

sufriendo cambios significativos en sus propiedades en respuesta a ligeras variaciones de temperatura<sup>5</sup>.

Este tipo de nanoportadores se generan con materiales que puedan sufrir variaciones en sus propiedades fisicoquímicas asociadas a los cambios de temperatura. Por lo general incluyen poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), poli(N-inilsobutiramida) (PAMAM), poli(2-oxazolona) (POxs) y poli [2-(2-metoxietoxi) etilmetacrilato] (PMEOMA). Otra estrategia para obtener esta sensibilidad térmica es incorporar materiales térmicamente inestables dentro del nanoportador. Por ejemplo, un liposoma que contenga  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puede generar  $\text{CO}_2$  tras una hipertermia local ( $42^\circ\text{C}$ ) para provocar su colapso, produciendo una eficiente liberación intracelular del fármaco (**Fig.2**).

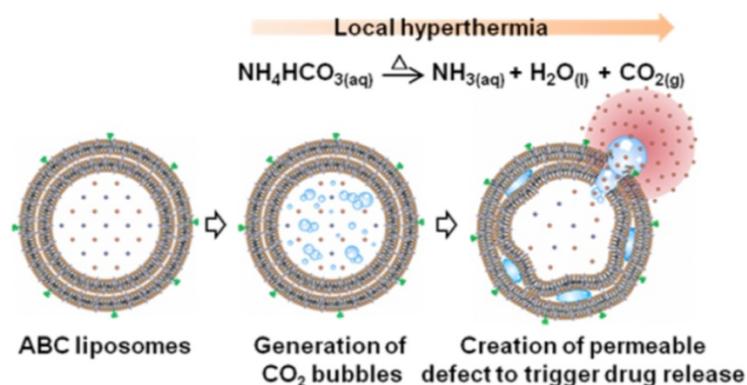


Figura 2. Esquemática de un nanoportador sensible a la temperatura <sup>2</sup>

### -Nanoportadores sensibles al magnetismo

Este tipo de nanoportadores se han diseñado teniendo en consideración el hecho de que las nanopartículas magnéticas tienen un tropismo intrínseco al campo magnético para la focalización del tumor, así como su capacidad de generar hipertermia local bajo un campo magnético alterno, desencadenando la liberación de fármacos y la ablación del tumor.

<sup>5</sup> Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Nature Materials*. Nature Publishing Group November **2013**, pp 991–1003.

Generalmente incorporan materiales magnéticos para conseguir esta sensibilidad al magnetismo, especialmente nanopartículas de óxidos de hierro, óxidos de hierro mixto y otros nanomateriales magnéticos. Esta incorporación de material magnético puede ser utilizado también para el diagnóstico tumoral, por medio de resonancia magnética. Además, la interacción entre los nanoportadores magnéticos y los campos magnéticos facilita la acumulación guiada de los nanoportadores en los tumores.

#### **-Nanoportadores sensibles a la luz**

Otro tipo de nanoportadores ampliamente desarrollados son aquellos sensibles a la luz, debido a la posibilidad de ajustar la longitud de onda de irradiación, la potencia y el área efectiva de este estímulo. Por lo general, la irradiación de luz, tal como la ultravioleta-visible y la cercana al infrarrojo, puede afectar de forma remota a los nanoportadores sensibles en los sistemas biológicos. Además, esta terapia lumínica puede controlarse de forma que se evite o se minimice el daño provocado a los órganos y los tejidos sanos.

Este tipo de nanoportadores pueden responder a la luz con los siguientes objetivos:

- Alterar la conformación de ciertas moléculas, como azobenceno, espiropirano, ditieniletano y diazonaftoquinona.
- Romper los enlaces químicos sensibles a la luz para la disociación de nanoportadores.
- Desencadenar la liberación de agentes terapéuticos en regiones afectadas.
- Proveer un diagnóstico activado por la luz, o una terapia guiada por este diagnóstico.
- Generar oxígeno singlete, para la terapia fotodinámica y el efecto fototérmico para la ablación tumoral mediante la terapia fototérmica.

#### **1.2. Nanoportadores sensibles a estímulos internos**

El ambiente presente en los tumores, o dentro de las células cancerígenas difiere del resto del cuerpo en cuanto a enzimas, concentración de ATP, pH, potencial redox e hipoxia. Todas estas diferencias pueden ser utilizadas como interruptor

para la terapia mediante nanopartículas, siempre que sean sensibles a estas diferencias del medio.

### - Nanoportadores sensibles al pH

El bajo pH dentro de los orgánulos de las células cancerígenas, así como del ambiente tumoral, ha propiciado el desarrollo de nanoportadores sensibles al pH, como respuesta a la enfermedad. Comparado con el citoplasma, prácticamente de pH neutro (pH 7.2), el pH de los orgánulos cancerígenos es considerablemente ácido (pH 4-6). Esto es mayormente una consecuencia de la angiogénesis irregular y el rápido crecimiento del tumor, lo que causa un rápido déficit tanto de nutrientes como de oxígeno, lo que lleva a un metabolismo glicolítico, que como consecuencia produce metabolitos ácidos en el intersticio tumoral. Teniendo en mente esta situación, se han diseñado nanoportadores que liberen su carga al entrar en contacto con estos ambientes de bajo pH (**Fig. 3**).

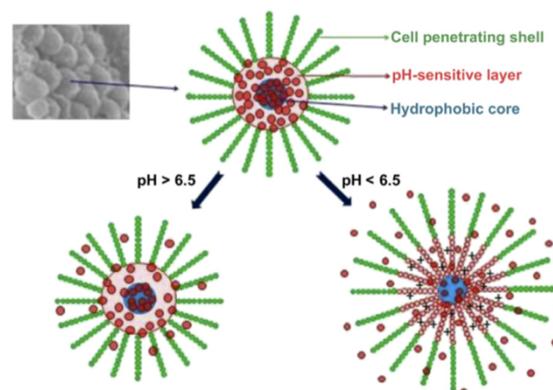


Figura 3. Ejemplo de nanopartícula sensible al pH.<sup>6</sup>

Esta sensibilidad puede obtenerse con la presencia de ciertos grupos químicos que sufran una conversión de su carga en un pH ácido en la estructura del nanoportador, como por ejemplo anhídrido citracónico, anhídrido 2,3-dimetilmaleico, anhídrido

<sup>6</sup> Zhang, C. Y.; Yang, Y. Q.; Huang, T. X.; Zhao, B.; Guo, X. D.; Wang, J. F.; Zhang, L. J. Self-Assembled PH-Responsive MPEG-b-(PLA-Co-PAE) Block Copolymer Micelles for Anticancer Drug Delivery. *Biomaterials* **2012**, 33 (26), 6273–6283.

carboxi dimetilmaleico (CDM), etc. Otra estrategia para conseguir esta sensibilidad al pH es el uso de cadenas poliméricas ancladas o enjauladas que experimentan una transición de fase en entornos ácidos lisosomales, lo que provoca la desestabilización de la membrana lipídica y la liberación de carga.

#### **-Nanoportadores sensibles a la hipoxia**

La deficiente vascularización dentro de los tumores sólidos hace propensa la presencia de hipoxia en ellos (bajo nivel de oxígeno), lo que juega un papel importante en la progresión y propagación del cáncer. Esta hipoxia puede utilizarse como diana para ciertos nanoportadores, entre ellos los sensibles al pH, ya que las zonas tumorales con hipoxia generalmente tienen un pH inferior debido a la glicólisis de la glucosa y la producción de  $H^+$  y lactato.

Entre las estrategias para diseñar nanoportadores sensibles a hipoxia se encuentra la introducción de nitroimidazol, azobenceno, derivados del nitrobenzoceno y complejos de iridio (III).

#### **-Nanoportadores sensibles a ambientes redox**

Este tipo de nanoportadores se han utilizado ampliamente en la distribución de fármacos debido a la diferencia de potencial y capacidad en los tumores, así como los niveles de glutatona en las células cancerígenas, muy superiores a los niveles en células sanas.

Los puentes disulfuro presentes en este tipo de nanoportadores se rompen en presencia de agentes reductores tales como la glutatona o el  $H_2O_2$  (**Fig. 4**). Estos nanoportadores son capaces, por tanto, de liberar su carga una vez se encuentren en el interior de las células cancerígenas, al haber conjugado los compuestos bioactivos al nanomaterial por medio de puentes disulfuro, estables durante todo el transporte hasta entrar en contacto con el ambiente tumoral reductor.

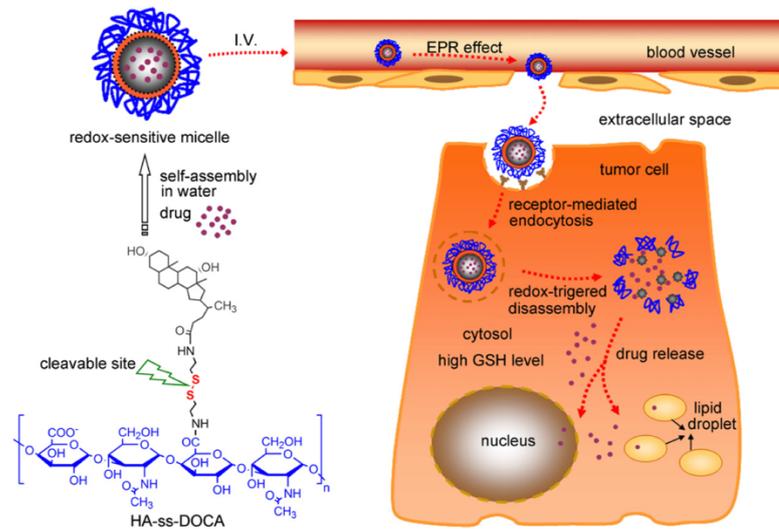


Figura 4. Esquematación del transporte y liberación de la carga de un nanoportador con sensibilidad redox<sup>7</sup>

## 2. Nanoportadores sensibles a la glutatona

La glutatona (GSH) es un tripéptido, constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, que tiene el papel de principal antioxidante de las células. Su grupo tiol se mantiene en un estado reducido, y actúa como reductor, reduciendo cualquier enlace disulfuro actuando como dador de electrones. En el proceso, la glutatona se convierte a su forma oxidada llamada disulfuro de glutatona (GSSG). Este reductor está presente con una concentración de 2-20  $\mu\text{M}$  en circulación y en los tejidos mientras que en el interior celular su concentración aumenta a 2-10 mM.<sup>8</sup>

<sup>7</sup> Li, J.; Huo, M.; Wang, J.; Zhou, J.; Mohammad, J. M.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Waddad, A. Y.; Zhang, Q. Redox-Sensitive Micelles Self-Assembled from Amphiphilic Hyaluronic Acid-Deoxycholic Acid Conjugates for Targeted Intracellular Delivery of Paclitaxel. *Biomaterials* **2012**, 33 (7), 2310–2320.

<sup>8</sup> Cheng, R., Feng, F., Meng, F., Deng, C., Feijen, J., & Zhong, Z. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, **2011** 152(1), 2–12.

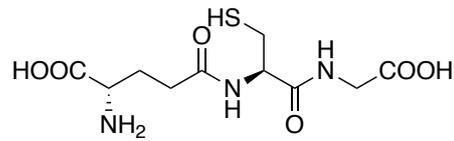


Figura 5. Estructura de la glutatona

Por otro lado se ha demostrado que la concentración de GSH en tejido tumoral es 100 veces superior a la concentración en tejidos sano y 4 veces mayor dentro de las células tumorales con respecto a las células sanas.<sup>9</sup>

Por estas razones el diseño de nanoportadores sensibles a la glutatona ha cobrado una gran importancia, ya que, debido a su tamaño, se podrán acumular en el tejido tumoral gracias al efecto EPR, y debido a su sensibilidad a la glutatona, únicamente liberarían el fármaco en presencia de esta, evitando así dañar el tejido sano, lo que los convierte en el vehículo idóneo para la liberación controlada de fármacos en el tratamiento del cáncer.

Para conseguir esta sensibilidad, la estrategia más común es la introducción de un puente disulfuro que se reduzca en presencia de la glutatona (también puede conseguirse este efecto con un puente diseleniuro pero es menos eficaz). Este puente puede introducirse en la estructura del puente que vaya a unir el nanoportador al fármaco, como puede ser el caso de los nanoportadores poliméricos<sup>10</sup>, o en la misma estructura del nanoportador como en el caso de liposomas<sup>11</sup>, micelas, nanogeles y cada vez más tipos de nanoportadores

<sup>9</sup> Melnyk, T., Đorđević, S., Conejos-Sánchez, I., & Vicent, M. J. Therapeutic potential of polypeptide-based conjugates: Rational design and analytical tools that can boost clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2020**, *160*, 136–169.

<sup>10</sup> Deng, Z., Hu, J., & Liu, S. Disulfide-Based Self-Immolative Linkers and Functional Bioconjugates for Biological Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, **2020**, *41*(1), 1–14.

<sup>11</sup> Zhang, Y. M., Liu, Y. H., Zhang, J., Liu, Q., Huang, Z., & Yu, X. Q. Cationic gemini lipids with cyclen headgroups: Interaction with DNA and gene delivery abilities. *RSC Advances*, **2014**, *4*(83), 44261–44268. <https://doi.org/10.1039/c4ra05974c>



# Objetivos



## Objetivos

Los bolaanfífilos son moléculas anfifílicas que contienen grupos hidrofílicos a ambos extremos de una cadena hidrofóbica de suficiente longitud. Esta arquitectura de dos cabezas hidrofílicas generalmente induce a una mayor solubilidad en agua, un aumento de la concentración crítica de agregación y una disminución en el número de agregación.<sup>12</sup> Siguiendo lo estudios realizados en el grupo de investigación, se ha diseñado un proyecto con los siguientes objetivos:

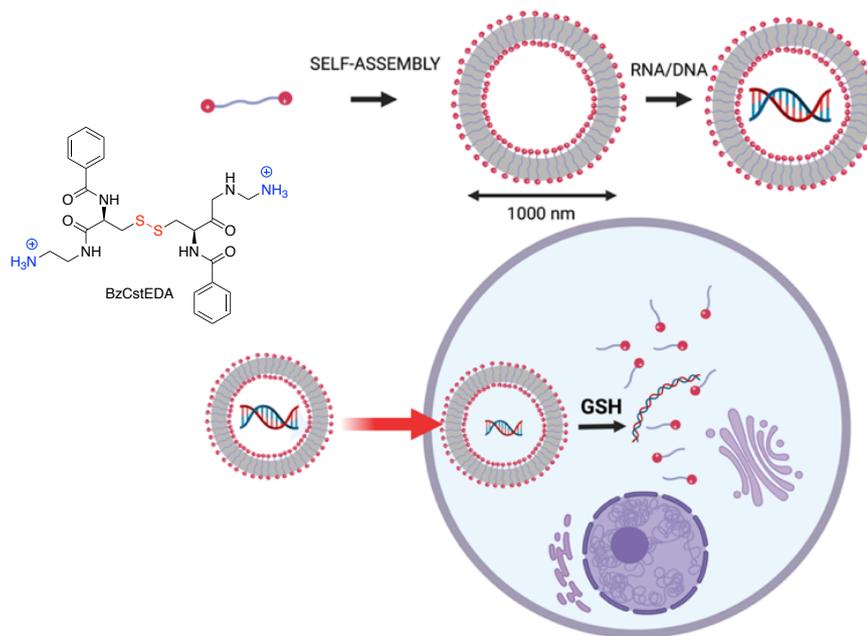


Figura 6. Esquemización del objetivo general en el cual se integra este proyecto

- 1) Sintetizar dos bolaanfífilos catiónicos derivados de la cistina, sensibles a la glutatona

<sup>12</sup> Fuhrhop, J-H; Wang, T. Bolaamphiphiles, Chem. Rev. **2004**, 104(6), 2901-2937

- 2) Evaluar la capacidad de ambos compuestos de formar nanopartículas en disolución, concretamente liposomas catiónicos.
- 3) Evaluar la capacidad de encapsular sustancias en su interior
- 4) Comprobar su sensibilidad a la glutatona

Sin embargo, debido a limitaciones de tiempo, en este trabajo solamente se han desarrollado las tareas correspondientes a los dos primeros objetivos.

## **Resultados y discusión**



## Resultados y discusión

### 3. Síntesis de bolaanfífilos catiónicos derivados de cistina

Se llevó a cabo la síntesis de dos bolaanfífilos catiónicos derivados de L-cistina. Por un lado, el compuesto denominado BzCstEDA (Bz: benzoil, Cst: cystine, EDA: ethylenediamine) mediante del grupo ácido de la cistina. Por otro lado, el compuesto MeOCstVal (MeO: metoxi, Cst: cistina, Val: L-Valina) mediante funcionalización del grupo amino de la cistina (**Fig. 3**).

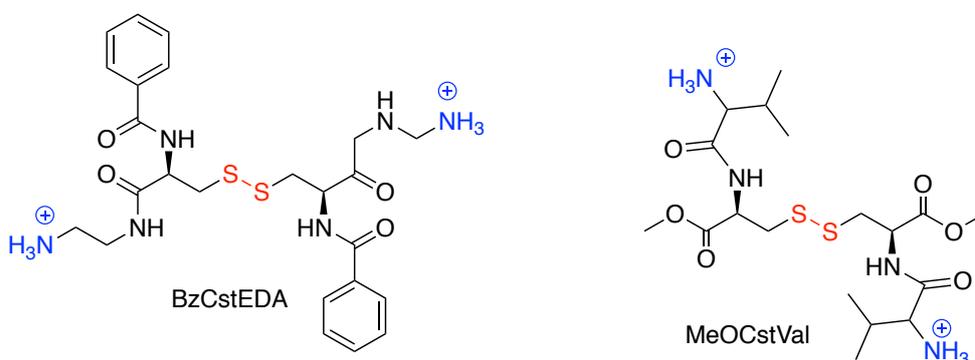


Figura 7 Estructuras de los bolaanfífilos derivados de la cistina obtenidos

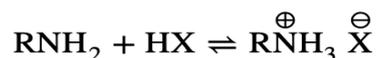
### 3.1 Breve introducción a química de N-protección de aminas y C-activación de ácidos carboxílicos

#### 3.1.1 Métodos de protección de aminas

Los grupos amina son particularmente susceptibles a reaccionar con una gran variedad de agentes, especialmente los agentes oxidantes, alquilantes y muchos grupos carbonilo. Para prevenir esta reactividad indeseada, se procede a proteger los grupos amina de diversas formas, de las que discutiremos algunos ejemplos.

-Protonación:

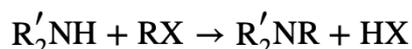
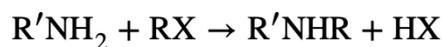
Generalmente la reactividad de las aminas conlleva un proceso en el que se forma un enlace a partir del par de electrones libres del nitrógeno. Por lo tanto, al reducir la reactividad de este par libre de electrones se reduce también la reactividad del átomo de nitrógeno. La forma más simple de llevar esto a cabo consiste en convertir la amina en una sal de amonio con un ácido. La protonación conlleva la protección del grupo amina.



Pese a que en la literatura hay ejemplos de este tipo de protección, a menos que la concentración de ácido sea muy alta, seguirá habiendo una porción significativa de amina sin protonar. Además, el medio ácido puede no ser ideal para ciertas reacciones.

-Alquilación:

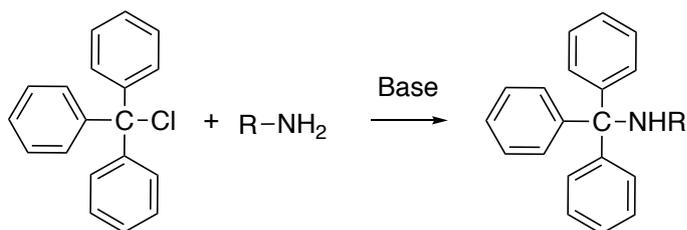
La alquilación es otra opción en la protección de las aminas, siendo factible para las aminas primarias y secundarias.



A primera vista no parece una protección muy efectiva debido a la presencia del par de electrones libres del nitrógeno, sin embargo, al usar un agente alquilante de gran tamaño, la reactividad del nitrógeno decae considerablemente debido al impedimento estérico.

Este es el caso del grupo protector tritilo (trifenilmetilo), utilizado en la síntesis de BzCstEDA.

Para la introducción de este grupo se hace reaccionar la amina con cloruro de trifenilmetilo o cloruro de tritilo, en presencia de una base para eliminar el HCl formado (**Esquema 1**).



**Esquema 1.** Protección de aminas secundarias por alquilación utilizando el grupo protector tritilo

Este grupo protector se puede eliminar tanto por hidrogenación catalítica como por hidrólisis en presencia de un ácido débil.

#### -Acilación:

También se puede reducir la basicidad y la nucleofilia del nitrógeno de una amina convirtiendo la amina en amida, por medio del tratamiento con un cloruro de ácido o un ácido anhídrido.

Esta disminución de la reactividad está asociada a la estabilización producida por el acoplamiento del grupo carbonilo, debido a su capacidad de aceptar electrones del átomo de nitrógeno, permitiendo la deslocalización del par libre de electrones.

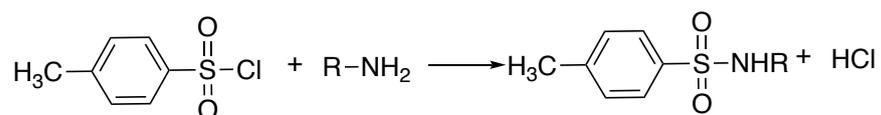
Los agentes acilantes más comunes son los cloruros de acilo y los anhídridos de ácido de los ácidos etanoico y benzoico. Se puede conseguir la desprotección por hidrólisis catalizada por ácido o base.

Otra estructura importante a la hora de proteger aminas es la estructura alcóxicarbonilo R-O-CO-, donde los ejemplos más utilizados son fenilmetoxicarbonilo (Z) y tert-butoxicarbonilo (BOC).

La importancia de estos grupos protectores recae en el hecho de que pueden eliminarse fácilmente por hidrólisis catalizada por ácido en condiciones suaves.

#### -Sulfonilación:

El grupo sulfonilo, al igual que el grupo acilo, desactiva el nitrógeno enlazado. Gracias a ello, las aminas pueden protegerse transformándose en sulfamidas por medio de una reacción con cloruros de sulfonilo (**Esquema 2**):



Esquema 2. Protección de aminas por sulfonilación

Sin embargo, las sulfonamidas son mucho más difíciles de hidrolizar que las carboxamidas. En la síntesis de péptidos los grupos protectores más usados basados en sulfonilos son los grupos 4-metilbencenosulfonilo y 4-bromobencenosulfonilo, los cuales se pueden eliminar por reducción con sodio metálico en amoniaco líquido.<sup>13</sup>

### 3.1.2 Métodos de activación de ácidos

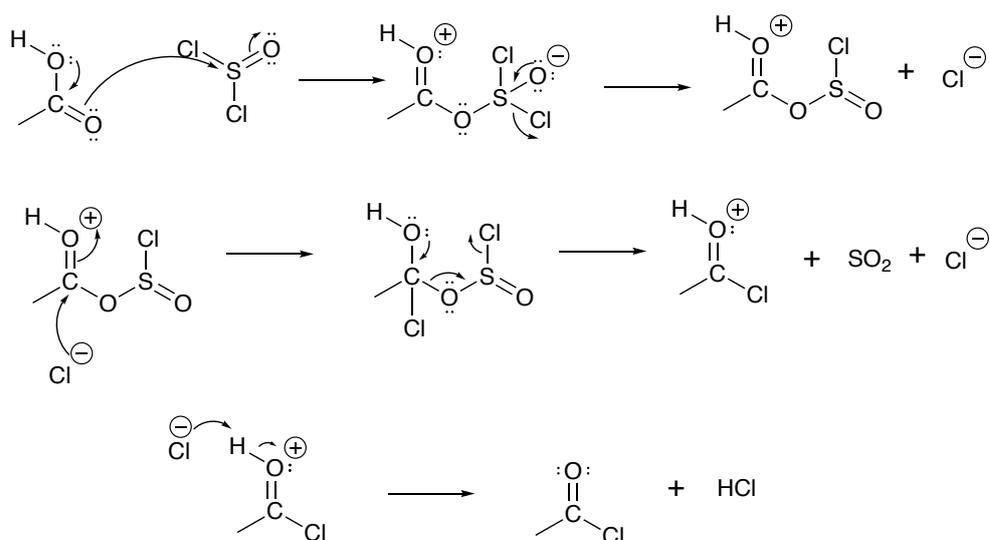
La activación de los ácidos carboxílicos conlleva un aumento de su electrofilia, haciéndolos más susceptibles a un ataque nucleofílico que un grupo carboxilo libre, lo que propicia su reactividad. Hay distintos métodos para llevar a cabo esta activación, entre los que se encuentran los presentados a continuación.

#### -Activación con cloruro de tionilo, formación de cloruros de ácido

Los ácidos carboxílicos reaccionan con cloruro de tionilo para formar cloruros de ácido. Durante la reacción, el grupo hidroxilo del ácido carboxílico se convierte en un clorosulfito como intermedio, transformándolo en un mejor grupo saliente. El anión cloruro producido en la reacción actúa entonces como nucleófilo, atacando al carbonilo (**Esquema 3**).<sup>14</sup>

<sup>13</sup>[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Basic\\_Principles\\_of Organic Chemistry \(Roberts and Casero\)/23%3A Organonitrogen Compounds I-Amines/23.13%3A Protection of Amino Groups in Synthesis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Basic_Principles_of_Organic_Chemistry_(Roberts_and_Casero)/23%3A_Organonitrogen_Compounds_I-Amines/23.13%3A_Protection_of_Amino_Groups_in_Synthesis) (consultado el 6-7-21)

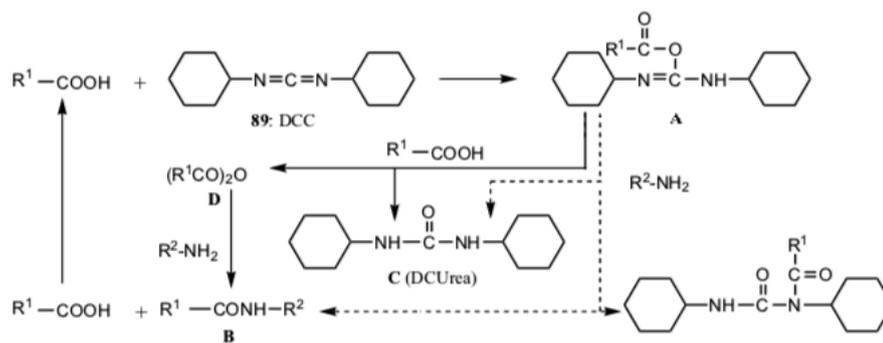
<sup>14</sup>[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry \(Bruice\)/17%3A Carbonyl Compounds I-Reactions of Carboxylic Acids and Carboxylic Derivatives/17.21%3A How Chemists Activate Carboxylic Acids](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Bruice)/17%3A_Carbonyl_Compounds_I-Reactions_of_Carboxylic_Acids_and_Carboxylic_Derivatives/17.21%3A_How_Chemists_Activate_Carboxylic_Acids) (consultado el 12-7-21)



Esquema 3. Mecanismo de activación de ácido carboxílico utilizando cloruro de tionilo

#### -Carbodiimidas:

DCC ha sido durante mucho tiempo el agente acoplante más útil y popular en la síntesis peptídica tanto en fase sólida como en disolución. Es altamente reactivo y proporciona altos rendimientos en poco tiempo (**Esquema 4**). La desventaja principal del uso de DCC es la formación de la diciclohexilurea sólida durante la activación. Este problema se puede superar con el uso de diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), que es igualmente efectivo y forma una urea más soluble.<sup>15</sup>

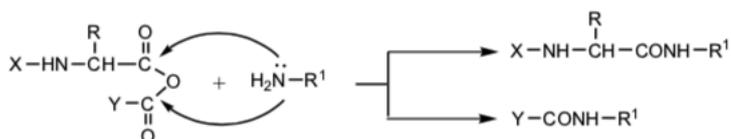


Esquema 4 Vía de acoplamiento mediada por DCC<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Tsuda, Y. and Okada, Y. Solution-Phase Peptide Synthesis Hughes, A.B. ed., *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*, vol. 3, Wiley, Weinheim, **2011** p. 203-234

-Anhídrido mixto

Otra forma de activación es por medio de un anhídrido mixto, proveniente de la protección del ácido carboxílico del aminoácido. Este procedimiento tiene el inconveniente de que el ataque de la amina puede producirse a los dos carboxilos del anhídrido (**Fig 3.1.2.3**), y el ataque de la amina debe llevarse a cabo en el carboxilo deseado para poder obtener el producto objetivo. Este problema se puede solventar al utilizar ácidos carboxílicos, o sus derivados, con grandes impedimentos estéricos a la hora de proteger el ácido. De esta forma, el impedimento estérico dirigirá el ataque nucleofílico.



Esquema 5 Dos productos posibles de la vía de acoplamiento por anhídrido mixto<sup>14</sup>

La ventaja de este método es que los subproductos generados, dióxido de carbono y el correspondiente alcohol, se pueden eliminar fácilmente de la mezcla de reacción.

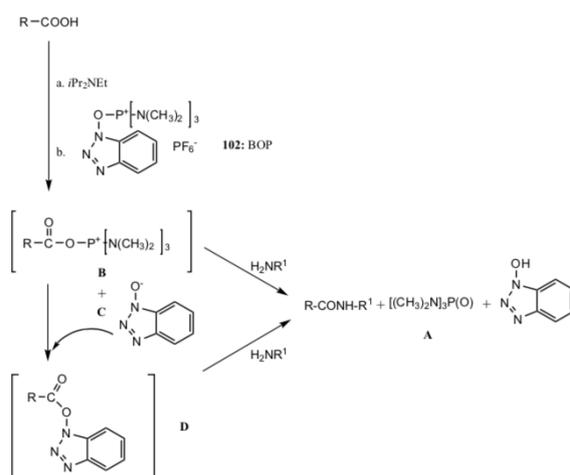
-Ésteres activos

Los ésteres metílicos o etílicos se convierten en la correspondiente amida o hidracina por su reacción con amoníaco. Por lo tanto, estos ésteres tienen la tendencia de sufrir amoniólisis. Con el objetivo de formar el enlace peptídico a partir de un aminoéster bajo condiciones suaves, la molécula de éster debe estar activada. Una forma de aumentar la actividad del éster es aumentando la electrofilia del carbono carbonílico, aumentando la propiedad electrón atrayente de la parte alcohol del éster. Por lo general, fenoles con sustituyentes electrón atrayentes en posiciones orto- o para- pueden convertirse en ésteres por medio del proceso con DCC.

-Reactivos de fosfonio

Desde que el profesor B. Castro desarrolló el benzotriazoliloxitris[dimetilamino]-fosfonio, más conocido como BOP<sup>16</sup>, el uso de las sales de fosfonio en la química peptídica se incrementó ampliamente. El BOP es fácilmente manejable y provee un acoplamiento rápido. Ya que el reactivo no reacciona con el grupo N-amino, puede añadirse directamente a los componentes amino y carboxílico que se pretenden acoplar, lo que implica que el BOP es capaz de producir el éster activo in situ. El principal problema del uso de BOP es que este reactivo produce HMPA (A), altamente tóxico, como subproducto.

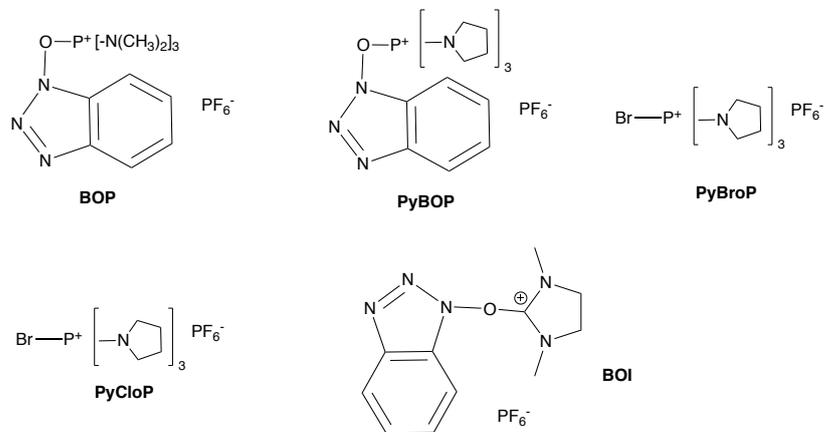
El ataque inicial del carboxilato a la sal de fosfonio lleva a la sal de aciloxifosfonio (B), la cual es altamente reactiva y es atacada por el componente amino de la reacción, o por la oxidación de HOBT (C) para formar benzotriazolil éster (D), la especie que sufre aminólisis predominantemente. Por lo general se utiliza una amina terciaria como base para formar el ión carboxilato del componente carboxílico (Esquema 3.1.2.4).



Esquema 6 Ruta de acoplamiento con BOP<sup>16</sup>

<sup>16</sup> B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.), Tetrahedron Letters, Volume 16, Issue 14, 1975, Pages 1219-1222, ISSN 0040-4039, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)72100-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)72100-9)

Basándose en la estructura del reactivo BOP, Castro desarrolló PyBOP, PyBroP, PyCloP and BOI (**Fig. 8**).<sup>16</sup>

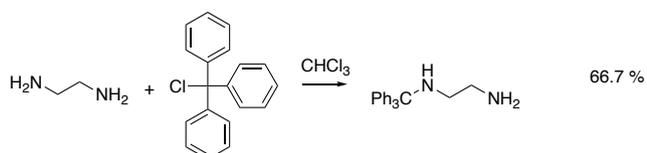


**Figura 8.** Ejemplos de reactivos de fosfonio utilizados para la activación de ácidos carboxílicos.

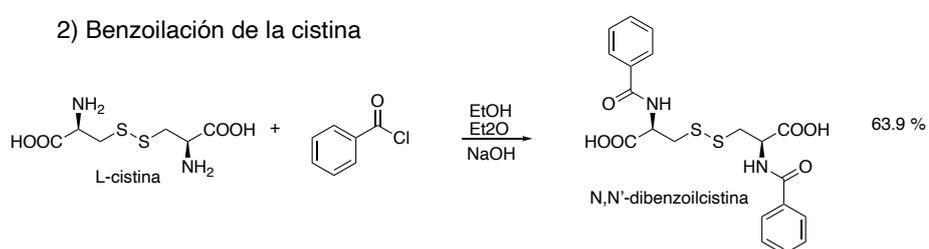
### 3.2 Síntesis de BzCstEDA

BzCstEDA fue obtenido por el acoplamiento de etilendiamina con L-cistina N-protégida. El proceso de síntesis consistió en los siguientes pasos:

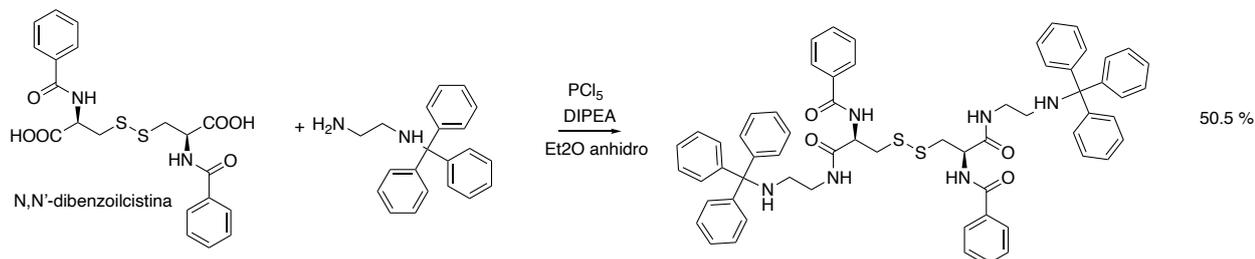
#### 1) Monoprotección de la etilendiamina



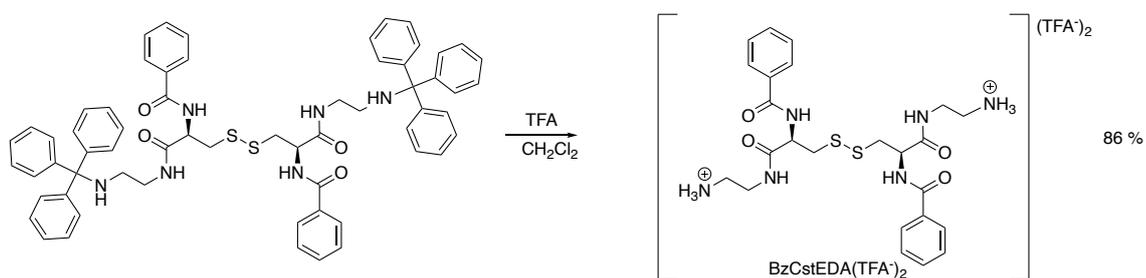
#### 2) Benzoilación de la cistina



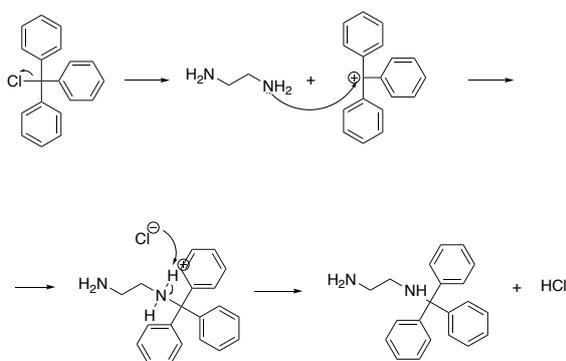
#### 3) Formación de la diamida



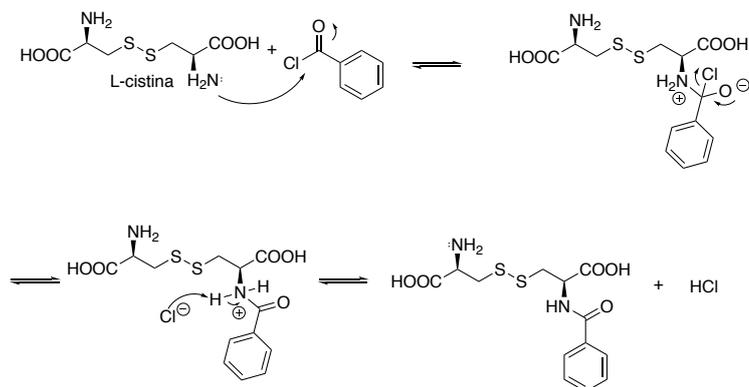
#### 4) Desprotección de la amina



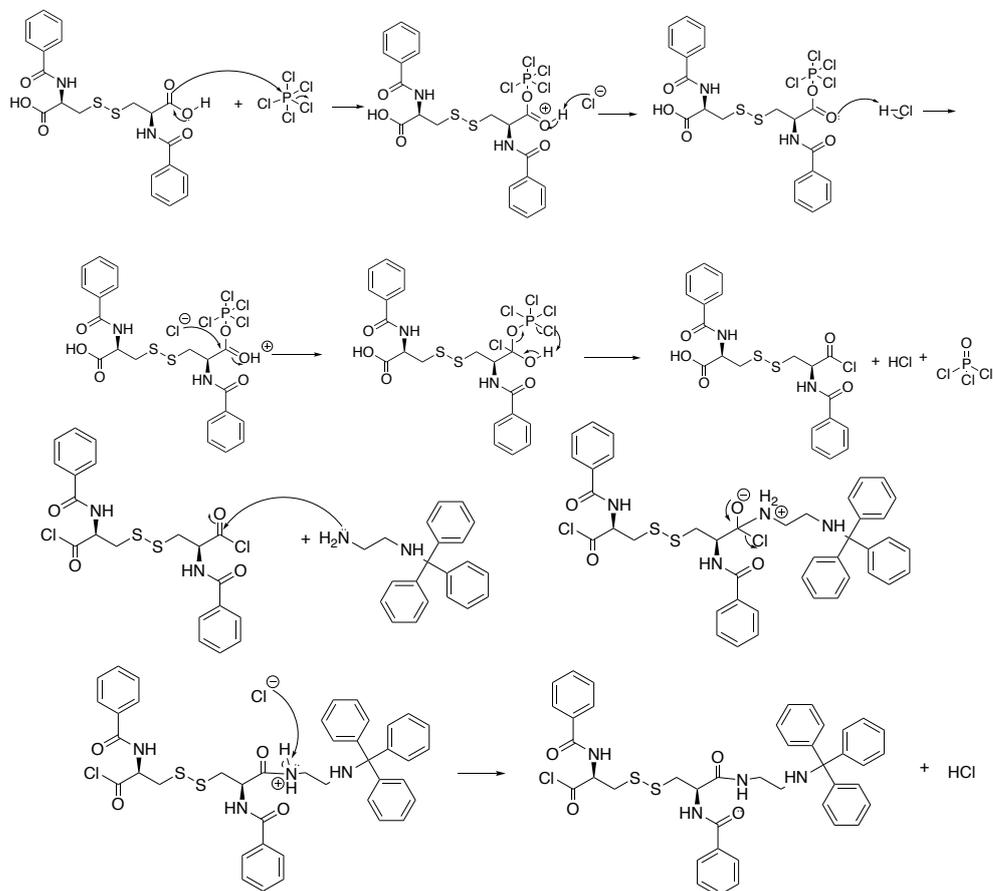
- Primero, la protección de una de las dos aminas de la etilendiamina con cloruro de tritilo de forma que solo pueda reaccionar uno de los dos grupos amino en el siguiente paso.



- El segundo paso consiste en la N-protección de L-cistina con cloruro de benzoilo para producir N,N'-dibenzoilcistina.

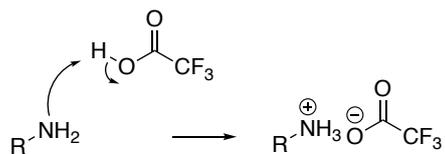
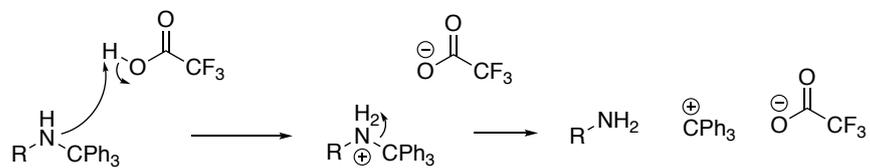


- En el tercer paso se lleva a cabo el acoplamiento de la amina con la N,N'-dibenzoilcistina, mediante la activación del ácido carboxílico como cloruro de ácido, utilizando  $\text{PCl}_5$ , de forma similar a la expuesta por Menger et. al.<sup>17</sup>



<sup>17</sup> Menger, F. M.; Caran, K. L. Anatomy of a Gel. Amino Acid Derivatives That Rigidify Water at Submillimolar Concentrations. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (47), 11679–11691.

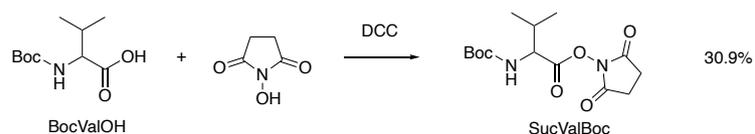
- Finalmente se obtiene el producto final tras la desprotección de la amina utilizando un exceso de TFA.



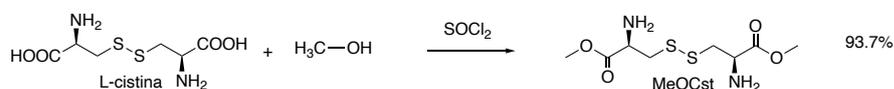
### 3.3 Síntesis MeOCstVal

MeOCstVal fue obtenido a partir de L-cistina y BocValOH en 4 pasos diferenciados:

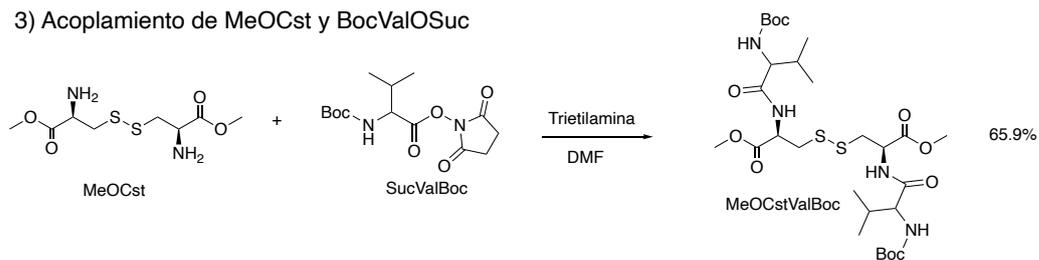
#### 1) Activación del BocValOH



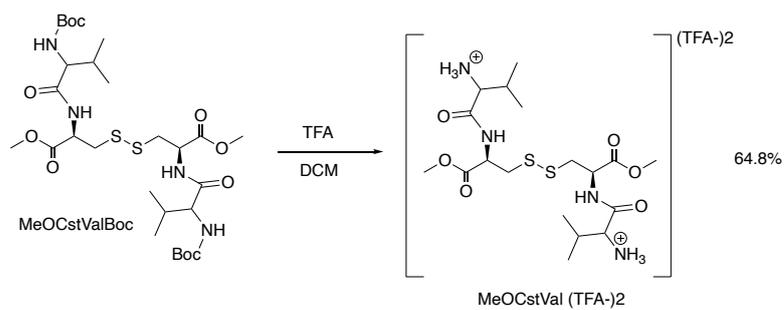
#### 2) Metilación de L-cistina



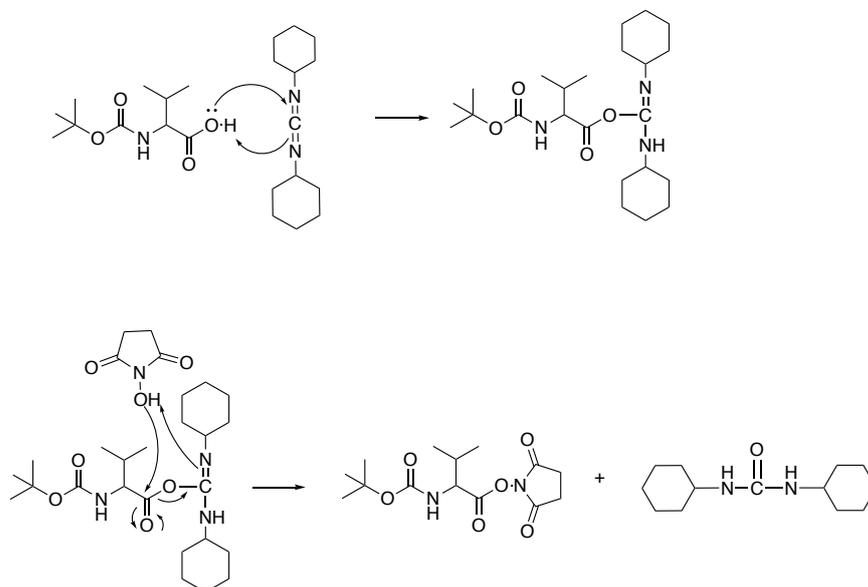
#### 3) Acoplamiento de MeOCst y BocValOSuc



#### 4) Desprotección de la amina

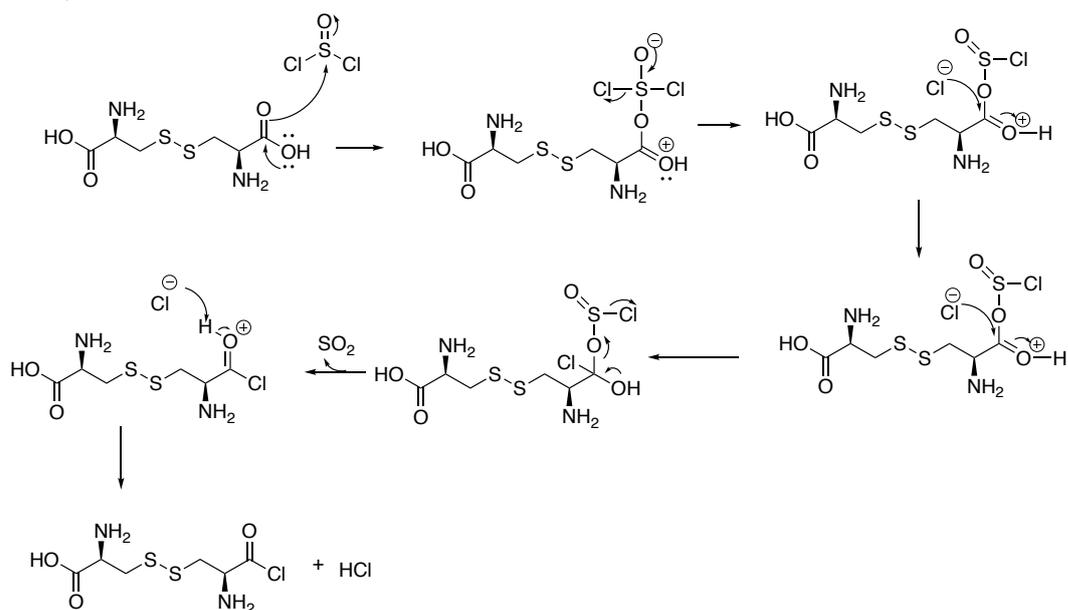


- Primero se llevó a cabo la activación de BocValOH con N-hidroxisuccinimida para dar BocValOSuc

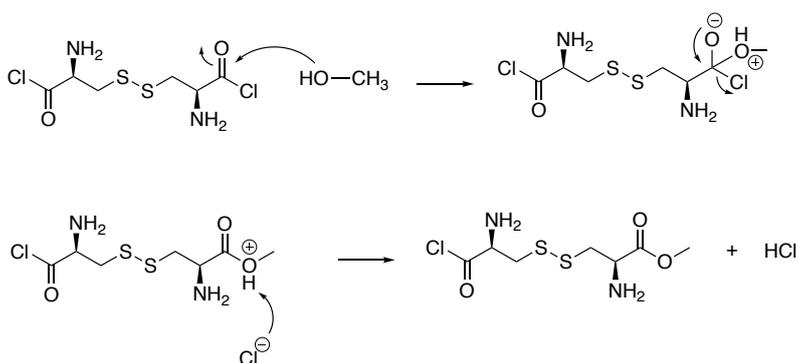


- El segundo paso consistió en la metilación de L-cistina en su posición de ácido carboxílico, de forma que más tarde el acoplamiento se diera en la posición amina. Esta metilación se llevó a cabo por medio de una activación del ácido carboxílico como cloruro de ácido, usando cloruro de tionilo, seguido de la reacción con metanol.

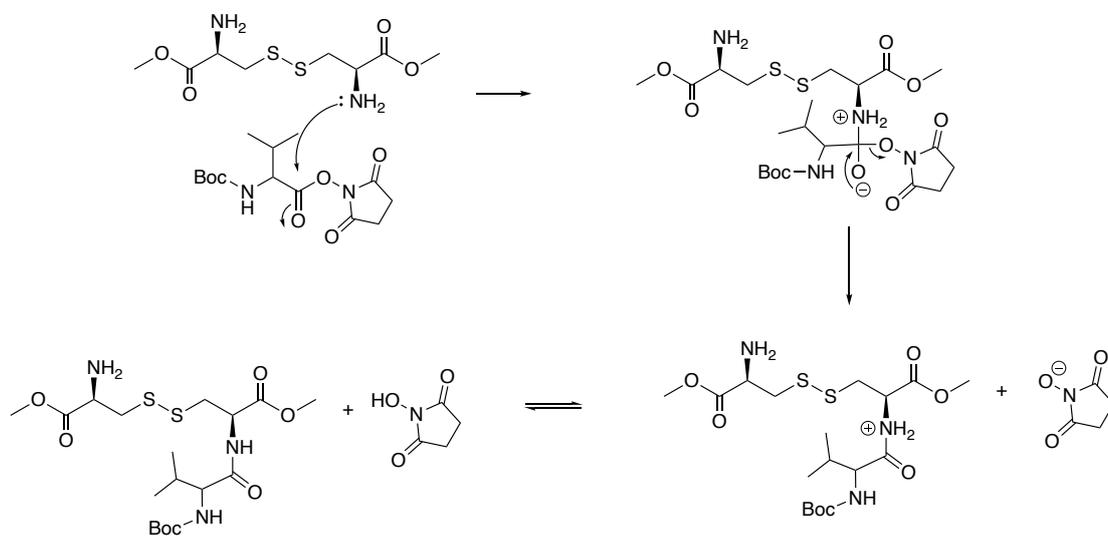
1) Activación como cloruro de ácido



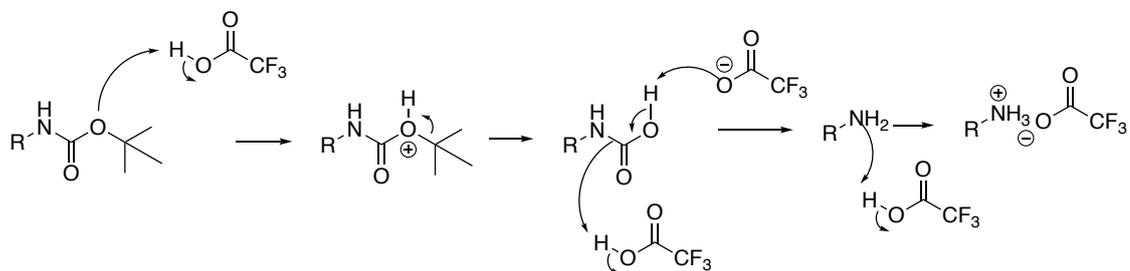
2) Ataque nucleofílico



- El tercer paso fue el acoplamiento de la L-cistina metilada y SucValBoc.



- Finalmente se llevó a cabo la eliminación del Boc utilizando un exceso de TFA, dejando libre la amina protonada.



#### 4. Ensayos de agregación en agua

Una vez sintetizados los dos compuestos, procedimos a estudiar algunas de sus propiedades, tales como su comportamiento ácido-base por medio de medidas potenciométricas, su concentración crítica de agregación por medio de fluorimetría y el tamaño de partícula por DLS.

##### 4.1. Determinación de propiedades ácido-base

###### 4.1.1 Breve introducción a las valoraciones ácido-base potenciométricas.

La potenciometría es una técnica electroanalítica con la que se puede determinar la concentración de una especie electroactiva en una disolución por medio de un electrodo de referencia, con un potencial constante con el tiempo y conocido, y un electrodo de trabajo, aquel sensible a la especie electroactiva.<sup>18</sup> A continuación se explican brevemente los principios de dos tipos de electrodos

###### -Electrodos de membrana:

Los electrodos de membrana se basan en una membrana que separa la disolución problema de una disolución de referencia contenida dentro del electrodo. Las membranas son hasta cierto punto permeables para un determinado tipo de iones, por lo que también son llamados “electrodos selectivos de iones”. Generan un potencial que resulta proporcional a la concentración de un solo analito.

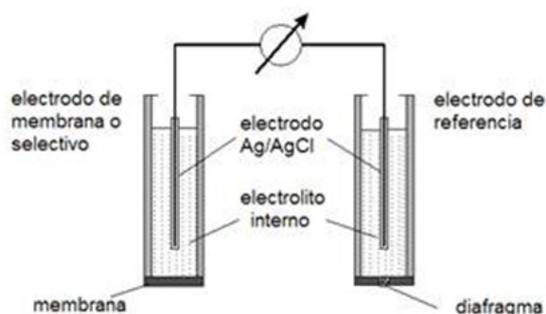


Figura 9. Un electrodo de membrana (a la izquierda) junto a un electrodo de referencia. Para hacer medidas ambos se sumergen en la disolución problema<sup>18</sup>

<sup>18</sup> <https://triplenlace.com/2012/12/09/potenciometria-ii-los-electrodos/> (Consultado el 28-7-2021)

El sistema que se usa para hacer las medidas consta de dos electrodos: de referencia e indicador (el de la membrana). Ambos se sumergen en la disolución que contiene el analito cuya concentración se quiere medir. El electrodo indicador consiste en un electrodo de referencia interno y una membrana en uno de los extremos. Esta membrana separa los dos líquidos, el relleno de su electrodo indicador y la disolución problema. El líquido que rellena el electrodo de membrana es una disolución que contiene el ion que se quiere analizar, su concentración se mantiene constante. La disolución problema, exterior, también contiene este ion, pero su concentración es desconocida. Esta membrana se fabrica de modo que permite únicamente a este ion la migración hacia su interior desde las dos caras. La velocidad de migración es distinta dependiendo de la concentración, lo que crea un desequilibrio de cargas a ambos lados, generándose un potencial, llamado potencial de superficie. Al ser los potenciales de los electrodos de referencia constantes, la única variable en el sistema es este potencial de superficie que únicamente depende de la concentración de la disolución problema.

Con todas estas consideraciones se llega a la conclusión de que el potencial que mide un potenciómetro conectado a ambos electrodos es un valor constante más una cierta cantidad que depende de la actividad del ion en la disolución problema:

$$E_{\text{pila(medido)}} = E_K + (RT/nF) \ln a$$

Donde "a" es la actividad del analito, que en concentraciones bajas se puede igualar a la concentración. El valor  $E_K$  engloba todos los potenciales constantes y se puede determinar por calibración. Esta calibración también corrige el potencial de asimetría producido por la fabricación del equipo.

Estas membranas pueden estar fabricadas a partir de vidrio o de un cristal de algún compuesto determinado, incluso de algún polímero insoluble relleno de cierto líquido.

#### **-Electrodo de membrana de vidrio para medida de pH:**

El electrodo de membrana de vidrio para medidas de pH consiste, generalmente, en un electrodo de referencia de Ag/AgCl que contiene ácido clorhídrico muy diluido de determinada concentración. Por lo tanto, es conocida la concentración de protones dentro del electrodo. En su extremo tiene una membrana a base de silicatos en la que pueden penetrar hasta cierta distancia por sus dos caras los protones; en el interior de la membrana hay iones  $\text{Na}^+$  que tienen cierta libertad de

movimiento y que conducen la corriente dentro de ella. Para que el electrodo funcione bien es necesario que ambas caras de la membrana estén bien hidratadas, por lo que debe conservarse sumergido en agua destilada o en una disolución acuosa de KCl. Este electrodo se enfrenta a otro de referencia.

En los electrodos comerciales de pH estos dos electrodos se fabrican integrados en un mismo módulo. En el mismo tubo se separan dos zonas, una para el electrodo de membrana (con su propio electrodo de referencia) y otra para el electrodo de referencia. Una forma de hacerlo es disponiendo dos tubos concéntricos (**Fig.x**)

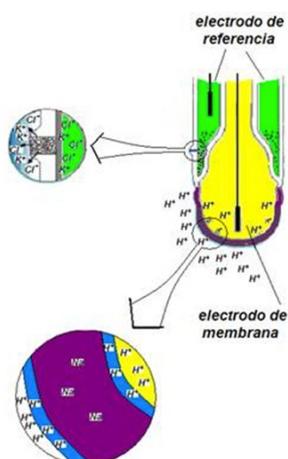


Figura 10. Esquematación de electrodo de membrana de vidrio para medida del pH <sup>18</sup>

El pH por definición es  $-\text{Log} [H^+]$ , y el logaritmo decimal de un número es el logaritmo neperiano multiplicado por 2,303, por lo que el pH se puede definir (si la temperatura es de 25 °C) como:

$$\text{pH} = 0,059 (K - E_{\text{pila medido}})$$

Esta expresión relaciona directamente el valor de pH con el potencial en voltios medido con un voltímetro especial. El conjunto de voltímetro y electrodos suele denominarse pH-metro (peachímetro). K se obtiene mediante la calibración del aparato con tampones, disoluciones cuyo pH se conoce con gran exactitud.

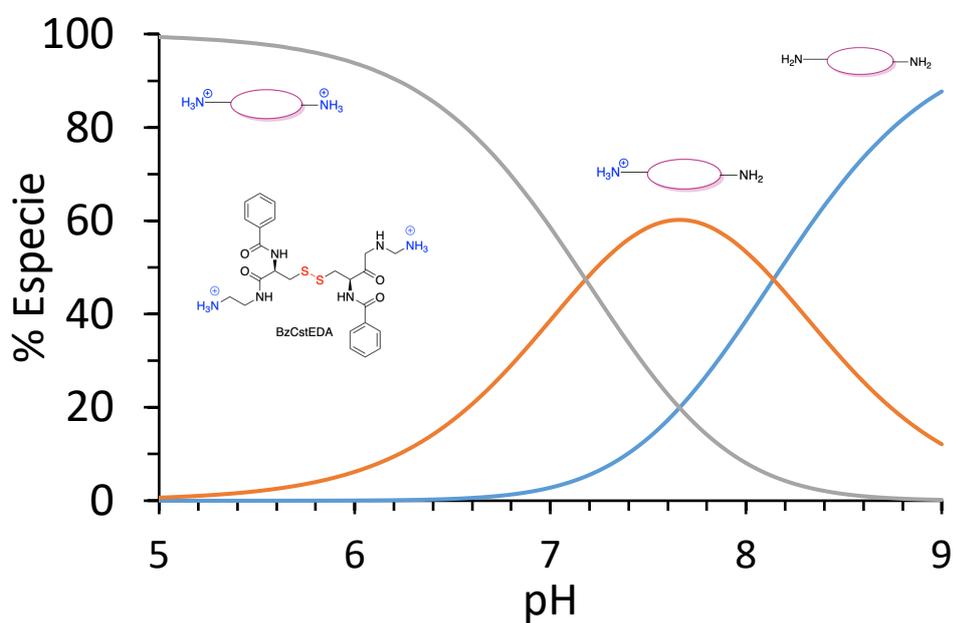
#### 4.1.1 Constantes de acidez y diagrama de especies

Se obtuvieron curvas de valoración (pH / volumen de disolución valorante) para cada uno de los compuestos. A partir de dichas curvas se obtuvieron mediante un proceso iterativo con el programa HYPERQUAD-2008 las siguientes constantes de acidez de los compuestos. Adicionalmente, se realizó un modelo de la distribución de las especies en función del pH usando el programa HYSS-2008. Puesto que ambos compuestos tienen dos grupos amino terminales, existirán 3 especies distintas: doblemente protonada, monoprotonada y sin protonar.

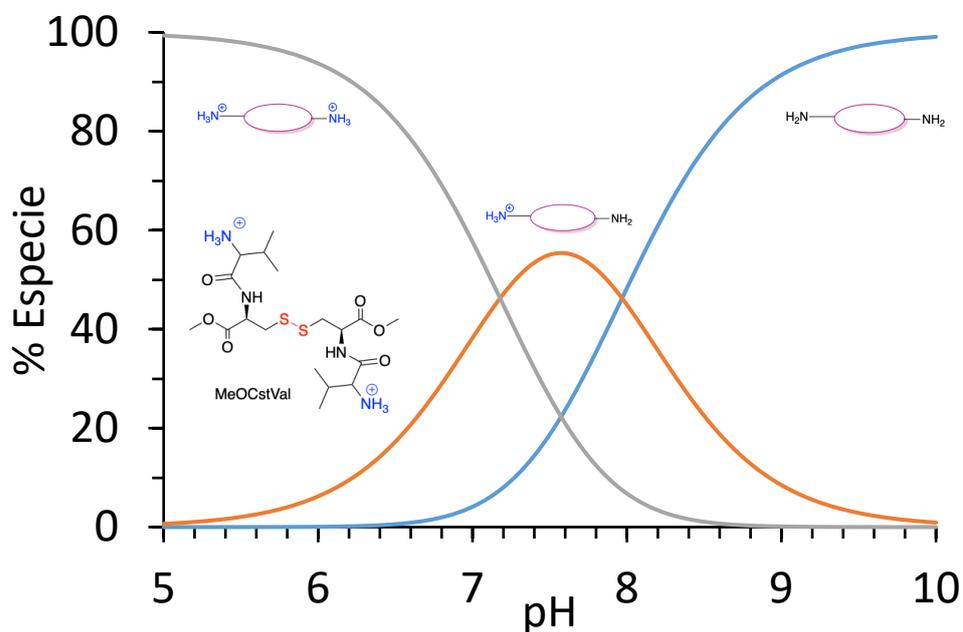
**Tabla 1.** Valores de constantes de acidez

Compuesto	pKa1	pKa2
BzCstEDA	7.2	8.1
MeOCstVal	7.2	8.0

**Gráfica 1.** Diagrama de especies de BzCstEDA en función del pH



Gráfica 2. Diagrama de especies de MeOCstVal en función del pH



#### 4.2. 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 un tinte fluorescente hidrofóbico 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 de disolución muestra un comportamiento fluorescente distinto en soluciones micelares y no micelares.

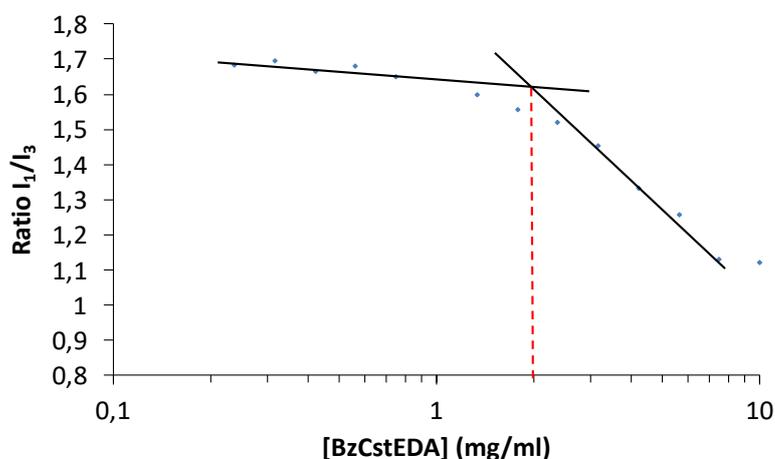
Se ha demostrado que el espectro de fluorescencia del pireno en agua exhibe 5 picos predominantes y que la ratio de intensidad entre el primer y tercer pico (a 373 nm y 384 nm respectivamente) es sensible a la polaridad del medio. Por ejemplo, en disolventes hidrocarbonados,  $I_1/I_3$  tiene un valor cercano a 0.6, en etanol cercano a 1.1 y en agua de 1.8.

Esta ratio,  $I_1/I_3$  se mantiene constante hasta cierta concentración de surfactante, tras la que decae de forma drástica. Esta disminución es indicativa de una solubilización del tinte indicador en un medio más hidrofóbico que el agua, en este caso, las micelas del surfactante. Por lo tanto, la concentración a la que comienza a disminuir esta ratio corresponde a la concentración crítica de agregación.<sup>19</sup>

#### 4.2.1 Concentración crítica de agregación de BzCstEDA

La concentración crítica de BzCstEDA se determinó por medida de la fluorescencia de distintas concentraciones del compuesto en una disolución en una disolución 1  $\mu$ M de pireno en un tampón de citrato de sodio 0.2 M a pH 6, obteniéndose la siguiente gráfica de la que se puede obtener la concentración crítica de agregación: 2 mg/ml.

Gráfica 3. Concentración de BzCstEDA vs Ratio  $I_1/I_3$  del pireno

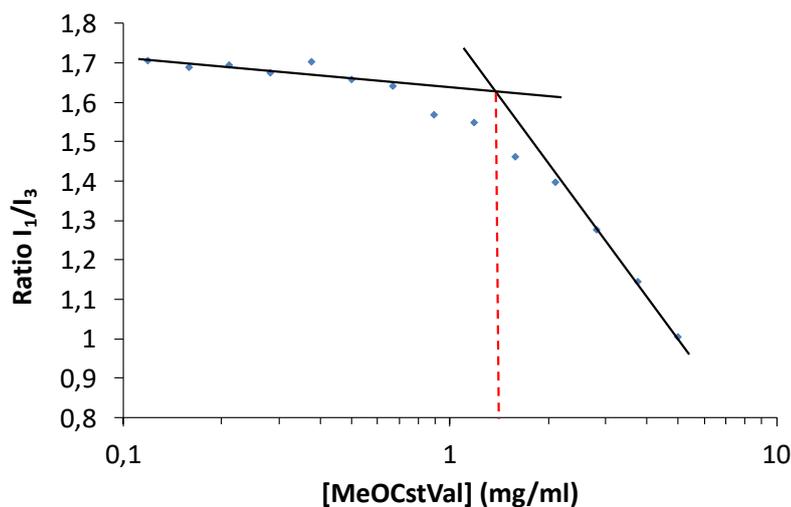


<sup>19</sup> E.D. Goddard, N.J. Turro, P.L. Kuo, K.P. Ananthapadmanabhan, Fluorescence probes for critical micelle concentration determination, *Langmuir* 1 **1985** 352–355.

#### 4.2.2 Concentración crítica de agregación de MeOCstVal

La concentración crítica de MeOCstVal se determinó por medida de la fluorescencia de distintas concentraciones del compuesto en una disolución 1  $\mu$ M de pireno en un tampón de PBS 0.1 M a pH 7.4, obteniéndose la siguiente gráfica de la que se puede obtener la concentración crítica de agregación: 1.5 mg/ml.

Gráfica 4. Concentración de MeOCstVal vs Ratio I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> del pireno



#### 4.3 Determinación del tamaño de partícula por DLS

La detección de la dispersión de la luz en la materia es una técnica muy útil con aplicaciones en una multitud de disciplinas científicas en las que, dependiendo de la fuente de luz y el detector, se pueden estudiar distintas propiedades de las moléculas. Einstein y Smoluchowski propusieron que un líquido debe considerarse como un medio continuo donde las fluctuaciones térmicas crean heterogeneidades que resultan en fluctuaciones en su densidad y concentración. También establecieron la teoría del movimiento Browniano, que explica el movimiento de las partículas en un fluido.<sup>20</sup> Este principio describe cómo las partículas están

<sup>20</sup> Einstein, A., On the movement of small particles suspended in stationary liquids required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der Physik* v.17, **1905**, 549-560

continuamente colisionando con las moléculas del disolvente, generando una cierta cantidad de energía que se transfiere, lo que causa más movimiento.

Cuando un haz de luz monocromático se encuentra con una disolución que contiene macromoléculas, la luz se dispersa en todas las direcciones en función del tamaño y la forma de estas macromoléculas. En la dispersión de luz estática, la intensidad de la luz dispersada se puede analizar como intensidad media a lo largo del tiempo, lo que proporciona información sobre el peso molecular y el radio de las macromoléculas. Por otro lado, si se analizan las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada, se puede obtener el coeficiente de difusión de estas macromoléculas.<sup>21</sup>

La dispersión de luz dinámica, “dynamic light scattering” (DLS), mide primeramente el movimiento browniano de las macromoléculas de la disolución y lo relaciona con el tamaño de la partícula. Este movimiento depende, como hemos indicado, del tamaño, de la temperatura y de la viscosidad del disolvente, por lo que es imprescindible conocer esta información del disolvente a utilizar para la medida. Conociendo todos estos valores se calcula el tamaño de partícula mediante la ecuación de Stokes- Einstein:

$$dH = kT / 3\eta\pi D$$

Donde:

- dH**: diámetro hidrodinámico
- k**: constante de Boltzman
- T**: temperatura absoluta
- **$\eta$** : viscosidad del disolvente
- D**: coeficiente de difusión

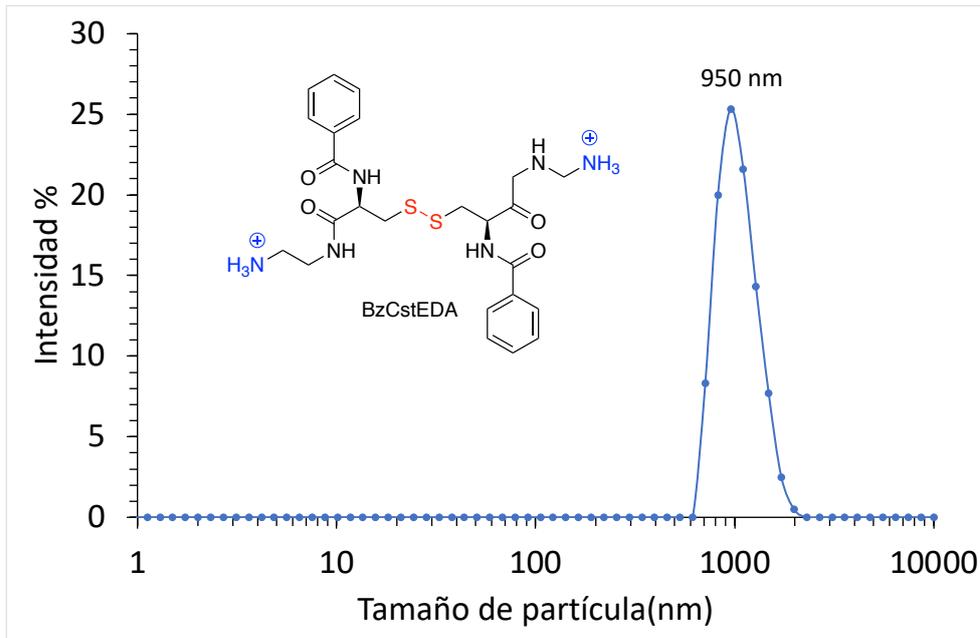
#### 4.3.1 Tamaño de partícula de BzCstEDA

---

<sup>21</sup> Sandhu, R.; Singh, N.; Dhankhar, J.; Gandhi, K. and Sharma, R. Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications. Gandhi, K.; Sharma, R.; Seth, R. eds. *Nano-Technological and Biochemical Techniques for Assessing the Quality and Safety of Milk and Milk Products*, **2018**, (135-137) ICAR-National Dairy Research Institute, Karnal

Tras la medida en el equipo de DLS de una disolución de BzCstEDA en tampón CTRT (citrato de sodio) pH=6, la distribución de tamaños de partícula obtenida es la siguiente:

Gráfica 5. Distribución de tamaños de BzCstEDA

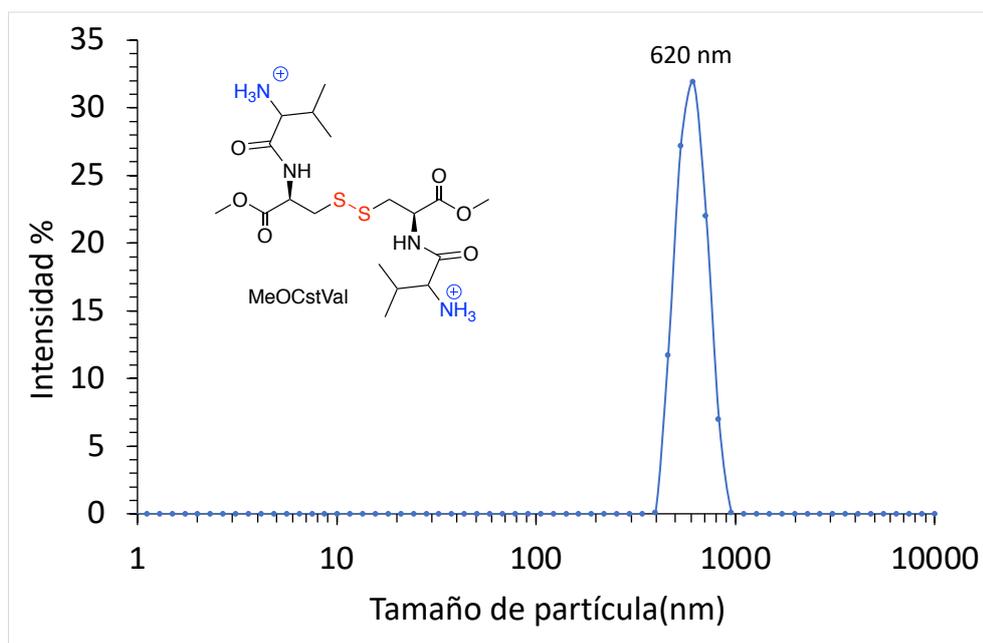


Con esta medida se puede determinar el tamaño de partícula formada a una concentración de 3 mM, 950 nm, concretamente.

#### 4.3.2 Tamaño de partícula de MeOCstVal

Tras la medida en el equipo de DLS de una disolución de MeOCstVal en tampón PBS (tampón fosfato salino) pH=7.4, la distribución de tamaños de partícula obtenida es la siguiente:

Gráfica 6. Distribución de tamaños de partícula de MeOCstVal



Con esta medida se puede determinar el tamaño promedio de partícula formada a una concentración de 0.9 mM, 620 nm, concretamente.

# Conclusiones



## Conclusiones

Siguiendo los estudios del grupo de investigación, se ha presentado una ruta sintética para la obtención de dos nuevos bolaanfífilos catiónicos derivados de la cistina y se han estudiado algunas de sus propiedades. Tras distintos análisis podemos concluir que tanto BzCstEDA como MeOCstVal forman agregados, presuntamente vesículas, capaces de encapsular pireno a partir de unas concentraciones de 2 y 1.5 mg/ml respectivamente. Además hemos podido determinar su tamaño de partícula siendo de 950 nm para BzCstEDA y 620 nm.

Se espera en un futuro poder estudiar su sensibilidad a agentes reductores tales como la glutatona, en los que se espera una respuesta positiva debido a la presencia de puente disulfuro en ambas moléculas. En el caso de que, de hecho, estas moléculas sean sensible a la glutatona y las vesículas colapsen en su presencia, podría estudiarse su capacidad para encapsular compuestos biológicamente activos así como ácidos nucleicos y pasar a los pertinentes estudios biológicos para poder determinar su utilidad en el campo médico.



## **Sección Experimental**



## Sección Experimental

### 5.1 Determinación del pKa

Para la determinación del pKa de las dos moléculas obtenidas se disolvieron aproximadamente 10 mg del compuesto a analizar (pesados con exactitud de 0.1 mg) en 3.5 ml de H<sub>2</sub>O y 3.5 ml de HCl 0.1M. Esta disolución se introdujo en el pH-metro y se realizaron medidas continuas mientras se adicionaba NaOH 0.1M a una velocidad de 0.06 ml/min mediante una bomba de jeringa, hasta alcanzar un pH = 12. Las medidas se hicieron al menos por duplicado. Los datos experimentales se trataron con el programa HYPERQUAD-2008 para obtener las constantes.

### 5.2 Fluorimetría

Para la determinación por fluorescencia de la concentración crítica micelar se preparó una disolución de pireno 1 micromolar en el respectivo tampón (citrato 0.2M pH= 6 para el BzCstEda, PBS 0.1M pH=7.4 para MeOCstVal). A continuación, se disolvió 20 mg del compuesto en 2 ml de la disolución tampón preparada y se procedió a medir su fluorescencia en el fluorímetro. Una vez realizada la medida, se diluye la muestra a la concentración deseada y se vuelve a medir. Se siguen realizando diluciones hasta que la relación entre I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> sea estable.

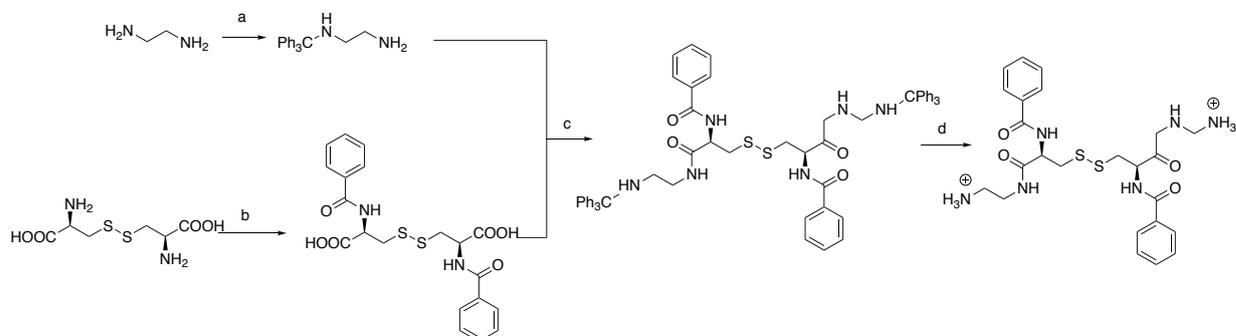
### 5.3 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Para la medida de DLS de BzCstEDA, se introduce en una cubeta de UV-Vis de 1 cm de paso óptico una disolución 5.9 mM en tampón de CTRT pH 6 (5.38 mg compuesto en 1.2 ml de tampón filtrado). Tras la medida, se diluye 600 µl de la disolución en 600 µl de tampón filtrado. Se vuelve a realizar la medida y se repite la dilución hasta 4 veces.

Para la medida de DLS de MeOCstVal, se introduce en la cubeta una disolución 3.5 mM en tampón de PBS pH 7.4 (2.9 mg de compuesto en 1.2 ml de tampón de PBS filtrado). Tras la medida, se diluye 600 µl de la disolución en 600 µl de tampón filtrado. Se vuelve a realizar la medida y se repite la dilución hasta 4 veces.

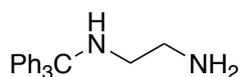
Las medidas se realizaron al menos por cuadruplicado en el equipo de DLS Malvern ZetaSizer utilizando los parámetros de atenuación y número de scans optimizados por el equipo.

## 5.4 Procedimiento experimental para la síntesis de BzCstEDA



**Esquema 7** Reactivos y condiciones en la síntesis de BzCstEDA: a)  $\text{Ph}_3\text{CCl}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , 1h., 66,7%; b)  $\text{BzCl}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\text{NaOH}$ , 16h. 63,9%; c)  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{DIPEA}$ ,  $-70^\circ\text{C}$ , 24h, 50,5%; d)  $\text{DCM}$ ,  $\text{THF}$ , 16 h., 86%.

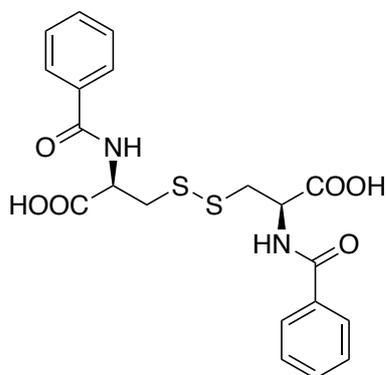
## 5.4.1 Monoprotección de la etilendiamina



Se disuelven 3.3 ml (48.2 mmol, 12 eq.) de etilendiamina en 10 ml de cloroformo y se introducen en un baño de hielo con agitación. Se añade 1.17 g (4mmol, 1 eq.) de  $\text{Ph}_3\text{CCl}$  en 30 ml de cloroformo a la disolución gota a gota durante 1h. A continuación se extrae con salmuera y agua, se seca con  $\text{MgSO}_4$  y se evapora el disolvente orgánico en el rotavapor. Se obtiene un aceite que se deja a vacío. El producto se purifica con una columna de sílicagel utilizando como eluyente acetato de etilo hasta la elución de todo el  $\text{Ph}_3\text{CCl}$ . Entonces se cambia el eluyente a acetato de etilo/metanol 1:1 y a continuación metanol 100% hasta eluir todo el producto. Se evapora el disolvente en el rotavapor dando lugar a un líquido viscoso. Se obtiene 0.81g de **trtEDA** (66.7% de rendimiento).

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )**  $\delta$  7.44 – 7.37 (d, 6H), 7.23 – 7.16 (t, 6H), 7.14 – 7.07 (t, 3H), 2.71 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.15 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H).

### 5.4.2 Benzoilación de L-cistina

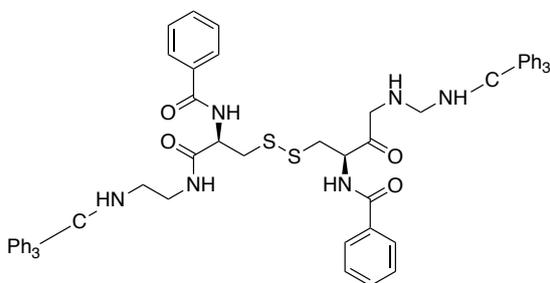


Se introduce 4 g (16.6 mmol, 1 eq.) de L-cistina en un baño de hielo y se le añade una disolución de 16.6 ml de Et<sub>2</sub>O, 1.6 ml EtOH, 36.6 ml NaOH 2M y 50 ml de agua. Se deja agitando hasta que la temperatura de la disolución alcance los 0 °C. A continuación, se añade gota a gota 5.8 ml (49.9 mmol, 3 eq.) de cloruro de benzoilo. Se retira la disolución del baño de hielo y se deja agitando durante la noche. Al día siguiente se añade 100 ml de agua y NaOH 10M hasta obtener un pH básico. Tras llegar a pH

básico se lava 3 veces con Et<sub>2</sub>O. Se añade poco a poco a la fase acuosa HCl 6M hasta un pH=2, para precipitar el producto blanco, que se filtra a vacío, lavándolo con agua caliente para eliminar los restos de ácido benzoico. Después de secar en estufa de vacío a 50 °C toda la noche se obtiene N,N'-dibenzoilcistina (**BzCst**) como un polvo blanco (63.9% rendimiento).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.12 (dd, *J* = 13.7, 10.1 Hz, 1H), 3.28 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 4.71 (ddd, *J* = 10.0, 7.9, 4.3 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 8.2, 6.4 Hz, 2H), 7.50 – 7.57 (m, 1H), 7.81 – 7.88 (m, 2H), 8.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H).

### 5.4.3 Acoplamiento trtEDA y N,N'-dibenzoilcistina



Se añade 50 ml de Et<sub>2</sub>O anhidro a 1 g (2.2 mmol, 1 eq.) de N,N'-dibenzoilcistina y se introduce en un baño de hielo con agitación vigorosa. Tras enfriarse la suspensión se añade 1.05 g (5 mmol, 2.2 eq.) de PCl<sub>5</sub> y se deja agitando media hora. A continuación, se filtra a vacío y se

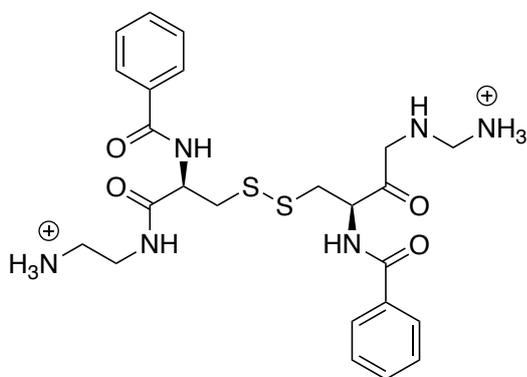
lava con Et<sub>2</sub>O anhidro frío. Se obtiene un sólido blanco correspondiente al cloruro de ácido que se separa por filtración.

Se prepara un baño de nitrógeno líquido con AcOEt, añadiendo poco a poco acetato al nitrógeno hasta conseguir una textura cremosa de la mezcla refrigerante, que está a una temperatura de alrededor de -70°C. Se introduce en un balón de dos bocas bajo atmósfera inerte de nitrógeno ~70 ml de Et<sub>2</sub>O anhidro. Con agitación, se

añade el sólido blanco correspondiente al cloruro de ácido, 2 g (6.7 mmol, 3 eq.) de trtEDA suspendida en Et<sub>2</sub>O anhidro y 1,6 ml (8.9mmol, 4 eq.) de DIPEA. Se deja calentar a temperatura ambiente, con agitación magnética, hasta el día siguiente. En el matraz se forma un precipitado blanco que se filtra a vacío y se lava con éter frío. El sólido blanco se deja en la estufa y se pesan 1.146 g de producto **BzCstEDA(trt)<sub>2</sub>** (50.5% de rendimiento).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.20 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H), 2.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H), 3.07 (dd, *J* = 13.3, 7.3 Hz, 1H), 3.52 – 3.60 (m, 1H), 4.49 (s, 1H), 7.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 7.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 8H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 8H), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H).

#### 5.4.4 Desprotección de la amina, obtención del producto final.

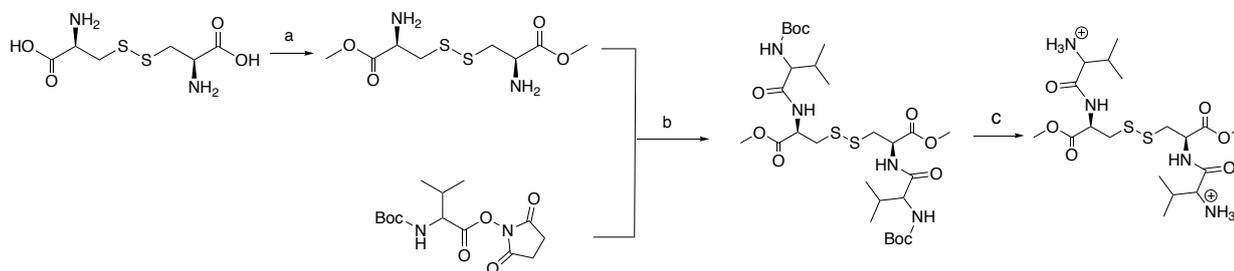


Se disuelve 0.684 g (0.6 mmol, 1 eq.) de BzCstEDA(Trt)<sub>2</sub> en 40 ml de DCM y se le añade gota a gota y con agitación 20 ml de ácido Trifluoroacético. Se deja agitando durante una hora y se evapora el disolvente en el rotavapor. Se añade más diclorometano y se vuelve a evaporar dos veces más para eliminar los restos del ácido. Se obtiene un sólido amarillo. Se deja secando en la estufa y se pesa.

Finalmente se obtiene 0.44 g de la sal de **BzCstEDA** (86% de rendimiento).

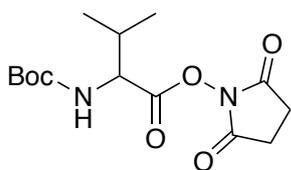
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 3.19 (dd, *J* = 14.0, 9.5 Hz, 1H), 3.30 – 3.34 (m, 5H), 3.44 (dd, *J* = 14.0, 4.5 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.82 – 7.85 (m, 2H).

## 5.5 Procedimiento experimental para la síntesis de MeOCstVal



**Esquema 8.** Reactivos y condiciones en la síntesis de MeOCstVal: a) MeOH, SOCl<sub>2</sub>, -5°C, 1h., 93.7%; b) Trietilamina, DMF, 40°C 24h. 65,9% c) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 4h., 100%; d) DCM, THF, 16 h., 64.8%.

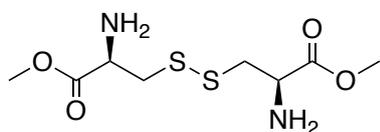
### 5.5.1 Activación de BocVal como BocValOSuc



A una disolución de 10.1 g (46.5 mmol, 1 eq.) de BocValOH y 5.33 g (46.3 mmol, 1 eq.) de NHS en 100 ml de THF en un baño de hielo se le añade gota a gota con un embudo de adición una suspensión de 9.6 g (46.5 mmol, 1 eq.) de DCC en 45 ml de THF, bajo atmósfera de nitrógeno. Se deja una hora agitando en el baño de hielo y se guarda en el frigorífico hasta el día siguiente. En la disolución se forma un precipitado blanco que se filtra a vacío. Se desecha el sólido y se evapora el disolvente en el rotavapor. A continuación, se añade isopropanol y se recristaliza en un reflujo a 100°C. Se filtra lavando los cristales con isopropanol frío. Se repite el proceso de recristalización y filtrado y se seca el sólido en la estufa hasta el día siguiente. Se obtiene 4.283 g de **BocValOSuc** (30,9% de rendimiento).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.06 (dd, *J* = 13.8, 6.9 Hz, 8H), 1.46 (s, 11H), 2.30 (dd, *J* = 12.0, 6.3 Hz, 1H), 2.84 (s, 5H), 4.99 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H).

### 5.5.2 Metilación de L-cistina

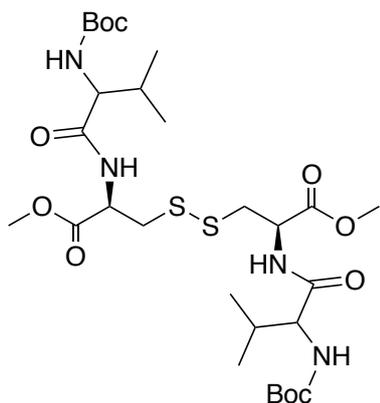


Se disuelve 1.024 g (4.3 mmol, 1 eq.) de L-cistina en 30 ml de MeOH en un matraz de fondo redondo y se introduce en un baño de hielo y sal (80 g hielo y 80 g NaCl, de forma que la temperatura sea entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Se añade poco a poco y con agitación 1.42 ml (10.2 mmol, 2.4 eq.) de  $\text{SOCl}_2$ . Se deja agitando tapado durante una hora. A continuación, se introduce el balón en un baño de arena y se deja a reflujo a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 4h. Transcurrido el tiempo se evapora el disolvente en el rotavapor y se disuelve el sólido formado en la mínima cantidad de metanol, para recrystalizarlo en  $\sim 50$  ml de éter, donde se forma un sólido blanco. Evaporamos el disolvente y se seca a vacío.

Se obtiene 1.362 g de **MeOCst** (93.7% de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  3.33 – 3.40 (m, 4H), 3.46 (ddd,  $J = 15.0, 5.0, 1.0$  Hz, 1H), 3.93 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H), 4.51 (ddd,  $J = 6.5, 5.0, 1.2$  Hz, 1H).

### 5.5.3 Acoplamiento de MeOCst y BocValOSuc

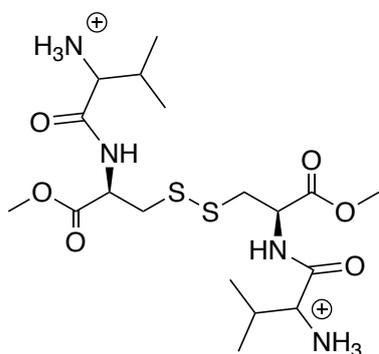


A 1.007 g de BocValOSuc se le añade 0.572 g de MeOCst, 0.935 ml de trietilamina y 50 ml de DMF. Se introduce el matraz de reacción en un baño de arena a  $40^{\circ}\text{C}$  y se deja agitando hasta el día siguiente. Se forma un precipitado blanco que se filtra a vacío.

Se obtiene 0.737 g de **MeOCstValBoc** (65.9% de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  0.99 (td,  $J = 20.1, 18.3, 6.7$  Hz, 6H), 1.41 (d,  $J = 8.2$  Hz, 9H), 2.00 – 2.15 (m, 1H), 3.00 – 3.18 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.10 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 4.89 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 5.38 (dd,  $J = 44.2, 9.3$  Hz, 1H), 7.44 – 7.52 (m, 1H).

#### 5.5.4 Desprotección grupo Boc, obtención del producto final



Se pesa 0.360 g (0.5 mmol, 1 eq.) de MeOCstValBoc y se disuelve en 20 ml de diclorometano. A continuación, se añade gota a gota 4 ml (50.4 mmol, 93.3 eq.) de ácido trifluoroacético, con agitación. Se deja agitando durante la noche. Al día siguiente se evapora el disolvente en el rotavapor, se disuelve el sólido en más diclorometano y se vuelve rotaevaporar. Este proceso se repite 4 veces antes de dejar el sólido secando a vacío.

Finalmente se obtiene 0.243 g de sal de **MeOCstVal** (64.8% de rendimiento).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Deuterium Oxide)  $\delta$  1.00 (t,  $J = 6.4$  Hz, 8H), 2.21 (h,  $J = 7.7, 6.9$  Hz, 1H), 3.07 (dt,  $J = 14.4, 5.9$  Hz, 1H), 3.27 (dq,  $J = 14.8, 3.7$  Hz, 1H), 3.73 (d,  $J = 2.3$  Hz, 3H), 3.82 – 3.88 (m, 1H), 4.81 (dt,  $J = 8.4, 4.0$  Hz, 1H).



# **ANEXO**



6.1 ESPECROS RMN

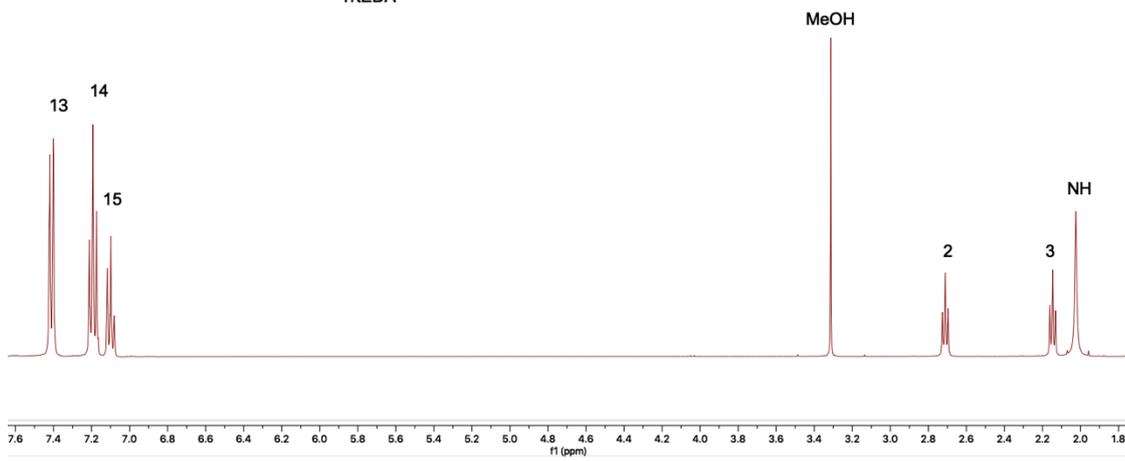
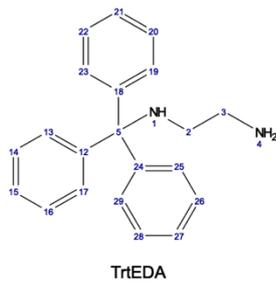


Figura 6-1.  $^1\text{H}$  RMN de TrtEDA en Metanol- $d_4$

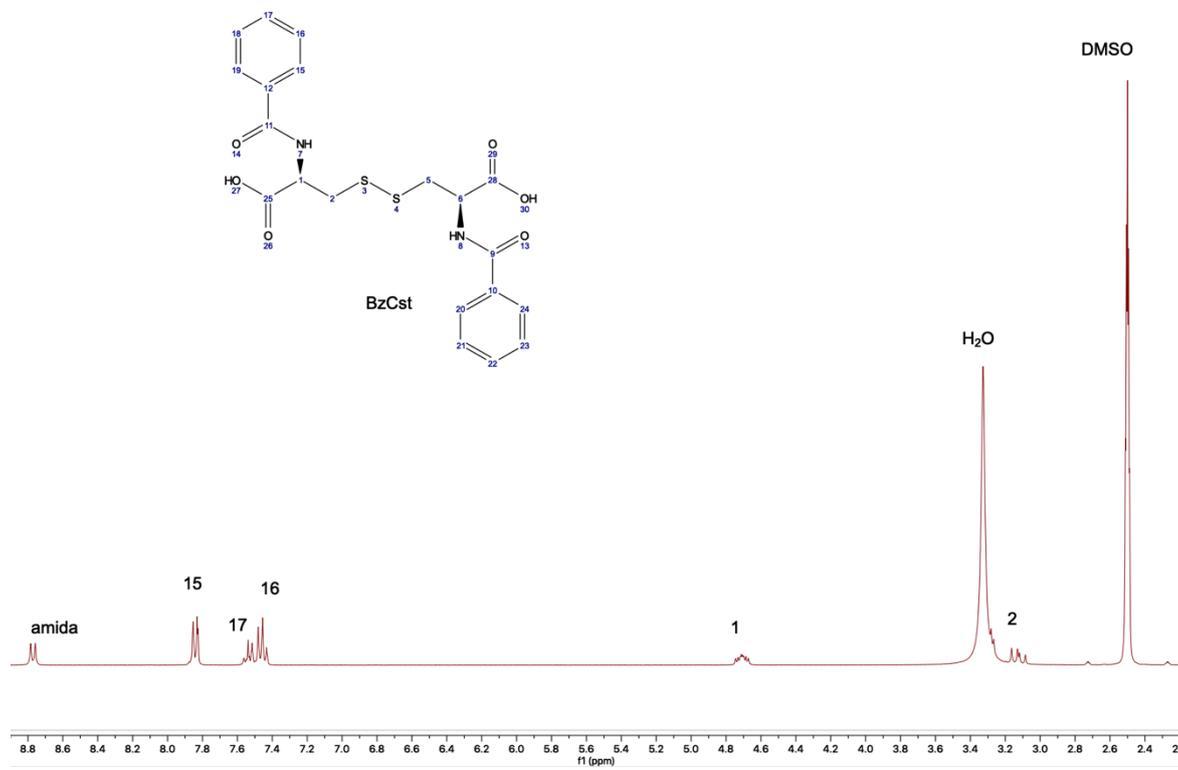
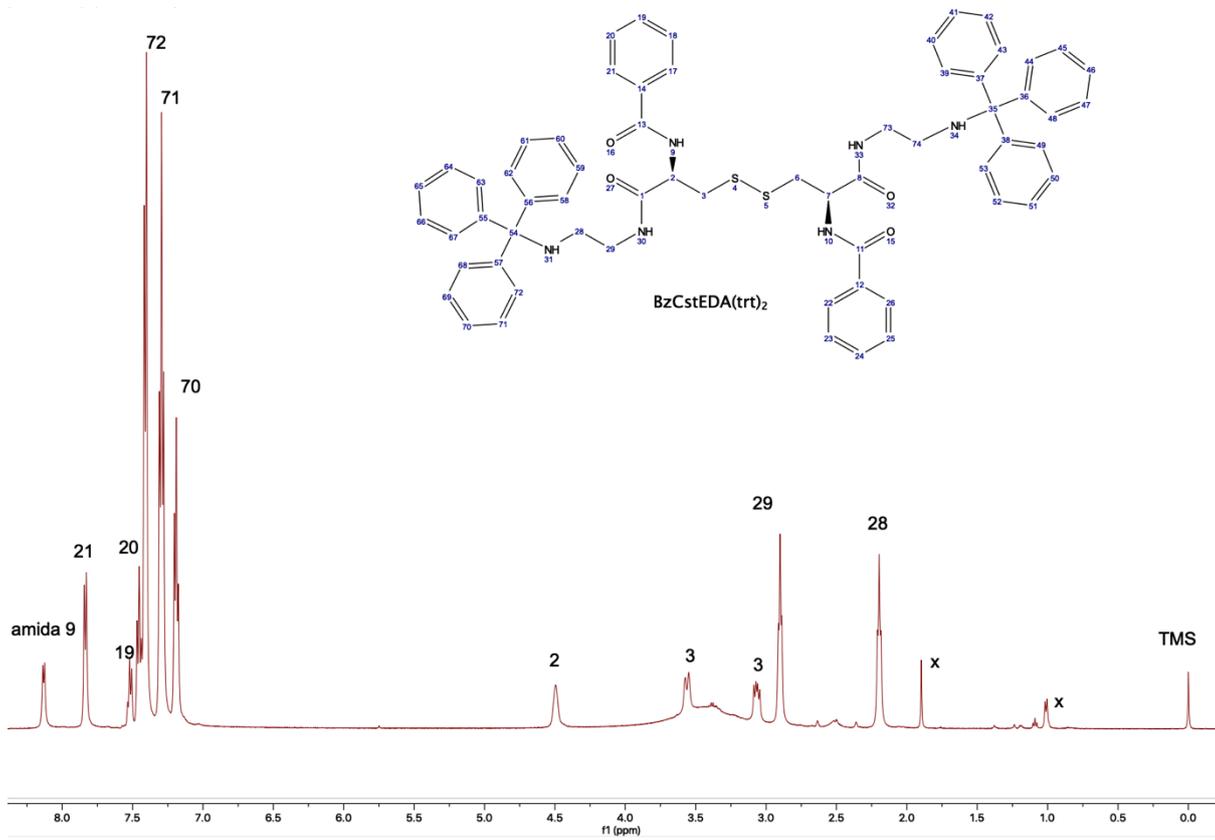
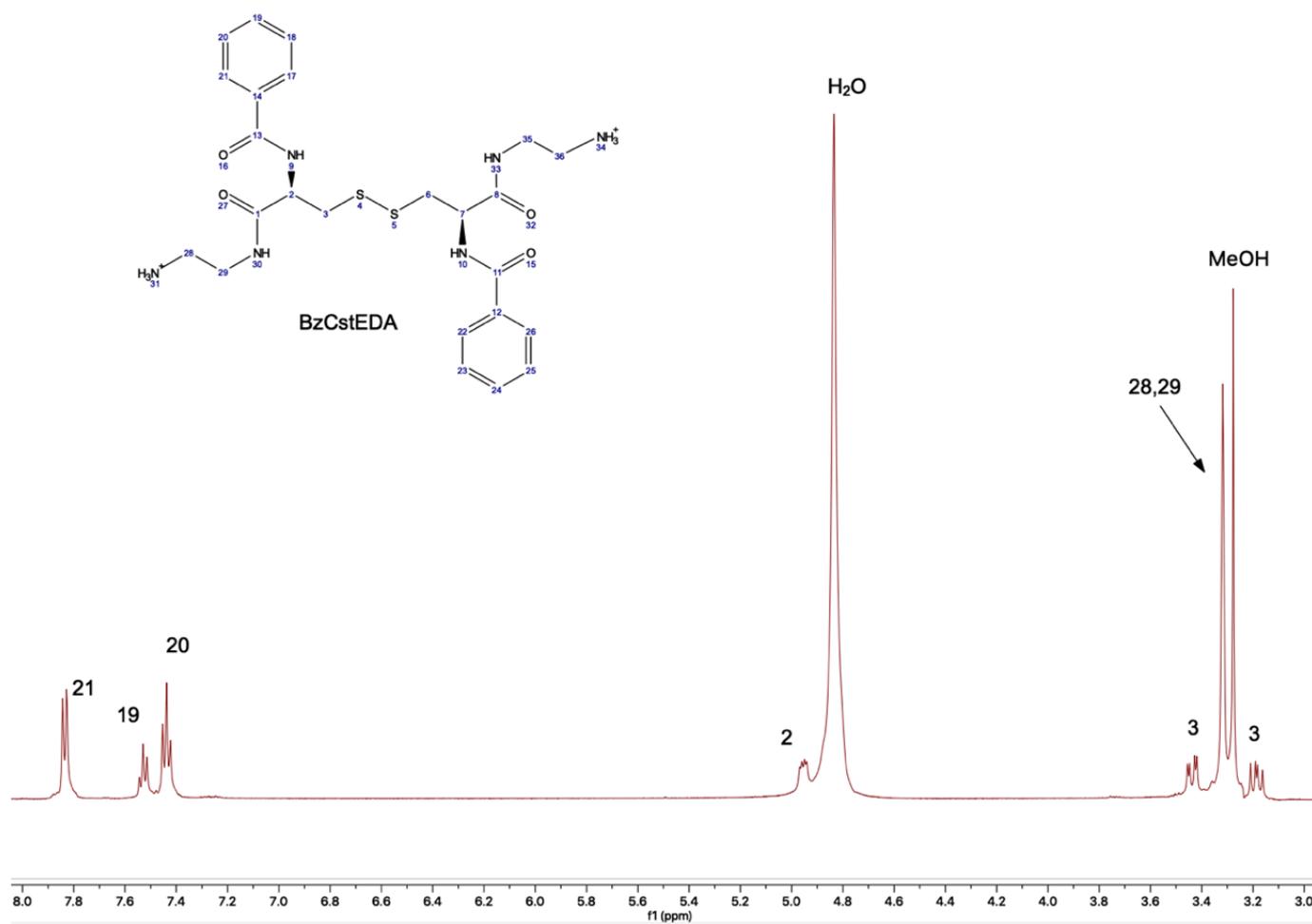


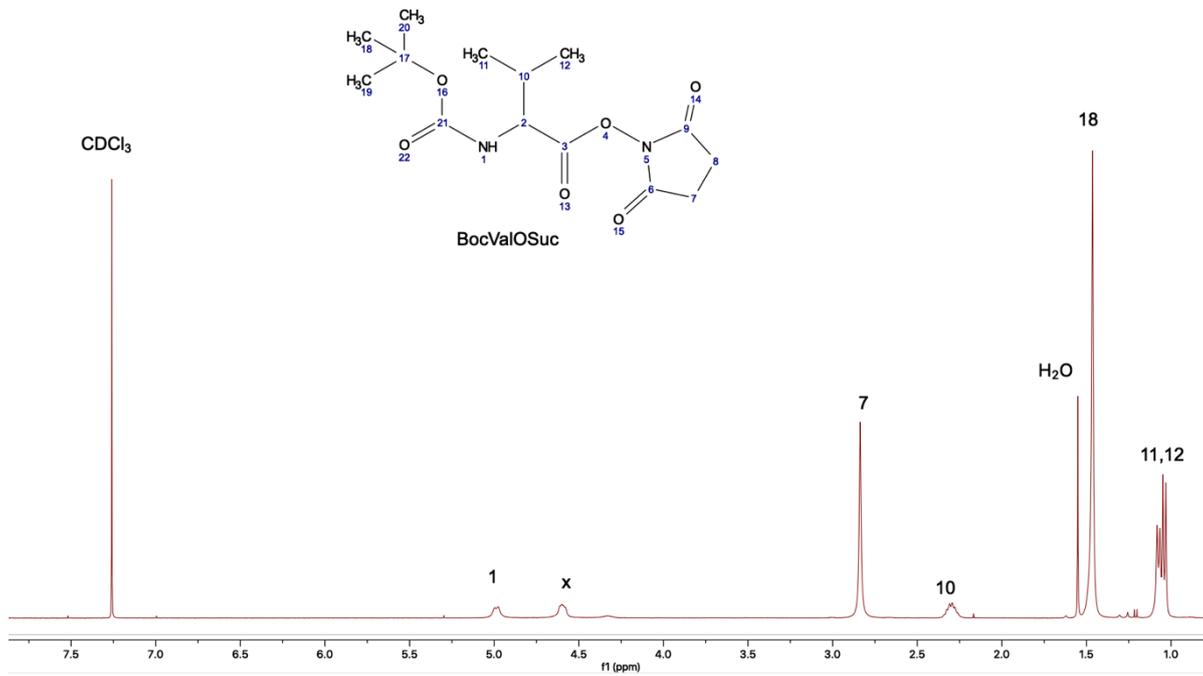
Figura 6-2.  $^1\text{H}$  RMN de BzCst en  $\text{DMSO-}d_6$



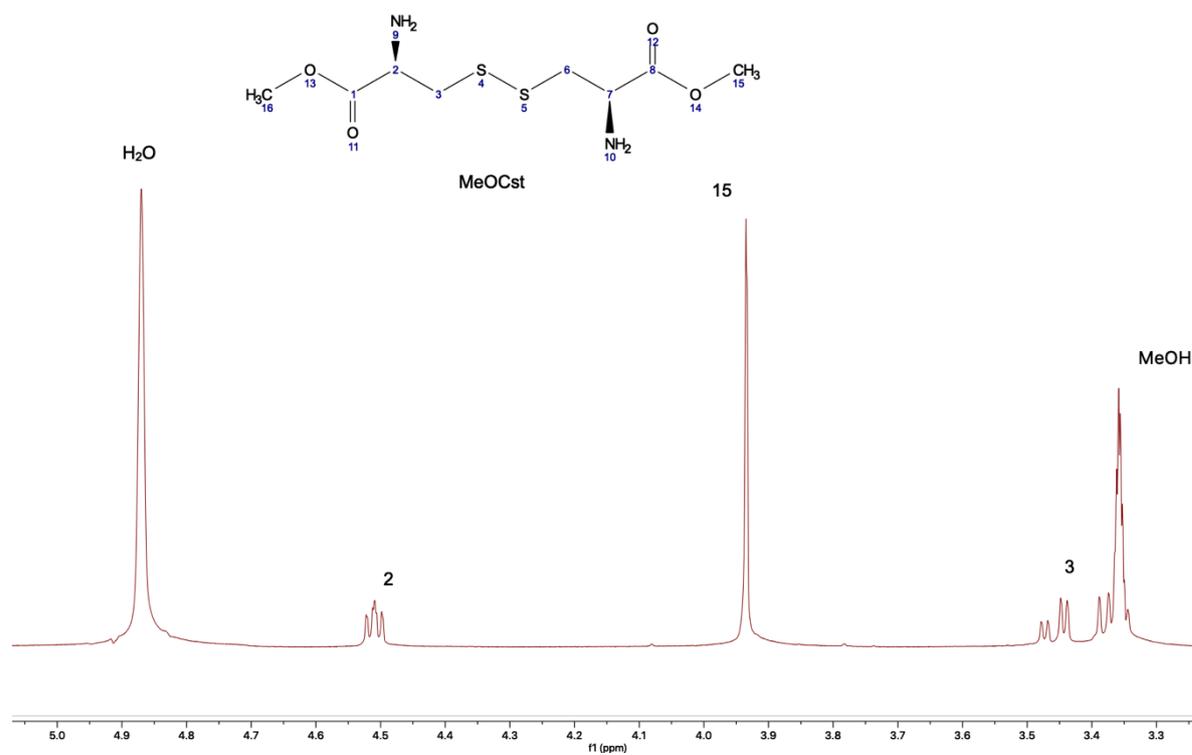
**Figura 6-3.**  $^1\text{H}$  RMN de  $\text{BzCstEDA}(\text{trt})_2$  en  $\text{DMSO-}d_6$



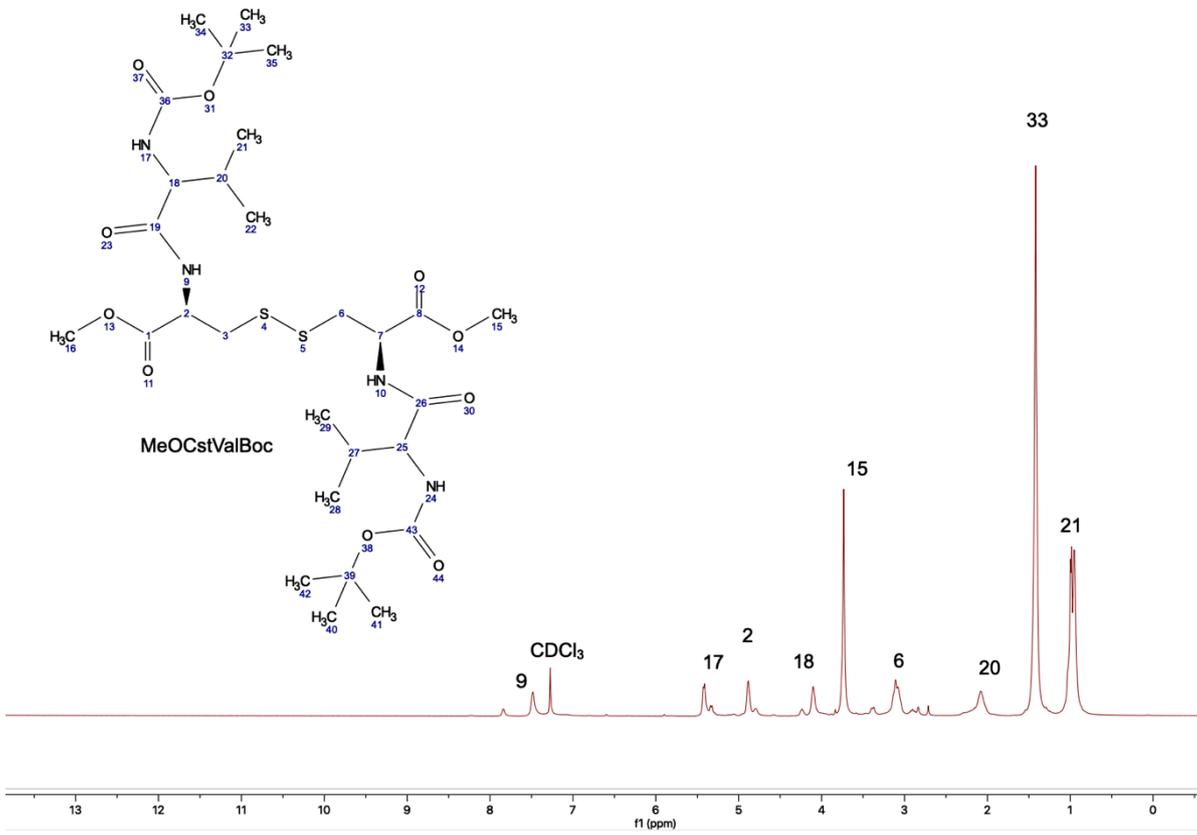
**Figura 6-4.**  $^1\text{H}$  RMN de BzCstEDA en  $\text{Metanol}-d_4$



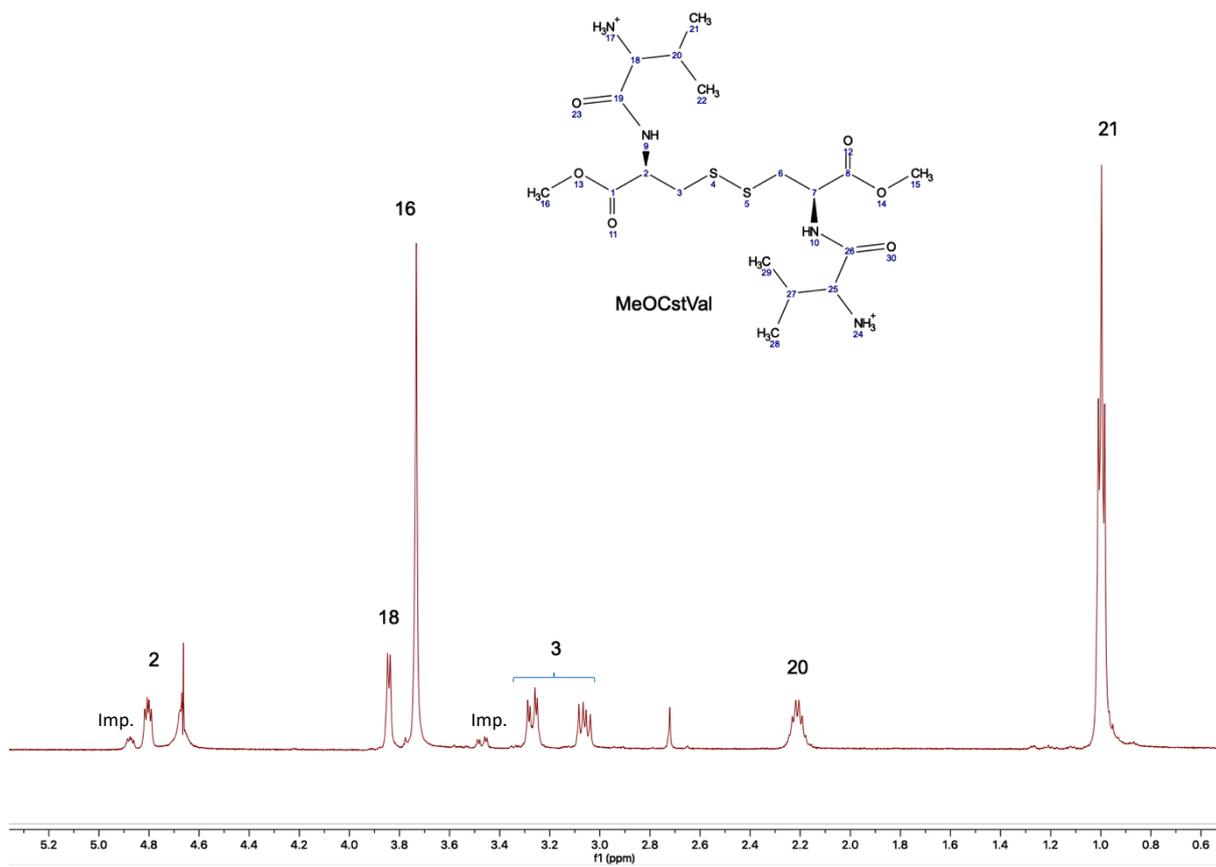
**Figura 6-5.**  $^1\text{H}$  RMN de BocValOSuc en Cloroformo-*d*



**Figura 6-6.-.** <sup>1</sup>H RMN de MeOCst en Metanol-*d*<sub>4</sub>



**Figura 6-7.-.** <sup>1</sup>H RMN de MeOCstValBoc en Cloroformo-*d*



**Figura 6-8.-.** <sup>1</sup>H RMN de MeOCstVal en Agua deuterada

