



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

SENSOR LUMINESCENTE DO ENZIMA LASB

SENSOR LUMINISCENTE DE LA ENZIMA LASB

LUMINESCENT SENSOR OF THE ENZYME LASB

Nerea Lamas Carballido

Curso: 2022 - 2023. Convocatoria: Xullo

Director/a 1: Elena Pazos Chantrero

Director/a 2: Francisco Fernández Trillo

ÍNDICE

RESUMO.....	1
INTRODUCCIÓN	4
1. O caso da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como patóxeno	4
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.2. Elastasa B de <i>P. aeruginosa</i>	5
2. Proteínas e péptidos	6
2.1. Enlace peptídico e estrutura de proteínas.....	6
2.2. Síntese de péptidos en fase sólida.....	8
3. Sensores luminescentes	12
3.1. Luminescencia	12
3.2. Sistemas luminescentes de lantánidos	13
OBXECTIVO	19
RESULTADOS E DISCUSIÓN	20
Deseño do sensor.....	20
Síntese do sensor	20
Estudos da emisión de fosforescencia do sensor	27
PARTE EXPERIMENTAL	31
Cronograma	31
Información xeral.....	31
Desenvolvemento sintético	31
Luminescencia.....	37
CONCLUSIÓNS.....	38
BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXO	43

ABREVIATURAS

Å	angstrom	LasB	elastasa B
aa	aminoácido	MeCN	acetonitrilo
Ac	acetilo	mAu	miliunidades de absorbancia
Alloc	aliloxicarbonilo	Mili-Q (MQ)	<i>Millipore</i>
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo	MS	espectrometría de masas
Bzl	benzoilo	m/z	relación masa/carga
CaCl₂	cloruro cálcico	N₂	nitrógeno
CH₂Cl₂	diclorometano	NaCl	cloruro sódico
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida	Naph	naftalimida
DEDTC	dietilditiocarbamato	NH₄Ac	acetato de amonio
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina	nm	nanometros
DMF	dimetilformamida	NMN	<i>N</i> -metilmorfolina
DO3A	1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético	Pd(OAc)₂	acetato de paladio(II)
ESI	electronebulización	PhSiH₃	fenilsilano
Et₃N	triethylamina	PPh₃	trifenilfosfina
EuCl₃	cloruro de europio(III)	PyAOP	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio
Fmoc	9-fluoronilmeiloxicarbonilo	PyBOP	hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio
HATU	hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio	<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -butilo
HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio	TFA	ácido trifluoroacético
HEPES	ácido 4-(2-hidroxi)etilpiperazin-1-iletanosulfónico	TIC	Total Ion Chromatogram
HF	ácido fluorhídrico	TIS	triisopropilsilano
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol	TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico
HOBt	hidroxibenzotriazol	<i>t_R</i>	tempo de retención
HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficacia	UV-Vis	ultravioleta-visible

RESUMO

Na actualidade hai un montón de bacterias multi-resistentes ás que lle hai que facer fronte. Unha das infeccións con peor pronóstico que adquiren os enfermos nos hospitais é a ocasionada pola bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Esta bacteria secreta ao exterior unha enzima denominada elastasa B, a cal ten a función de cortar secuencias peptídicas específicas coma por exemplo, -GLA- dos seus substratos ademais de, producir lesións tisulares e hemorráxicas. Por esta razón, existe un gran interese en desenvolver sensores para a detección e monitorización da actividade da LasB, permitindo así realizar a detección da bacteria de interese.

Neste traballo de fin de grao, deseñouse e se sintetizou un sensor formado por un complexo macrocíclico de Eu(III) unido a un péptido que contén a secuencia de corte específico da enzima e ao que se lle engadiu 1,8-naftalimida nunha cadea lateral dun aminoácido, que actúa como unidade sensibilizadora do complexo metálico. O funcionamento da sonda consiste na produción de emisión de luminescencia por parte do lantánido.

O mecanismo de detección proposto basease na perda de luminescencia do sensor producida tras a degradación deste pola enzima en dous fragmentos no que a antena e o complexo metálico non están próximos como para que a transferencia de enerxía sexa eficiente. A síntese do péptido levouse a cabo mediante o método de fase sólida introducindo un complexo macrocíclico, derivado de DO3A, e a antena seguindo protocolos descritos na bibliografía.

Para a detección da bacteria lévanse a cabo estudos das propiedades fotofísicas do complexo peptídico de Eu(III) e da súa capacidade para monitorizar a actividade da enzima LasB.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, elastasa B, péptidos, complexos de lantánidos, luminescencia, sensores luminescentes

RESUMEN

En la actualidad hay un montón de bacterias multi-resistentes a las que hay que hacerles frente. Una de las infecciones con peor pronóstico que adquieren los enfermos en las hospitales es la ocasionada por la bacteria *Pseudomona aeruginosa*.

Esta bacteria secreta al exterior una enzima denominada elastasa B, la cuál tiene la función de cortar secuencias peptídicas específicas como por ejemplo, -GLA- de sus substratos además de, producir lesiones tisulares y hemorrágicas. Por esta razón, existe un gran interés en desenvolver sensores para la detección y monitorización de la actividad de la LasB, permitiendo así realizar la detección de la bacteria de interés.

En este trabajo de fin de grado, se diseñó y se sintetizó un sensor formado por un complejo macrocíclico de Eu(III) unido a un péptido que contiene la secuencia de corte específico de la enzima y al que se le añadió 1,8-naftalimida en una cadena lateral de un aminoácido, que actúa como unidad sensibilizadora del complejo metálico. El funcionamiento de la sonda consiste en la producción de emisión de luminiscencia por parte del lantánido.

El mecanismo de detección propuesto se basea en la pérdida de luminiscencia del sensor producida tras la degradación de este por la enzima en dos fragmentos en el que la antena y el complejo metálico no están próximos como para que la transferencia de energía sea eficiente. La síntesis del péptido se llevo a cabo mediante el método de fase sólida introduciendo un complejo macrocíclico, derivado de DO3A, y la antena siguiendo protocolos descritos en la bibliografía.

Para la detección de la bacteria se llevan a cabo estudios de las propiedades fotofísicas del complejo peptídico de Eu(III) y de su capacidad para monitorizar la actividad de la enzima LasB.

Palabras clave: *Pseudomona aeruginosa*, elastasa B, péptidos, complejos de lantánidos, luminiscencia, sensores luminiscentes

ABSTRACT

Nowadays there are a lot of multi-resistant bacteria that have to be dealt with. One of the infections with the worst prognostic that patients acquire in hospitals is caused by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*.

This bacterium secretes an enzyme called elastase B abroad, which has the function of cutting specific peptide sequences such as -GLA- from their substrates, as well as producing tissue and hemorrhagic lesions. For this reason, there is great interest in developing sensors for the detection and monitoring of LasB activity, thus achieving the detection of the bacterium of interest.

In this final degree project, a sensor consisting of a macrocyclic complex of Eu(III) linked to a peptide containing the specific cutting sequence of the enzyme was designed and synthesized, to which 1,8-naphthalimide was added. on a side chain of an amino acid, which acts as a sensitizing unit for the metal complex. The operation of the probe consists in the production of luminescence emission by the lanthanide.

The proposed detection mechanism is based on the loss of luminescence of the sensor produced after its degradation by the enzyme in two fragments in which the antenna and the metal complex are not close enough for the energy transfer to be efficient. Peptide synthesis was carried out using the solid phase method, introducing a macrocyclic complex, derived from DO3A, and the antenna following protocols described in the bibliography.

To detect the bacterium, studies are carried out on the photophysical properties of the Eu(III) peptide complex and its ability to monitor the activity of the LasB enzyme.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, elastase B, peptides, lanthanide complexes, luminescence, luminescent sensors

INTRODUCCIÓN

1. O caso da *Pseudomonas aeruginosa* como patóxeno

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Dentro das infeccións de peor pronóstico máis frecuentes asociadas a bacterias multi-resistente adquiridas por pacientes ingresados nun hospital, atópanse as producidas por *P. aeruginosa*¹.

A *P. aeruginosa* é un patóxeno oportunista Gram negativo, designado pola Organización Mundial da Saúde coma unha prioridade crítica para o desenvolvemento de novas terapéuticas debido aos altos niveis de resistencia intrínscica a moitos antibióticos. A maioría das cepas son capaces de causar enfermidades a hospedes enfermos, en particular persoas con fibrosis quística e bronquiectasias, onde causa infeccións pulmonares crónicas, ademais de que esta pode persistir no medio ambiente.

Este patóxeno combina unha membrana externa de permeabilidade limitada cun conxunto de bombas efflux para limitar de maneira eficaz o acceso dos antibióticos aos seus obxectivos, incluídos os antibióticos aos que nunca estivo exposto². Ao poseer dúas membranas con diferentes propiedades químicas, fai así á *P. aeruginosa* resistente a moitos fármacos³.

Esta bacteria multi-resistente é capaz de formar biofilms, polo que crece de maneira embebida nunha matriz de polisacáridos e se adhire a unha superficie inerte ou tecido vivo, o que aporta unha maior resistencia ás substancias químicas agresivas, aos antibióticos e aos compoñentes do sistema inmunitario cando están provocando a infección. Tamén conta coa habilidade de desenvolver de maneira rápida a resistencia a fármacos antimicrobianos mediante a adquisición de xenes de resistencia en elementos xenéticos móbiles.

De entre as distintas bacterias patóxenas, a *P. aeruginosa* é considerada a quinta causa máis frecuente de infeccións a nivel mundial e, a segunda de neumonía. Ademais, destaca por estar relacionada cun 10-15% das infeccións que se adquiren nos hospitais do mundo, debido ás capacidades para persistir en condicións ambientais adversas, así como aos mecanismos de patoxenicidade que posúe⁴. A patoxenicidade das bacterias ten lugar pola produción e excreción ao medio extracelular de factores de virulencia, onde se atopan diversas enzimas coma as elastasas, que é un tipo de proteasa.

As proteasas son enzimas pertencentes ao grupo de enzimas hidrolasas cuxa función fundamental é romper os enlaces que unen os aminoácidos, xerando fragmentos máis cortos de proteínas. Para que estas enzimas leven a cabo a súa función no organismo, necesitan a presenza de unhas “moléculas auxiliares”, chamadas cofactores, que axudan nas transformacións bioquímicas.

O tratamento das enfermidades infectadas coa *P. aeruginosa* supón unha complexidade clínica debido á alta resistencia aos antibióticos que esta presenta. Ademais esta bacteria secreta unha enzima denominada elastasa B que presenta a capacidade de cortar secuencias peptídicas específicas, dando lugar así a un gran interese á hora de desenvolver sensores para a detección e monitorización da enzima, permitindo así realizar a detección da *P. aeruginosa* presente.

1.2. Elastasa B de *P. aeruginosa*

A elastasa B (LasB), tamén coñecida como pseudolisina, é a metaloenzima funcional máis abundante secretada ao exterior pola *P.aeruginosa*.

Na fase aguda das infeccións dadas pola bacteria, LasB degrada os constituíntes proteicos da matriz extracelular das células do hóspede, inducindo lesións tisulares e hemorráxicas. Ademais, LasB mostra accións relevantes durante as infeccións crónicas a través da súa capacidade para manipular as respostas hóspede mediante a degradación de varios compoñentes das defensas inmunitarias. LasB exerce a súa actividade cortando secuencias peptídicas coma por exemplo, -GLA- (-glicina-leucina-alanina-) entre os residuos de glicina e leucina, aínda que se demostrou que tamén escinde a secuencia -AAAA-.

Thayer et al. resolveu a estrutura tridimensional da LasB en 1991, e describiu o sitio activo como o tramo de dúas hélices que proporcionan ligandos para o zinc, así como o bucle que os conecta. Os tres ligandos que unen o metal son His140, His144 e Glu164, facendo así que o zinc soa adoptar unha conformación tetraédrica a través dunha interacción adicional cunha molécula de auga ou de ligando⁵.

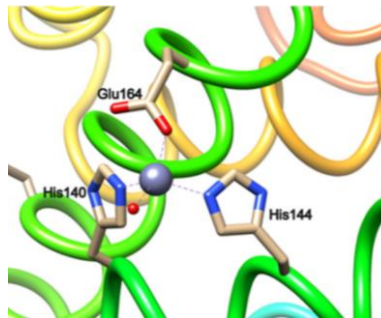


Figura 1. Descrición estrutural do sitio activo da LasB⁵.

Esta ao ser unha metaloproteasa involucra un metal no seu mecanismo catalítico, neste caso o zinc, coma na maioría de enzimas proteasas. O ión metálico coordínase coa proteína a través de 3 ligandos que poden ser histidina, glutamato, aspartato, lisina ou arginina.

Ademais esta enzima require de ións calcio, que actúan como cofactores, para manter a súa estabilidade e para poder levar así a cabo as súas funcións no organismo, coma pode ser a de dirixir eventos fisiopatolóxicos durante o hospedaxe da bacteria no corpo humano⁶.

Tendo en conta o modo de acción de LasB, o grupo de investigación do Dr. Fernández Trillo, desenvolveu nanopartículas de complexos poli-iónicos que se degradan en presenza de LasB, e non de outras elastasas endóxeas, liberando polímeros antimicrobianos. Esa liberación do polímero prodúcese cando a enzima corta o péptido coa secuencia Ac-C-E-GLA-E-C-OH.

A selección de LasB como diana para a detección da *P.aeruginosa* ofrece tres vantaxes, a redución na presión selectiva, a conservación de bacterias comensais e, a súa localización extracelular que non require penetración da parede celular⁷. A redución na presión selectiva consiste na supervivencia das bacterias dunha cepa, que transmitiran a súa resistencia á súa descendencia, conducindo así desta maneira á aparición de cepas resistentes. Por outra banda,

como a súa localización é extracelular e non se teñen que atravesar barreiras, a proteína se verá favorecida e atraída a nivel farmacolóxico.

No obstante, aínda que se utilizou como diana para inducir a liberación controlada de substancias antimicrobianas, apenas se utilizou como diana para desenvolver sensores luminescentes baseados en péptidos que permitan monitorizar a súa actividade e polo tanto detectar a presenza da *P.aeruginosa*.

2. Proteínas e péptidos

2.1. Enlace peptídico e estrutura de proteínas

Os péptidos son cadeas lineais de aminoácidos enlazados por enlaces químicos de tipo amídico aos que se lles denomina enlace peptídico. Este é un enlace covalente e se establece entre o grupo carboxilo (-COOH) dun aminoácido e o grupo amino (-NH₂) do aminoácido contiguo inmediato, coa posterior eliminación dunha molécula de auga. O carácter parcial de dobre enlace do enlace peptídico (-C-N-) determina a disposición espacial deste nun mesmo plano, con distancias e ángulos fixos. Como consecuencia disto, o enlace peptídico presenta certa rixidez e inmoviliza no plano aos átomos que o forman.

Por convenio, as estruturas dos péptidos escríbense de modo que o grupo amino está á esquerda e o grupo carboxilo á dereita, onde os extremos esquerdo e dereito do péptido denomínanse *N*-terminal (o amino terminal) e *C*-terminal (o carboxilo terminal), respectivamente. O orde correcto do enlace nun péptido defínese con facilidade empregando as abreviaturas de aminoácidos coas súas tres letras correspondentes ou coa abreviatura dunha soa letra (Figura 2).

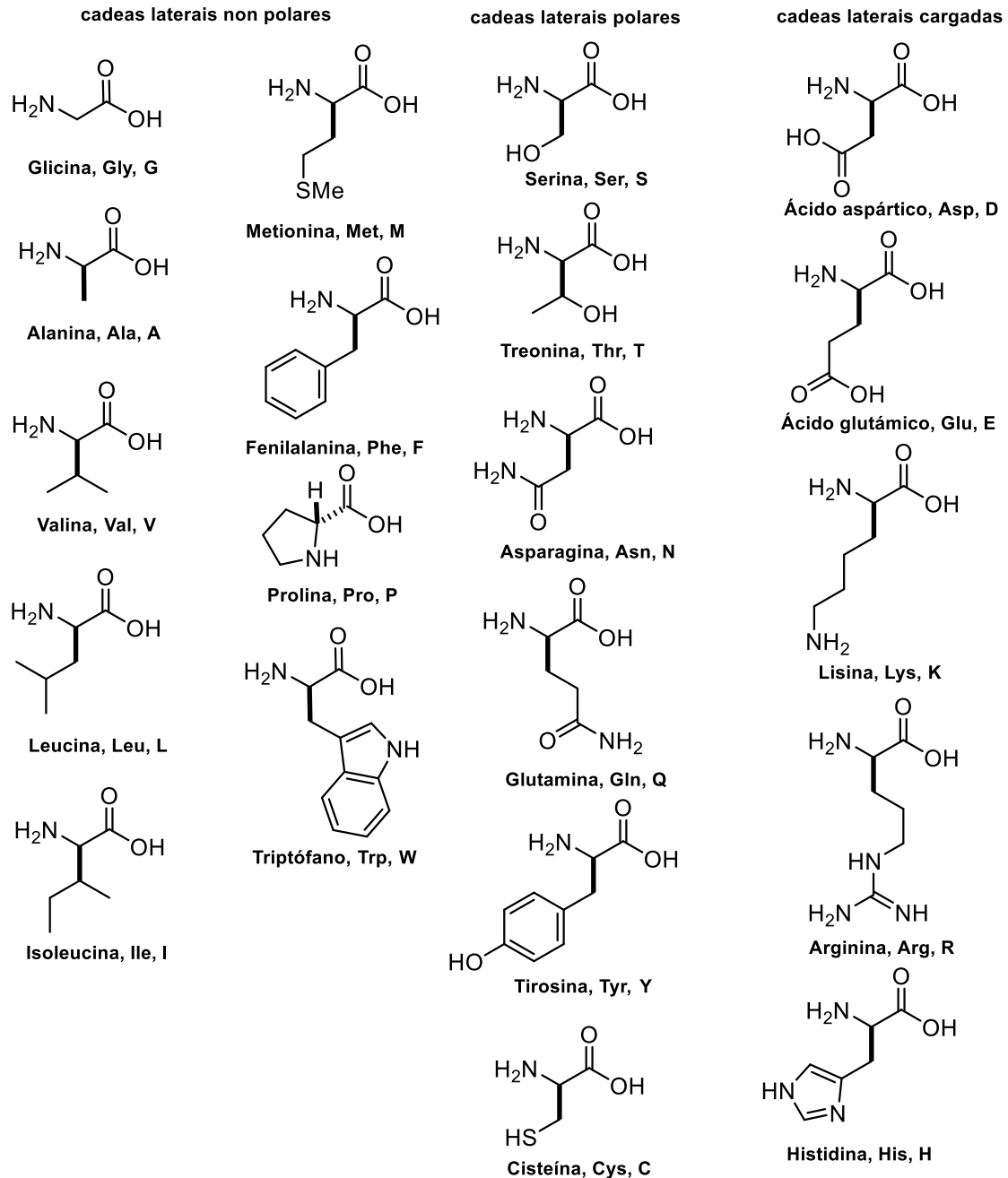
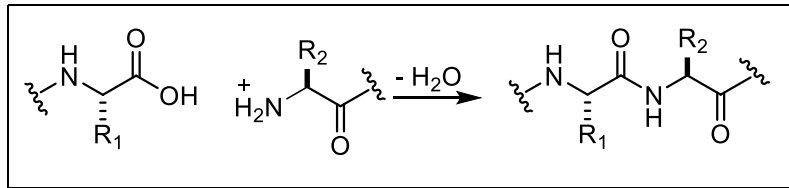


Figura 2. Formación dun enlace peptídico por condensación dun ácido e unha amina. Estrutura e códigos de unha ou tres letras para os aminoácidos máis comúns.

Estes aminoácidos diferéncianse entre si porque presentan diferentes cadeas laterais, que permiten a súa clasificación en aminoácidos non polares (G, A, V, L, I, M, F, P, W), polares (S, T, N, Q, Y, C), ácidos (D, E) e básicos (K, R, H).

As proteínas non se atopan formando unha longa cadea lineal polipeptídica, senón que se pregan para formar unha única estrutura dimensional que

determina moitas das súas funcións biolóxicas. O conxunto de elementos estruturais como son a hélice α , xiros ou láminas β , son o que se coñecen como a estrutura secundaria da proteína. Unha vez adoptada esta estrutura secundaria pregada sobre si mesma, que da lugar a unha distribución espacial concreta, se obtén a denominada estrutura terciaria da proteína. E por outra banda tamén esta a estrutura cuaternaria, que reflexa a forma na que se agrupan mutuamente as subunidades conectadas covalentemente que forman a proteína.

Polo que, non só hai que coñecer a estrutura primaria dunha proteína, senón que tamén hai que considerar a súa estrutura secundaria, a terciaria e incluso, si a proteína está formada por varias subunidades, a súa estrutura cuaternaria⁸.

2.2. Síntese de péptidos en fase sólida

Hai dous métodos principais para a síntese de péptidos, que poden ser en disolución ou en fase sólida. Aínda que estes difiren en canto á fase na que se fai a síntese, en ambos, a estratexia xeral é a mesma. Polo que o obxectivo na síntese de péptidos consiste en unir aminoácidos nunha secuencia definida pola formación de enlaces amida entre eles. Á hora de elixir un método ou outro hai que ter en conta o produto que queremos obter, algunhas das vantaxes e desvantaxes destes métodos son:

- En disolución

En disolución vanse poder utilizar todo tipo de reaccións orgánicas, as condicións de reacción coñecidas non necesitan adaptación, poden producirse cantidades a escala sintética moito maior que na fase sólida e, a diferenza de en fase sólida non se precisan pasos de reacción adicionais para anclar e desanclar o soporte sólido. Pero a súa maior desvantaxe, é que o emprego de reactivos en exceso require un esforzo adicional na purificación, e ese proceso é difícil de automatizar.

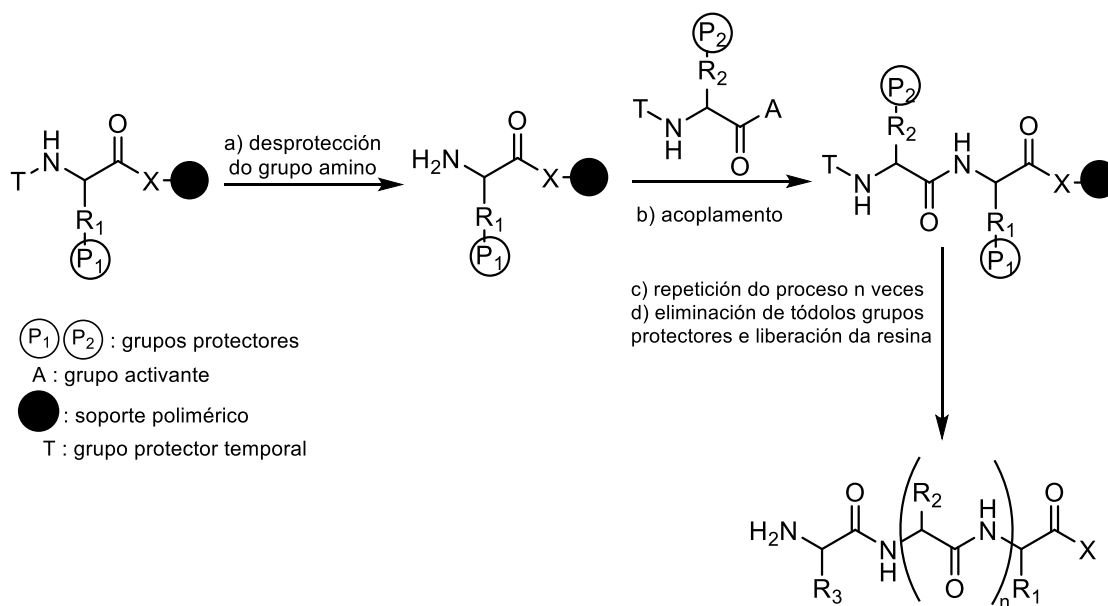
- Fase sólida

En fase sólida os reactivos a utilizar vanse poder usar en exceso debido a que non hai problemas de separación posterior, e isto vai facer que as reaccións podan completarse. A purificación do produto realízase por lavado do soporte e realízanse secuencias de reacción sinxelas de automatizar. Pero a súa maior desvantaxe, é que require pasos de reacción adicionais para anclar e desanclar o péptido do soporte e poder así realizar un seguimento de que a síntese estase a realizar de maneira correcta.

A síntese de péptidos en fase sólida (SPPS) foi desenvolvida por Merrifield en 1962. Esta técnica basease no uso dunha resina de poliestireno que se emprega en forma de pequenas partículas insolubles en case tódolos solventes, sobre as que se constrúen as cadeas peptídicas. O péptido permanece anclado covalentemente á partícula quedando así o péptido inmobilizado na fase sólida e durante o proceso de filtrado, mentres que os reactivos da fase sólida e os subprodutos da síntese son eliminados, ao desanclarse con reactivos coma o TFA.

A SPPS sigue un conxunto de ciclos repetitivos de acoplamento-lavado-desprotección-lavado. Un aminoácido *N* protexido se acopla á resina co extremo amino libre, a continuación, o aminoácido unido ao soporte é desprotecido, mostrando así un novo extremo amino ao cal se pode unir outro aminoácido. A vantaxe desta técnica ven dada a que ao lle realizar os ciclos de lavado despois

de cada reacción, nos que se elimina o exceso do reactivo, o péptido de interese permanece unido covalentemente á resina insoluble.



Esquema 1. Representación dos pasos da SPPS.

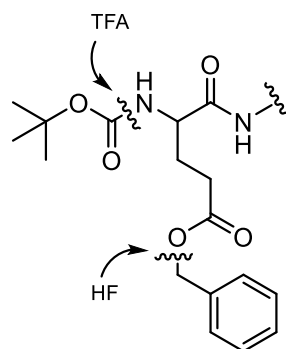
Os aminoácidos constan de grupos protectores nas súas cadeas laterais para que así estas non reaccionen, un detalle a ter en conta é que estes grupos protectores deben ter unha protección máis permanente, evitando así que se produzan reaccións secundarias non desexadas, como pode ser o autoacoplamento do aminoácido activado que conduce á polimerización.

Para que un grupo protector sexa adecuado debe ter as seguintes características:

- Ser selectivo para un determinado grupo funcional
- Ten que incorporarse e despois eliminarse con bo rendemento
- Non debe xerar novos estereocentros, si os houbera
- Debe ser economicamente viable

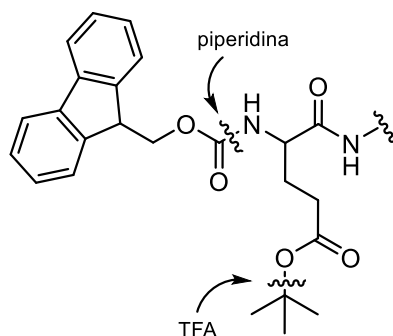
Á hora de elixir os grupos protectores hai que ter en conta diversos factores antes nomeados como pode ser presentar alta estabilidade en medios de reacción determinados ou fáciles de eliminar e seguros. Na síntese de péptidos en fase sólida pódense utilizar dous esquemas principais de grupos protectores, o Boc/bencilo e o Fmoc/*tert*-butilo.

A estratexia Boc/Bzl consiste na utilización do grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) para a protección temporal dun grupo α -amino e os grupos do tipo bencil (Bzl) para protexer as cadeas laterais. O grupo Boc se desprotexe en medio ácido por tratamento con TFA mentres que para a eliminación do grupo Bzl, que se fai simultaneamente coa ruptura do péptido da resina, fan falta ácidos fortes como pode ser HF. Isto forma un grupo amino con carga positiva en presenza dun exceso de TFA que se neutraliza e se acopla ao aminoácido entrante activado. Pódese preferir esta estratexia á do Fmoc/*tert*-butilo cando se sintetizan péptidos que conteñen fraccións sensibles a bases⁹.



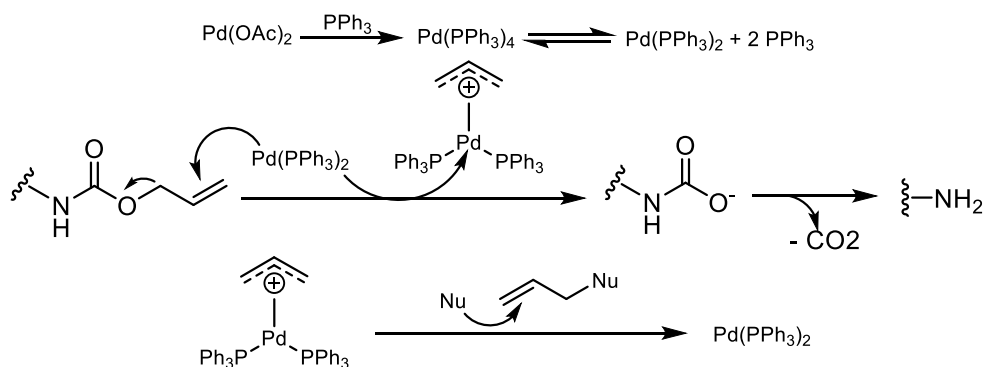
Esquema 2. Forma de rotura para a estratexia Boc/Bzl cos seus respectivos reactivos.

A outra estratexia é a Fmoc/*tert*-butilo, consiste na utilización do grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) como grupo protector do *N*-terminal e os grupos *tert*-butilo para as cadeas laterais de aminoácidos trifuncionais. O grupo Fmoc se desprotexa en condicións de medio básico suaves con piperidina en DMF. Polo tanto, a amina exposta é neutra e daquela non se require a neutralización do péptido-resina coma na outra estratexia. Neste caso a protección ao *N*-terminal é lábil en base e o enlace á resina é lábil en ácido polo que o tratamento final é con TFA. A vantaxe deste esquema de protección é a ortogonalidade en condicións de SPPS, xa que permite a desprotección dos grupos en condicións químicas opostas¹⁰.



Esquema 3. Forma de rotura para a estratexia Fmoc/*tert*-butilo cos seus respectivos reactivos.

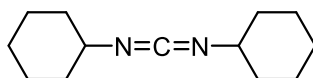
Outro grupo protector tamén a mencionar é o Alloc (aliloxicarbonilo), este úsase para protexer un grupo amino cando se require un esquema de desprotección ortogonal. A razón pola que este grupo protector sexa ortogonal é debido a que este non se desprotexa con TFA, senón que necesita unha catálise de Pd levada a cabo xunto coa presenza dun nucleófilo adecuado.



Esquema 4. Mecanismo de desprotección do grupo alloc.

A etapa clave da síntese de péptidos é a formación dos enlaces amida entre os aminoácidos, que requiren dunha activación previa do grupo carboxilo. Existen catro formas diferentes de levar a cabo a activación do ácido:

- a) **Carbodiimidas:** Constitúen uns dos axentes activantes máis extendidos, cuxa principal limitación é a posibilidade de producir deshidratación dos residuos Asn e Gln. Un destes axentes é a *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC).



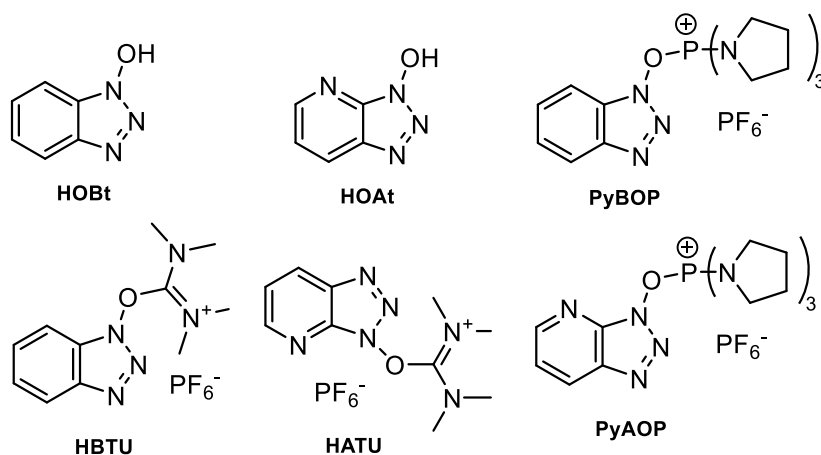
Esquema 5. Molécula de DCC.

- b) **Anhídridos de ácidos:** Utilízanse fundamentalmente na metodoloxía Boc/Bzl e se xeneran *in situ* utilizando dous equivalentes do aminoácido protexido e un equivalente de DCC. Trátase dun método pouco eficiente xa que se teñen que utilizar dous equivalentes do aminoácido protexido para formar a especie activada, da cal haberá que engadir exceso.
- c) **Esteres activos:** Utilización de aminoácidos modificados en forma de ésteres altamente reactivos. Por exemplo o do HOBt:



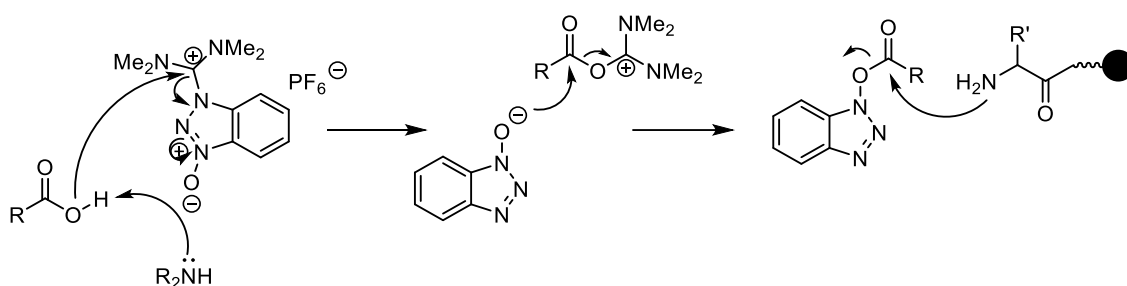
Esquema 6. Preparación dun éster activo de HOBt dun aminoácido.

- d) **Formación *in situ* de ésteres activos:** Consiste na activación do ácido *in situ* e é o método máis utilizado. Trátase dunha metodoloxía moi fácil de usar que permite levar a cabo reaccións limpas e rápidas, incluso entre aminoácidos con empedimentos estéricos.



Esquema 7. Axentes activantes comúns utilizados na SPPS.

O mecanismo da reacción de activación exemplifícase no seguinte esquema para o caso do HBTU:



Esquema 8. Activación dun ácido, formación *in situ* do éster activo e acoplamento.

3. Sensores luminescentes

3.1. Luminescencia

Segundo a IUPAC, a luminescencia é a emisión espontánea de radiación dunha especie excitada electrónicamente ou vibratoriamente que non está en equilibrio térmico co seu entorno. A rasgos xenéricos, a emisión de luz débese ao movemento de electróns entre diferentes niveis de enerxía dentro dun átomo despois da excitación por factores externos. Hai varias formas de facer que un obxecto emita luz, como por medio de luz (fotoluminescencia), reaccións químicas (quimioluminescencia), enerxía eléctrica (electroluminescencia), vibracións de ultrasons (sonoluminescencia) e radiación ionizante (radioluminescencia). A continuación, vaise falar máis en detalle da fotoluminescencia onde a excitación se produce polo resultado da absorción de fotóns, e que se divide en fluorescencia e fosforescencia.

A fosforescencia e a fluorescencia son procesos radioactivos, que emiten radiación, cuxas transicións son verticais e seguen as Regras de Selección. A diferenza entre estes dous procesos é que a fluorescencia ocorre entre dous estados electrónicos coa mesma multiplicidade, e a fosforescencia é a desactivación entre dous estados electrónicos dun estado excitado e un fundamental con diferentes multiplicidades (Figura 3).

Denomínaselle fluorescencia ao proceso de emisión dun fotón dende un estado excitado dunha molécula ao estado fundamental, onde a maioría de veces o seu espectro de emisión se produce entre os niveis $S_1 \rightarrow S_0$. Prodúcese unha relaxación na molécula e unha conversión interna, onde posteriormente se comezara a emitir fluorescencia de maneira espontánea e o sistema volverá ao seu estado fundamental. O estado excitado pode evolucionar a través dunha multitude de procesos que van influír nos parámetros de fluorescencia, representados nun Diagrama de Jablonski (Figura 3).

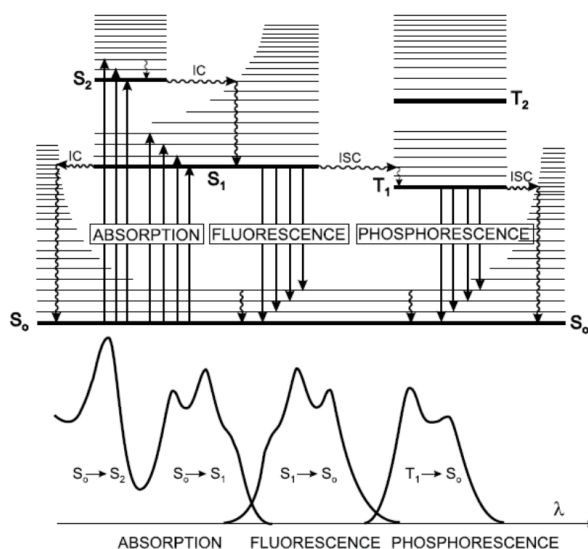


Figura 3 . Diagrama de Jablonski onde se mostran os principais procesos que ocorren cando unha molécula absorbe un fotón e salta a un estado excitado. A molécula tamén pode volver ao seu estado fundamental a través dun proceso non radioactivo. ISC: cruce de entre sistemas (intercambio dun estado excitado singlete a un triplete); IC: conversión interna¹¹.

Por outra banda, a fosforescencia consiste nun cambio de multiplicitade de spin, habitualmente de triplete a singlete. O estado triplete (T₁) pode desactivarse radiativamente ao estado fundamental (S₀) mediante a transición de spin prohibida T₁ → S₀, dando lugar a este proceso¹². A característica que presenta un material fosforescente é ao ser unha transición prohibida polas Regras de Selección vai presentar un tempo de vida máis longo (Figura 3). O tempo de vida medio é o tempo que tarda en regresar á configuración de mínima enerxía do estado fundamental pasado un intervalo de tempo a un estado excitado.

3.2. Sistemas luminescentes de lantánidos

Os lantánidos son un grupo de elementos situados no período 6 da táboa periódica, estes son os denominados “terras raras” debido a que se atopan en forma de óxidos, que xunto cos actínidos dan lugar aos elementos de transición interna, que presentan a capa (n-2)f parcialmente ocupada.

Son elementos quimicamente bastante parecidos entre si xa que os electróns situados nos orbitais f son pouco importantes nos enlaces que se forman, en comparación cos p e d, aínda así os orbitais f son os responsables das propiedades luminescentes. Ademais todos actúan como catións trivalentes (M⁺³) en sales, por esta razón, teñen unha química moi similar ao grupo 3 (Y e Sc) e a maiores presentan un radio moi similar a estes.

As propiedades de emisión dos lantánidos si están influenciadas polo entorno do ión e dependen da facilidade coa que cada estado excitado pode ser poboado e dos correspondentes camiños seguidos para a desactivación non radioactiva. Canto menor sexa a diferenza enerxética entre o nivel excitado de menor enerxía do ión metálico e o do estado fundamental, máis fácil resultará a desactivación por procesos non radioactivos.

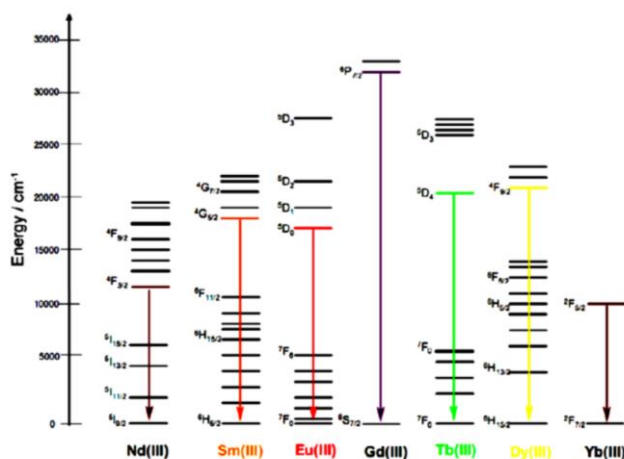


Figura 4. Diagrama dos niveis de enerxía dos lantánidos en medio acuoso¹³.

A maioría dos lantánidos teñen propiedades luminescentes únicas, que se exploraron no desenvolvemento de diversos dispositivos supramoleculares luminescentes. Os ións Eu(III), Gd(III) e Tb(III) mostran as maiores diferenzas enerxéticas entre o nivel excitado de menor enerxía do ión metálico e o estado fundamental, cuns valores de ΔE de 12300, 32200 e 14800 cm^{-1} , respectivamente (Figura 4). Sen embargo, a enerxía do nivel excitado de menor enerxía do Gd(III) é demasiado alta e desta maneira, ao resultar difícil de poboar non presenta luminescencia. Por esa razón, para o desenvolvemento de sensores luminescentes se empregan ións como Eu(III) e Tb(III), que emiten no rango visible, e ademais teñen unha diferenza enerxética apropiada e uns tempos de vida media do estado excitado longos¹⁴.

	Transición	λ Emisión (nm)	Intensidad Relativa
Europio	$^5D_1 \rightarrow ^7F_0$	526	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_1$	537	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_2$	558-560	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	intensa
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	610-630	muy intensa
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	645-660	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-705	media
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	710	Débil
Terbio	$^5D_4 \rightarrow ^7F_6$	485-500	Media
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_5$	540-555	muy intensa
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_4$	580-595	media
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_3$	615-625	media-débil
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_2$	645-655	débil

Figura 5. Lonxitudes de onda das transicións luminescentes dos ións de Eu e Tb¹⁴.

En comparación con outros ións lantánidos a luminescencia do Eu(III) e do Tb(III) non se apaga facilmente por procesos non radioactivos coma a vibración de

ligandos de enlace, polo que serán máis eficientes. Esta característica explica a razón pola que foron elixidos para a maior parte das emisións visibles baseadas en lantánidos.

As principais vantaxes de utilizar estes ións no desenvolvemento de sondas e dispositivos luminescentes atribúese aos seus estados excitados de larga vida, do orde de milisegundos, e as súas bandas de emisión lineais que se producen a lonxitudes de onda largas¹⁵, ademais dunhas bandas de absorción moi estreitas. O feito de que as bandas de absorción sexan estreitas permite medir facilmente sen interferencias na sinal, facendo así que os lantánidos sexan moi interesantes para desenvolver biosensores.

Cabe a destacar que os lantánidos trivalentes emiten fluorescencia por transicións que implican orbitais 4f, que son prohibidas polas regras de selección de Laporte, e polo tanto presentan un coeficiente de absorción moi baixo (menor de $10 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A baixa absorción fai que estes non se podan excitar directamente por métodos normais, e incluso aqueles que presentan un bo rendemento cuántico rara vez producen materiais altamente luminescentes. Para solucionar este problema recórrase a un método de excitación indirecta que é o chamado, como efecto antena, onde un ligando orgánico se coordina ao ión lantánido e induce a súa emisión luminescente.

A sensibilización ou efecto antena produce a emisión de fluorescencia por parte do catión lantánido mediante un proceso que consta de 3 etapas (Figura 6):

1. A luz é absorbida no entorno do Ln(III) por un cromóforo orgánico
2. A excitación vaise transferir a un ou varios estados excitados do ión metálico
3. Prodúcese a emisión de luminescencia por parte do metal

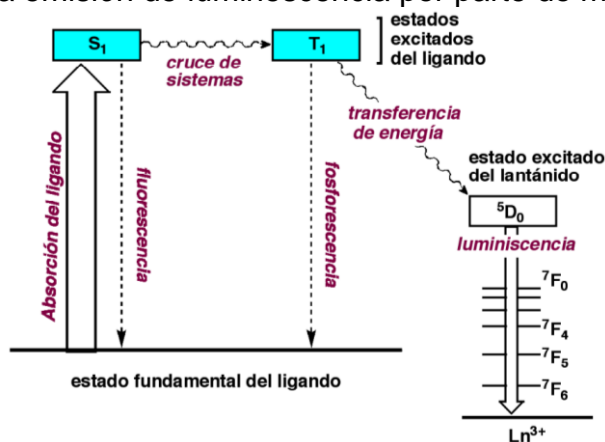


Figura 6. Representación da transferencia de enerxía durante a sensibilización dos ións lantánidos.

No proceso de sensibilización non é necesaria a unión directa entre o centro metálico e o sensibilizador, o único a ter en conta para que o proceso sexa eficiente é que ambas especies se atopen a menos de 20 \AA .

Deste modo, pódese dicir que, si un complexo lantánido presenta propiedades luminescentes é grazas á presenza do ligando cerca do ión lantánido¹⁶. A maiores, sábese que as propiedades de emisión destes dependen da facilidade

coa que pasen ao estado excitado e da minimización da desactivación non radioactiva.

Existen distintos exemplos precedentes de sensores de enzimas baseados en complexos peptídicos de lantánidos, estes se poden atopar na bibliografía descrita (17,18,15) e se describen os seguintes debido á relación co sensor que se desenvolve neste traballo.

O elemento común destes sensores baséase en secuencias peptídicas que conteñen un complexo macrocíclico dun ión lantánido co obxectivo de monitorizar enzimas, cambiando a sinal do complexo tras a acción do enzima, o que permite monitorizar a actividade enzimática.

No ano 2012, E. Pazos *et al.* describen o deseño dun sensor que contén a secuencia de recoñecemento da proteína quinasa C (PKC) e un ligando derivado de DO3A. Este ligando macrocíclico estudado na súa forma non fosforilada non satisface tódalas posicións de coordinación dispoñibles do ión lantánido, permitindo así desta maneira a coordinación cunha antena externa, dando lugar a un complexo luminescente. En cambio, a fosforilación do residuo da serina supón un desprazamento intramolecular da antena polo grupo fosfato engadido na cadea lateral pSer e o desprazamento da antena externa diminuindo así a luminescencia do sensor. No obstante, cando se trata a secuencia fosforilada da sonda coa fosfatasa alcalina, elimínase o grupo fosfato e se recupera a luminescencia por parte do sensor¹⁷ (Figura 7).

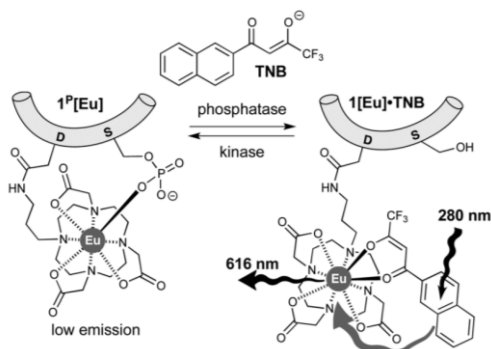


Figura 7. Equilibrio da sonda luminescente cunha antena externa para a monitorización da actividade enzimática de PKC e a fosfatasa alcalina¹⁷.

Outro exemplo máis recente publicado no 2017 por González-Vera *et al.*, describe un sensor que permite monitorizar a actividade do complexo CDK4/ciclina D en extractos celulares de melanoma. Neste caso o sensor contén a secuencia específica do sustrato da quinasa CDK4 e un dominio de unión de fosfoaminoácidos (PAABD). Desta maneira, ao producirse a fosforilación do sensor en presenza do CDK4, o complexo peptídico fosforilado é recoñecido por PAABD, o que dará lugar a un cambio de conformación que aproxima a antena, neste caso un triptófano, ao complexo de Tb(III) aumentando así a emisión de luminescencia¹⁸ (Figura 8).

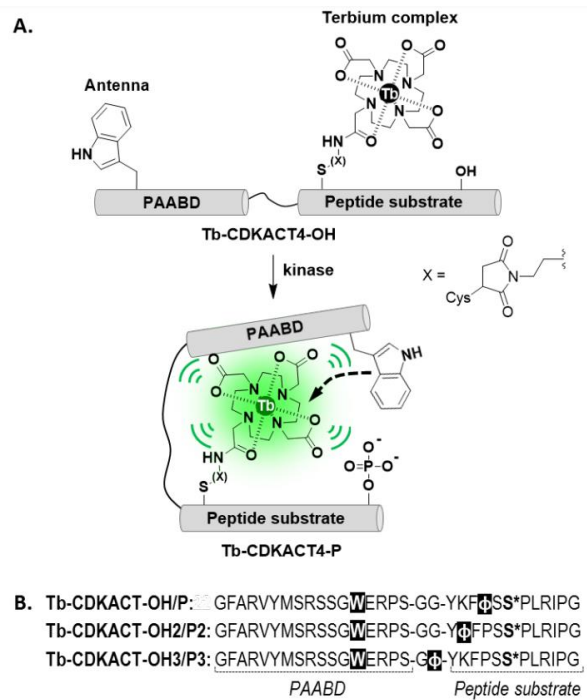


Figura 8. Representación da sonda luminescente que permite monitorizar a actividade de CDK4¹⁸.

Os exemplos comentados con anterioridade, empregan antenas que son excitadas en UV, isto limita a súa utilidade en cultivos celulares. Desta maneira, o uso de cromóforos orgánicos que se podan excitar a lonxitudes de onda de 345 nm son de gran interés.

Aínda que os sensores descritos son moi interesantes porque permiten monitorizar a actividade das enzimas *in vitro*, requiren a excitación da antena a 280 nm o que limita a súa aplicación na detección mediante microscopía de fluorescencia en células. No ano 2012, Bonnet *et al.* describen as propiedades luminescentes dun péptido de unión a lantánidos, incorporando no extremo *N*-terminal a 1,8-naftalimida (Naph) que actúa como antena para sensibilizar os estados excitados tanto do Eu(III) como do Tb(III). Esta antena resulta especialmente atractiva xa que se pode excitar a menor enerxía que o Trp (345 nm) e, mediante sinxelas modificacións sintéticas se poden axustar as súas propiedades fotofísicas. Sintetizáronse 2 péptidos con diferentes antenas situadas en diferentes posicións e se observou que os espectros de excitación eran estruturalmente similares, confirmando así o éxito da transferencia de enerxía desde estas antenas ao estados excitados do Eu(III) e Tb(III) (Figura 9). Ambos son capaces de sensibilizar o estado excitado do Tb(III) aínda que o P1 presenta unha intensidade relativa menor a 544 nm, isto pode vir debido a que a antena Naph está situada no extremo *N*-terminal ou, outra razón poder ser debida a unha diferenza no mecanismo de transferencia de enerxía ao estado excitado do Tb(III)¹⁵ (Figura 9).

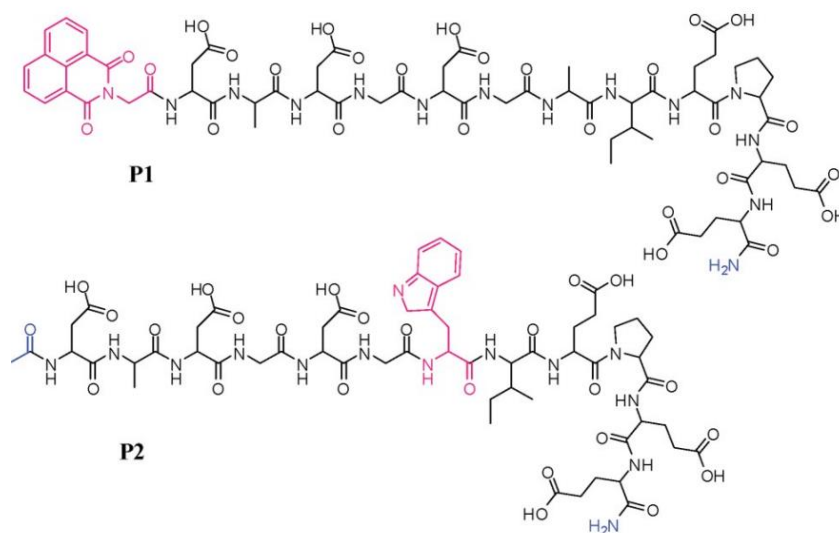
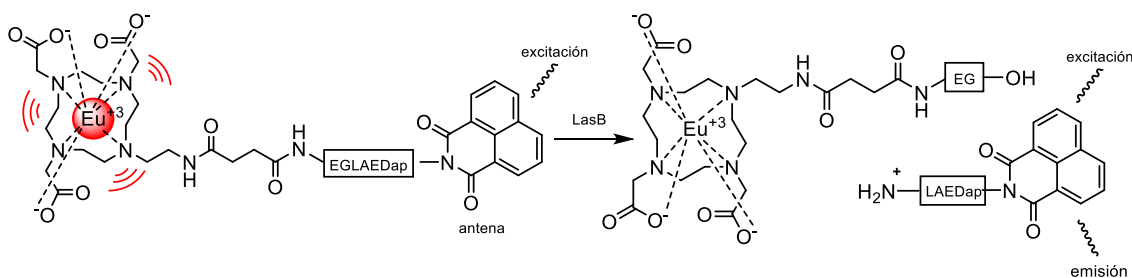


Figura 9. Os dois dodecapéptidos P1 e P2 desenvolvidos e comparados no estudo pela presença de diferentes antenas¹⁵.

OBXECTIVO

O obxectivo xeral deste traballo é desenvolver un sensor luminescente, baseado na luminescencia de ións lantánidos, para a detección e monitorización da enzima elastasa B da *P. aeruginosa*.



Esquema 9. Esquema de reacción para a detección da enzima.

Este levarase a cabo mediante a síntese dun complexo de europio que actuará como unidade luminescente e como antena do complexo metálico a molécula naftalimida (Naph). Esta antena sensibilizadora resulta especialmente atractiva debido a que se pode excitar a baixa enerxía (345 nm) e, mediante sinxelas modificacións sintéticas, pódense axustar facilmente as súas propiedades fotofísicas¹⁵.

Os obxectivos específicos do traballo son os seguintes:

1. Síntese dunha secuencia peptídica que conteña a secuencia de recoñecemento de LasB (-GLA-), e a naftalimida (Naph) que actuará como antena do complexo metálico e, un residuo que permita acoplar o complexo metálico.
2. Acoplamento do ligando macrocíclico ao péptido, purificación e caracterización do conxugado peptídico.

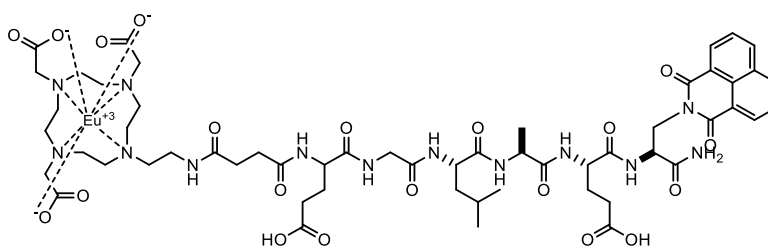


Figura 10. Estrutura proposta do sensor a sintetizar.

3. Estudo das propiedades fotofísicas do complexo peptídico de Eu(III) e da súa capacidade para monitorizar a actividade da enzima LasB.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

Deseño do sensor

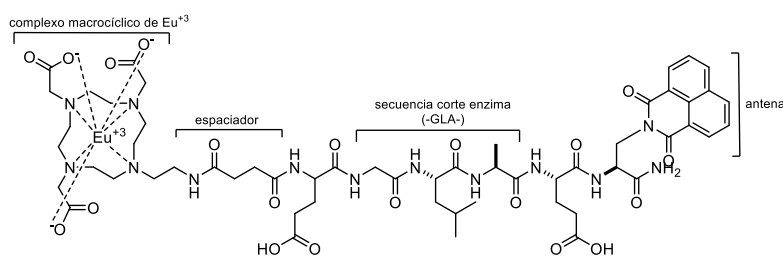
O obxectivo deste traballo é a síntese dun sensor luminescente baseado na luminescencia de ións lantánidos, usado para a detección e monitorización da bacteria *P. aeruginosa* a través da enzima elastasa B.

Para elo, o péptido escollido para a incorporación da sonda foi a secuencia EGLAEDap que inclúe a secuencia de corte da enzima LasB (-GLA-).

A maiores, requírese a presenza dun grupo quelatante de metais que neste caso o elixido é o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DO3A). Elíxese este macrociclo debido a que ofrece a posibilidade de ser modificado por diversos grupos para desenvolver estruturas múltiples, ademais presenta unha elevada constante de formación para os complexos que forma cos lantánidos. Para o anclaxe ao péptido, o complexo ofrece a posibilidade de reaccionar cun espaciador, neste caso o anhídrido succínico. Para o funcionamento do sensor é necesario a incorporación dunha antena sensibilizadora, neste caso a 1,8-naftalimida (Naph).

O mecanismo de detección neste caso basease na perda de luminescencia do sensor producida tras a degradación deste pola enzima en dous fragmentos no que a antena e o complexo metálico non están próximos como para que a transferencia de enerxía sexa eficiente. En cambio, este mecanismo non se levará a cabo cando o sensor estea en presenza dun sobrenadante da enzima modificada xenéticamente, e que polo tanto non romperá o sensor, mantendo así a luminescencia emitida por este.

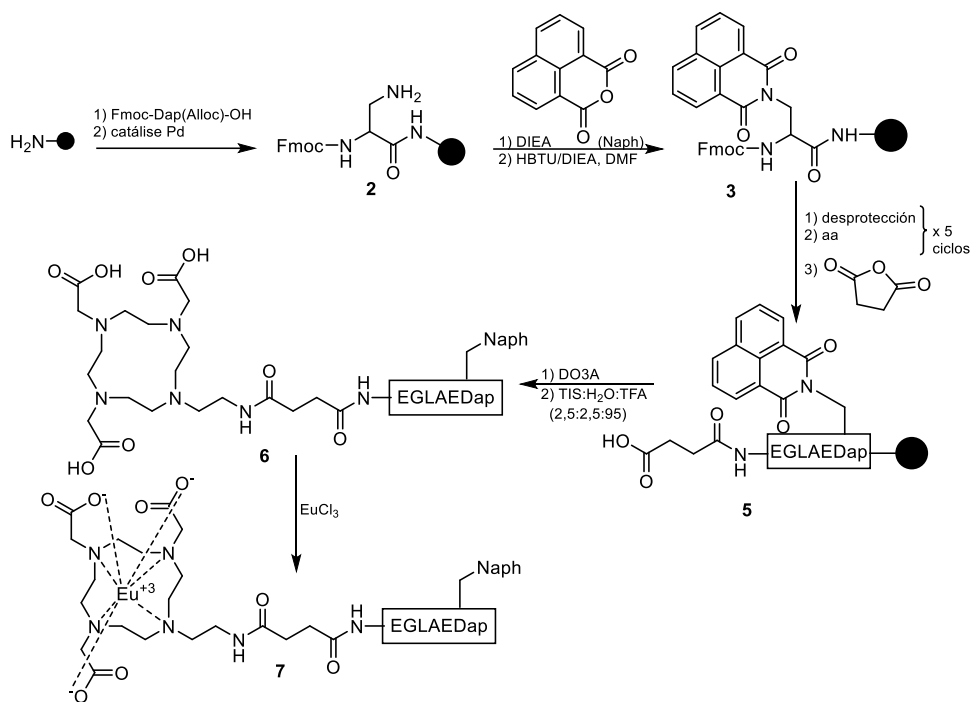
En presenza da enzima LasB o péptido será cortado especificamente entre o residuo G-L, isto supoñerá a separación da antena do complexo metálico, resultando nunha perda de intensidade da luminescencia co tempo, permitindo así monitorizar a actividade da enzima.



Esquema 10. Estrutura e esquema das diferentes partes do sensor.

Síntese do sensor

Para a síntese do composto **7** planteouse unha síntese en 5 etapas que consiste no acoplamento do aminoácido Dap e desprotección do grupo alloc, acoplamento da antena nafatalimida ao composto **2**, acoplamento dos aminoácidos EGLAE á resina coa antena ciclada e o acoplamento do espaciador (anhídrido succínico) dando lugar ao composto **5**, acoplamento do derivado de DO3A e escisión do péptido sintetizado (composto **6**) e, a coordinación do composto **6** co Eu(III) dando lugar ao composto **7**. Isto exemplifícase no seguinte esquema:



Esquema 11. Esquema sintético global do procedemento levado a cabo.

Síntese do composto 2: acoplamento do primeiro aminoácido e desprotección do grupo Alloc

O composto **2** foi sintetizado seguindo os protocolos habituais da síntese en fase sólida, empregando HBTU/HOBt como axente de acoplamento durante 2 min. A cadea lateral do Dap ten o seu grupo funcional protexido cun grupo alloc, que se elimina mediante catálise de Pd (18h en axitación). Previo á desprotección do grupo alloc, lévase a cabo o test TNBS para comprobar que non houbera grupos amina libre.

Síntese do composto 3: acoplamento da antena ao composto 2

O composto **3** foi sintetizado seguindo o procedemento descrito no Esquema 11. O acoplamento da antena ao composto **2** se leva a cabo en 2 etapas, unha primeira etapa de acoplamento da naftalimida ao grupo amina libre do composto **2** e, unha segunda etapa intramolecular con HBTU/DIEA que da lugar ao composto **3**. Unha vez sintetizado o composto **3**, se desancla unha pequena fracción da resina e o crudo de desprotección se analiza mediante HPLC en fase reversa, co obxectivo de comprobar si o acoplamento da 1,8-naftalimida ao composto **2** foi exitosa. O cromatograma presenta un pico maioritario a $t_R = 17.8$ min que foi identificado por ESI-MS como o produto desexado ($m/z : 506.178 [MH]^+$).

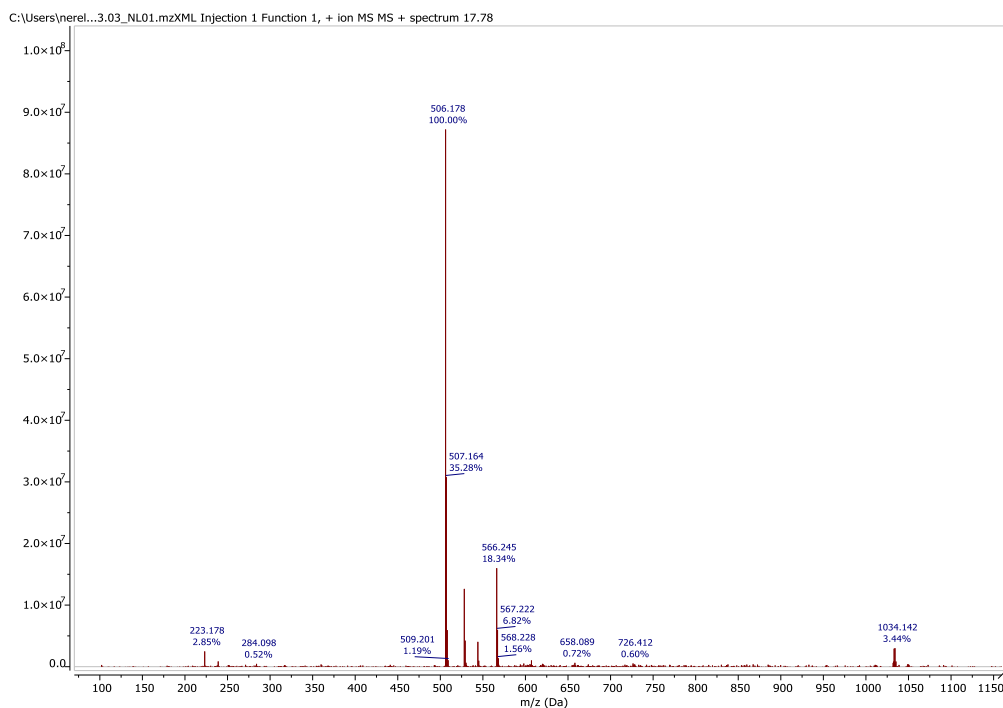
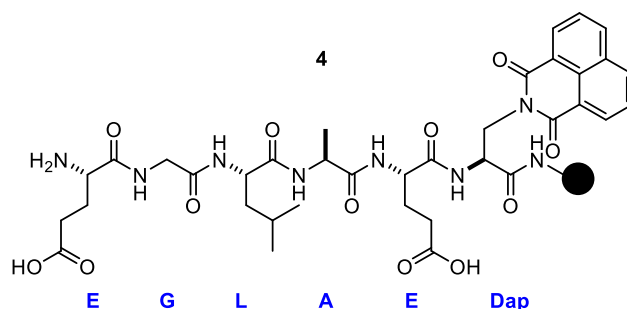


Figura 11. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 17.8$ min.

Síntese do composto 4 coa antena acoplada



Esquema 12. Esquema da estrutura da secuencia de aminoácidos a sintetizar para dar lugar ao composto 4.

Unha vez confirmado o acoplamento da antena, continuouse coa secuencia de aminoácidos a sintetizar, EGLAEDap, seguindo os protocolos habituais da síntese en fase sólida, empregando HBTU/HOBt como axente de acoplamento durante 2 min e 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 15 min para a desprotección do grupo Fmoc. Despois de cada acoplamento realízase o test TNBS para comprobar si o acoplamento foi óptimo, e se ten o grupo amino libre. Unha vez sintetizado o composto 4 se desancla unha pequena fracción da resina e o crudo de desprotección se analiza mediante HPLC en fase reversa, co obxectivo de comprobar que o acoplamento dos aminoácidos foi levado a cabo con éxito. Para o péptido lineal, o cromatograma de HPLC presenta un pico maioritario a $t_R = 16.5$ min que foi identificado por ESI-MS como o produto desexado (m/z : 1005.505 $[MH]^+$, 503.18 $[MH_2]^{+2}$). O segundo pico maioritario é o correspondente ao péptido co Naph sen ciclar cun $t_R = 14.4$ min que foi identificado por ESI-MS (m/z : 825.5 $[MH]^+$). Pero como este pico esta presente en moita menor cantidade que o pico buscado, procedese a continuar ca síntese do sensor.

No análise do cromatograma de HPLC en fase reversa a 220 nm obsérvanse os enlaces cunha absorbancia de 2250 mAu, o que indica a presenza dunha gran cantidade do composto desexado.

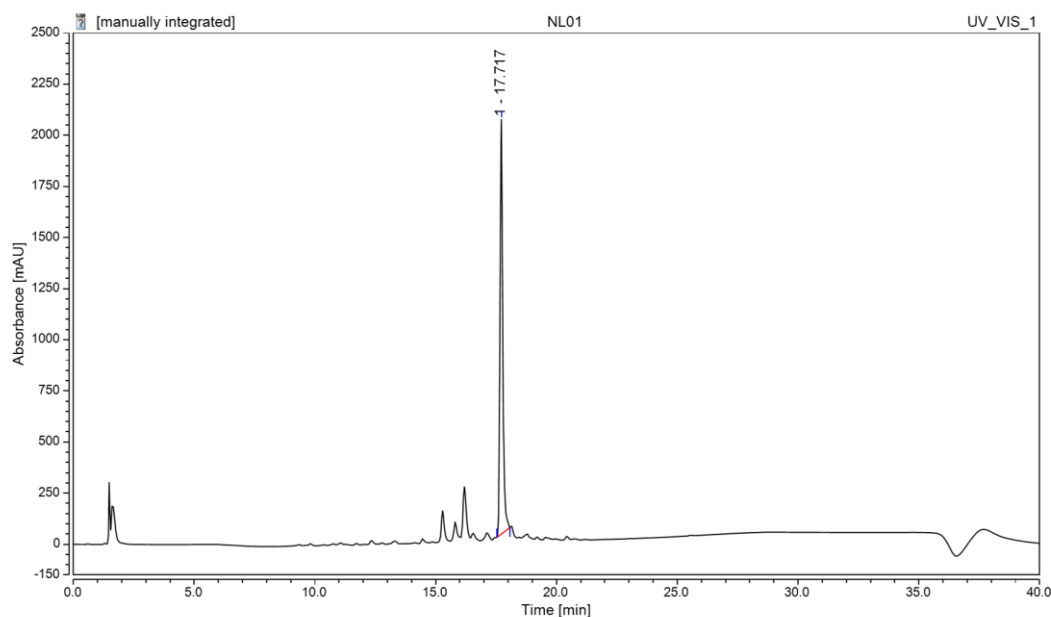


Figura 12. Cromatograma HPLC en fase reversa a 220 nm.

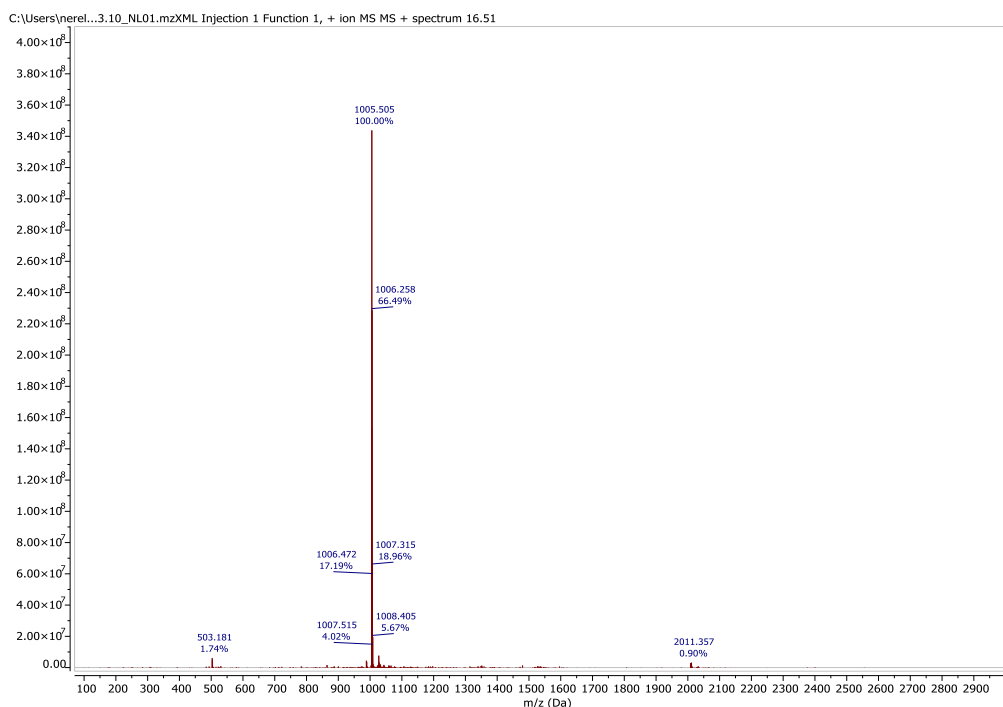
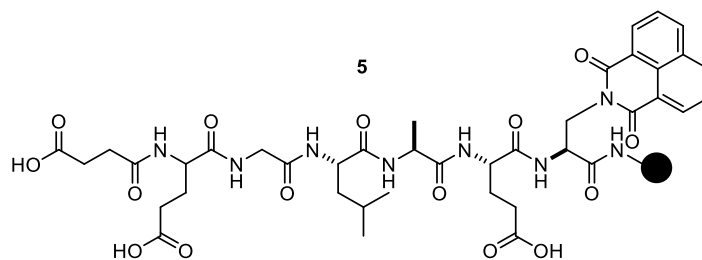


Figura 13. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 16.5$ min.

O composto **4** foi sintetizado mediante as etapas habituais levadas a cabo en síntese en fase sólida seguindo a estratexia Fmoc/*tert*-butilo. Tódolos acoplamentos foron levados a cabo con éxito e non houbo que volver reacoplar ningún aminoácido.

Síntese do composto 5: acoplamento do espaciador ao composto 4



Esquema 13. Esquema da estrutura da secuencia de aminoácidos acoplado ao espaciador que da lugar ao composto 5.

O composto **5** foi sintetizado seguindo o procedemento descrito no Esquema 11. O acoplamento do espaciador ao composto **4** lévase a cabo en 1 etapa, onde o grupo amino libre deste composto se acopla ao anhídrido succínico en $\text{Et}_3\text{N}/\text{DCM}$ (18h en axitación), dando lugar así ao composto **5**. Unha vez sintetizado o composto **5**, se desancla unha pequena fracción da resina e o crudo de desprotección se analiza mediante HPLC en fase reversa, co obxectivo de comprobar que o acoplamento do ácido succínico ao composto **4** foi levado a cabo con éxito. O cromatograma presenta un pico maioritario a $t_R = 12.7$ min que foi identificado por ESI-MS como o produto desexado (m/z : 883.352 $[\text{MH}]^+$, 442.177 $[\text{MH}_2]^{+2}$).

No análise do cromatograma de HPLC en fase reversa a 220 nm obsérvanse os enlaces peptídicos a $t_R = 13.9$ min cunha absorbancia de 600 mAu, o que indica a presenza dunha gran cantidade de composto desexado, o outro pico que presenta o cromatograma non se identificou a que pode corresponder ese subproduto.

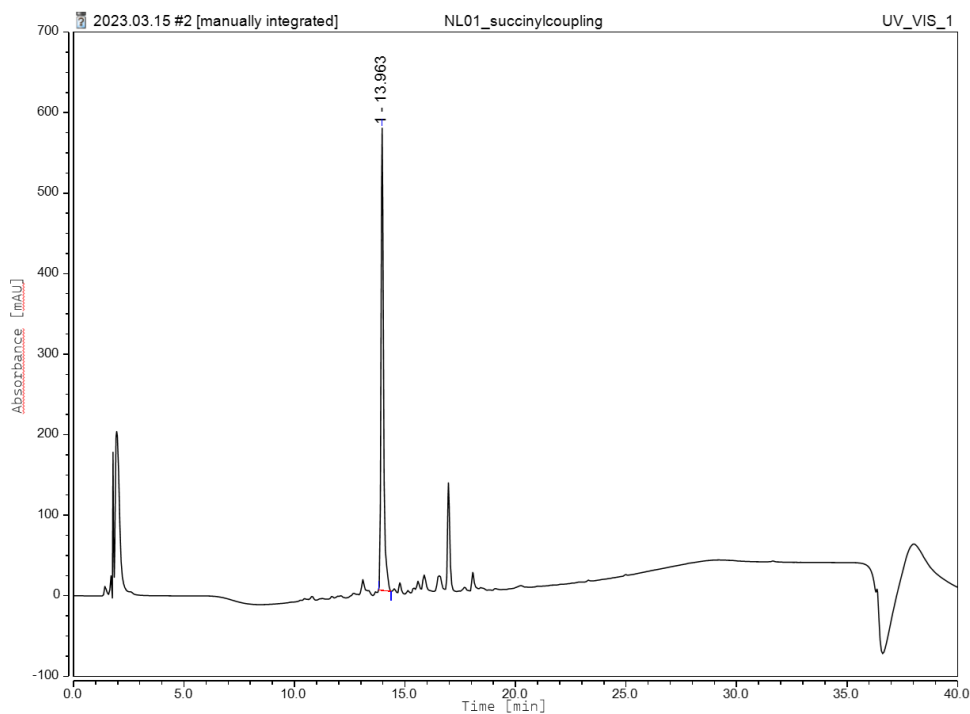


Figura 14. Cromatograma HPLC en fase reversa a 220 nm.

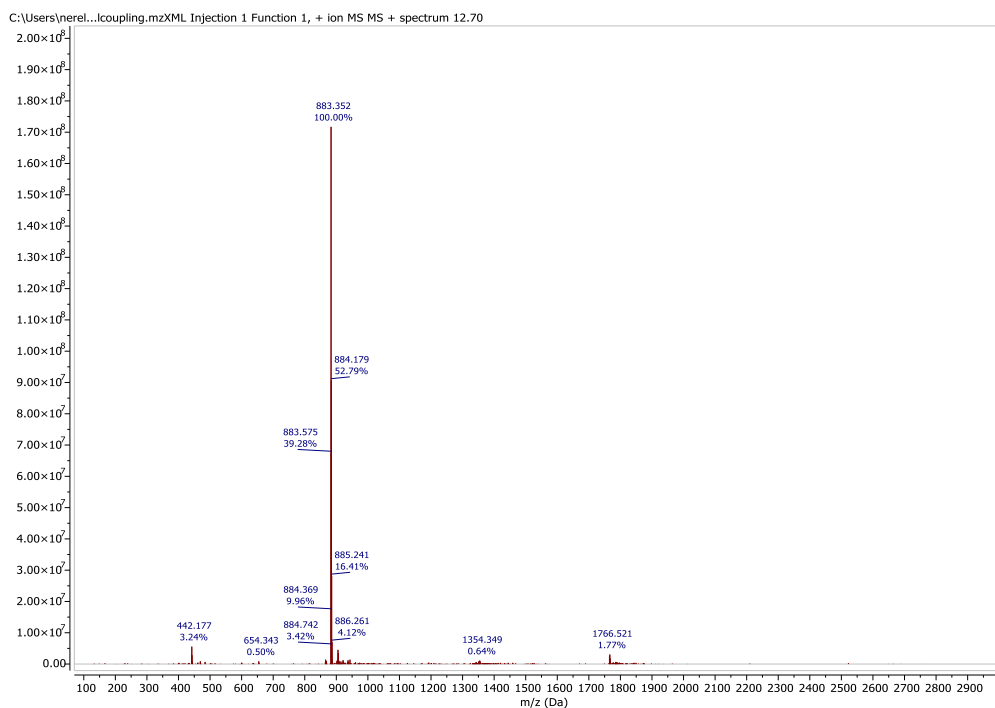


Figura 85. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.7$ min.

Síntese do composto 6: acoplamento do derivado de DO3A ao composto 5

O composto **6** foi sintetizado seguindo o procedemento descrito no Esquema 11. O acoplamento do derivado de DO3A ao composto **5** se leva a cabo empregando HBTU/DIEA como axente de acoplamento durante 2 min para a preactivación do grupo carboxilo que reacciona co grupo amino presente no derivado de DO3A, e logo esta mestura se deixou actuar na resina durante 2 horas dando lugar ao composto **6**. Unha vez sintetizado o composto **6**, se leva a cabo a etapa de desanclado da resina durante 6 h e o crudo de desprotección se analiza mediante HPLC en fase reversa, co obxectivo de comprobar que o acoplamento foi levado a cabo con éxito. Para o acoplamento do DO3A, o cromatograma de HPLC presenta 2 picos maioritarios en comparación co resto, nos que o pico a $t_R = 12.6$ min que foi identificado por ESI-MS como o péptido acoplado con DO3A e con 2 *terc*-butilo sen desprotexer (m/z : 1366.816 [MH]⁺, 684.011 [MH₂]⁺²), o pico a $t_R = 13.9$ min que foi identificado por ESI-MS como o péptido acoplado co DO3A e con 3 *terc*-butilo sen desprotexer (m/z : 1422.853 [MH]⁺, 714.04 [MH₂]⁺²). O pico correspondente ao composto desexado co DO3A acoplado e ningún *terc*-butilo protexido, atópase a $t_R = 10.9$ min que foi identificado por ESI-MS (m/z : 1254.647 [MH]⁺, 627.917 [MH₂]⁺²). Aínda que o cromatograma mostra varios picos, todos se corresponden ao péptido co ligando acoplado, do que non se eliminaron os seus grupos protectores durante a etapa de desanclado da resina. Deseguido se continuou coa etapa de purificación do péptido.

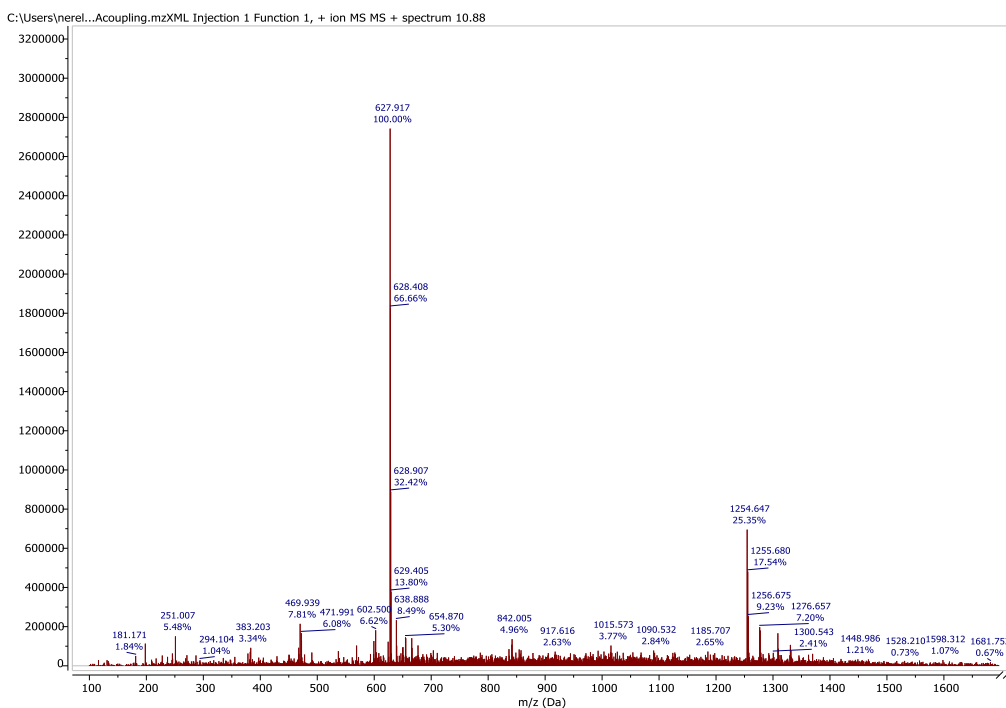


Figura 16. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 10.9$ min.

Purificación do péptido (composto 6)

Unha vez sintetizado o composto **6** hai que levar a cabo a súa purificación para así poder obter o péptido de interese sen interferentes do medio. Para a purificación do péptido (0.5 mmol) realizáronse varias probas nas que se foi variando o % de MeCN, onde finalmente o método utilizado a unha temperatura de 80 °C foi :

tempo (min)	%MeCN
0	15
4	15
10	46
25	47
26	95
30	95
31	15
36	15

Tódalas fraccións de péptido recollidas foron liofilizadas e analizadas mediante HPLC en fase reversa, co obxectivo de comprobar que a purificación foi levada a cabo con éxito. O cromatograma de HPLC presenta un pico a $t_R = 10.4$ min que foi identificado por ESI-MS como o produto purificado desexado (m/z : 1254.65 [MH]⁺, 627.928 [MH₂]⁺²).

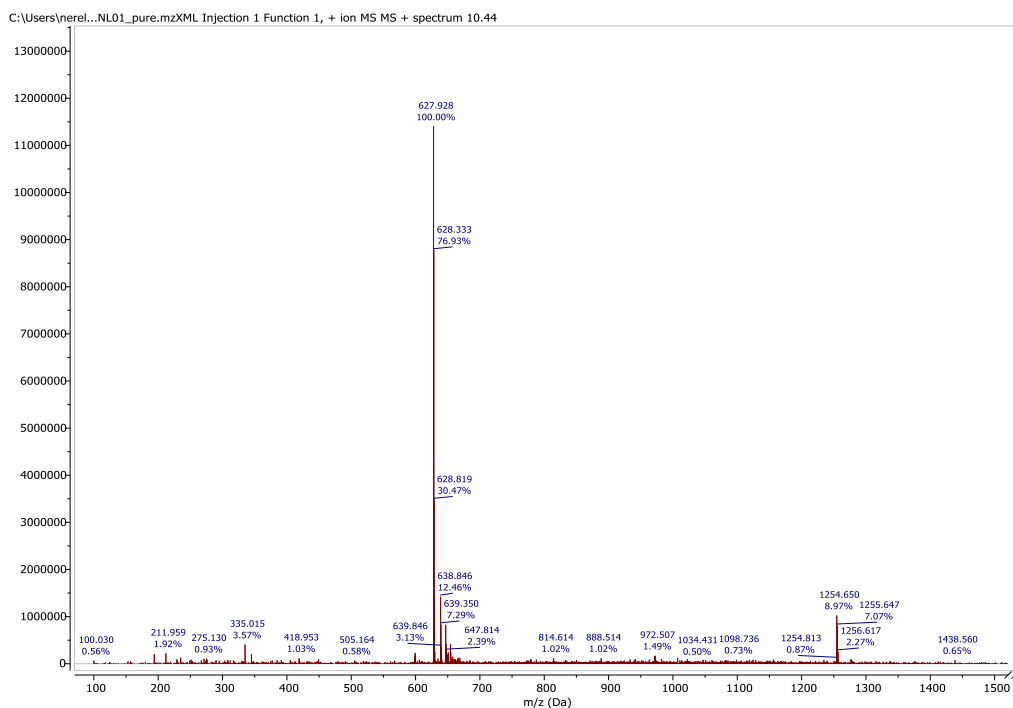


Figura 17. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 10.4$ min.

Estudos da emisión de fosforescencia do sensor

Unha vez se ten o péptido sintetizado e caracterizado, se procede a estudar as súas propiedades luminescentes.

Para o estudo de emisión de fosforescencia, preparouse unha disolución 2.4 mM do péptido en tampón 10 μ M HEPES pH 8, sobre a que se engadiu unha pequena alícuota dunha disolución de EuCl_3 en 1 mM HCl e a mestura axítase (30min, 500 rpm), co fin de preparar unha disolución equimolar do metalopéptido. A continuación, se engade 1 M CaCl_2 á disolución anterior, que fará que o Ca^{+2} actúe como cofactor fronte a proteasa.

Previo a realizar os ensaios coa proteasa se comproba que o péptido é luminescente.

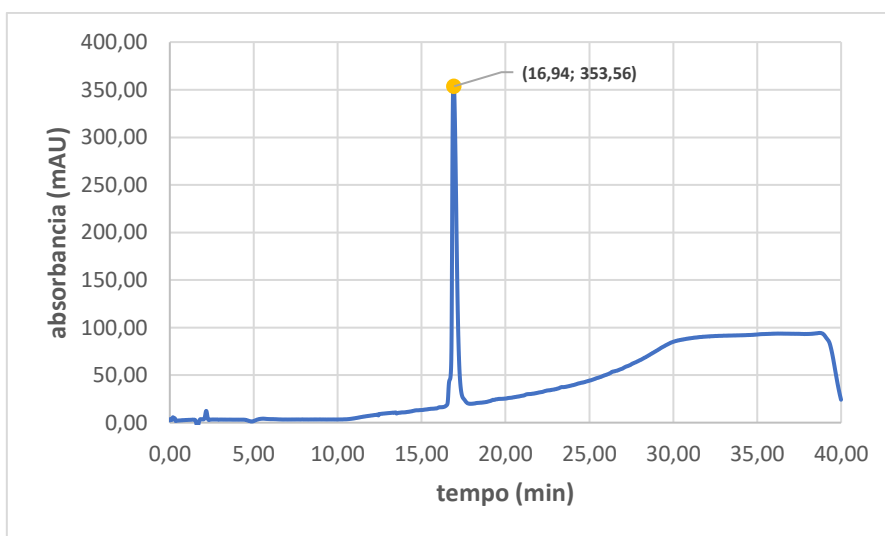


Figura 18. Cromatograma de HPLC a 220 nm do péptido purificado.

Como era de esperar o péptido é luminescente xa que presenta un pico de emisión a 344 nm ao lle facer incidir unha lonxitude onda de excitación correspondente á enerxía de excitación da antena sensibilizadora. A continuación realízanse os estudos con sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa*, xa que como anteriormente se comentou, o enzima LasB é secretado ao exterior por esta bacteria. Ademais de facelo ensaio co sobrenadante do cultivo da cepa de *P. aeruginosa* coa enzima natural sen modificar, fixéronse dous ensaios máis de dúas cepas de *P. aeruginosa* que están modificadas xenéticamente para que non produzan LasB (LasB1 e LasB2).

Unha vez engadidos os sobrenadantes das distintas cepas de *P. aeruginosa* sobre as disolucións do metalopéptido, rexistrouse a intensidade de luminescencia a 615 nm en intervalos dunha hora. Traballouse a 70 rpm e a unha temperatura de 37 °C entre o sensor e a enzima debido a que esa é a temperatura fisiolóxica da LasB.

O corte da sonda pola enzima na posición -GLA- da lugar a dous fragmentos no que a antena e o complexo de Eu(III) están separados alo menos a máis de 20Å, habendo así unha transferencia de enerxía non eficiente que ocasiona polo tanto unha diminución na luminescencia. Os dous fragmentos son, por un lado DO3A-espaciador-EG-OH e por outro lado H₂N-LAEDap(Naph). Os resultados obtidos confirman o proceso que se esperaba, xa que o ensaio levado a cabo co sobrenadante da enzima natural perde luminescencia a medida que pasa o tempo. En cambio, os ensaios levados a cabo con LasB1 e LasB2, aparentemente non presenta perda de luminescencia (Figura 19). Polo que estes resultados corroboran a especificidade do deseño do sensor pola enzima.

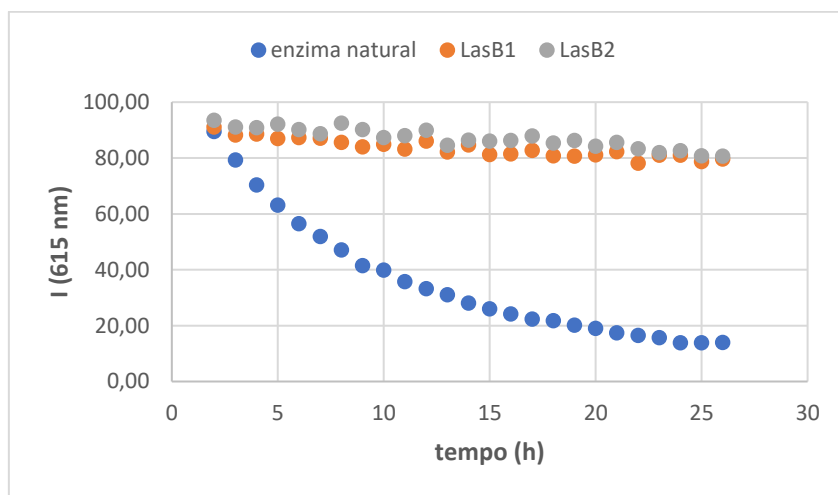


Figura 19. Emisión a 615 nm da sonda no tempo en presenza dos sobrenadantes que conteñen a enzima natural ou mutada.

Para estes ensaios de monitorización da degradación do sensor mediante HPLC en fase reversa analizáronse as 3 mostras cos diferentes sobrenadantes da enzima en comparación co resultado obtido do sensor solo. O cromatograma do sensor solo presenta un pico de absorción a un tempo de 16.94 min a 353.56 mAU. Os cromatogramas dos ensaios con LasB1 e LasB2 presentan os picos de absorción maioritarios a un tempo de 16.37 min a 387.05 mAU e 16.84 min a 382.21 mAU, respectivamente, xunto outra serie de picos menos intensos que non se identificaron. Ademais os ensaios con LasB1 e LasB2 presentan en MS

un pico maioritario a $t_R = 12.2$ min e $t_R = 12.1$ min, respectivamente, que foron identificados ambos por ESI-MS como o sensor sintetizado ($m/z : 1254.7$ $[MH]^+$, 627.9 $[MH_2]^{+2}$) correspondente á masa calculada ($m/z : 1254.6$ $[MH]^+$, 627.8 $[MH_2]^{+2}$). Como era de esperar, estes cromatogramas presentan o mesmo pico que o péptido purificado. Por outra banda, o cromatograma do ensaio coa enzima natural presenta un pico de absorción maioritario a un tempo de 15.82 min a 448.59 mAU que non se corresponde ao pico do péptido purificado, en cambio, o pico que se corresponde ao péptido purificado aparece a un tempo de 16.67 min a 83.34 mAU. O ensaio coa enzima natural presenta en MS un pico maioritario a $t_R = 12.2$ min que foi identificado por ESI-MS como a secuencia $H_2N-LAEDap(Naph)$ ($m/z : 597.332$ $[MH]^+$) correspondente á masa calculada ($m/z : 596.26$ $[MH]^+$). Desta maneira, pódese corroborar a especificidade do deseño do sensor pola enzima, xa que o ensaio co sobrenadante de enzima natural presenta un descenso na absorbancia do pico correspondente ao péptido purificado debido ao corte en dous fragmentos do sensor e en MS se identifica o corte do sensor.

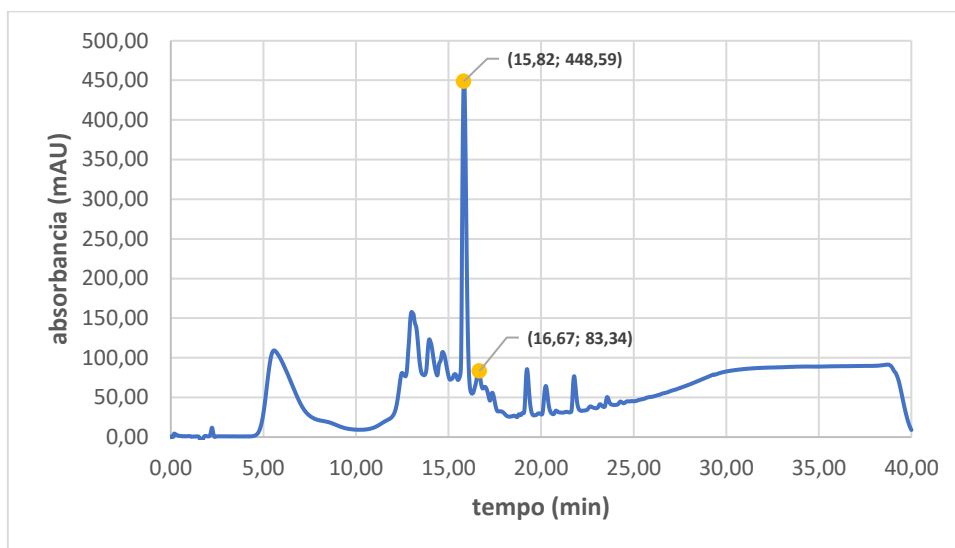


Figura 20. Cromatograma de HPLC a 220 nm da sonda en presenza do sobrenadante que contén a enzima natural.

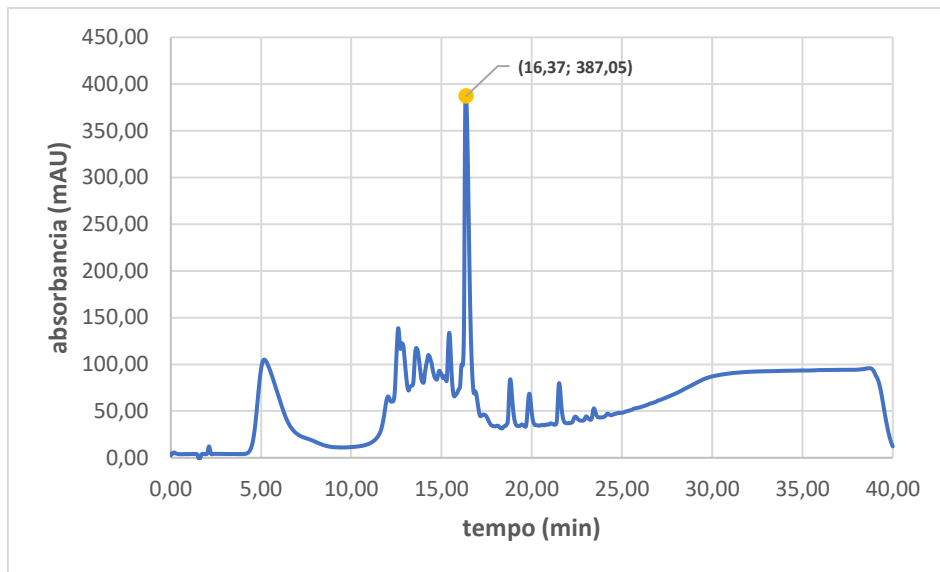


Figura 21. Cromatograma de HPLC a 220 nm da sonda en presencia do sobrenadante que contén a enzima mutada LasB1.

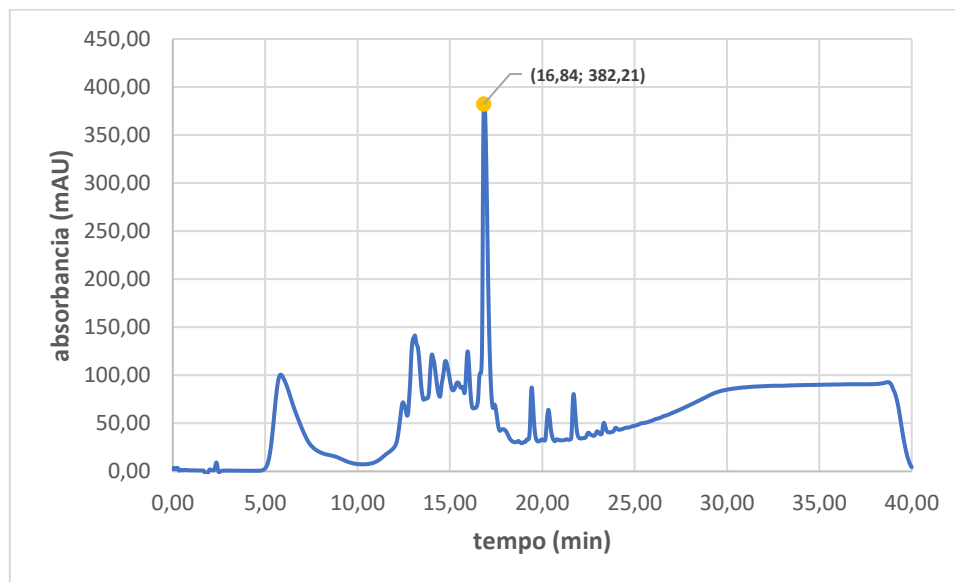


Figura 22. Cromatograma de HPLC a 220 nm da sonda en presencia do sobrenadante que contén a enzima mutada LasB2.

PARTE EXPERIMENTAL

Cronograma

	Febreiro				Marzo				Abril				Maio				Xuño				Xullo							
	Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas				Semanas							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Búsqueda bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
Síntese do péptido			■	■	■	■																						
Acoplamento anhídrido succínico e DO3A							■	■																				
Purificación péptido								■		■																		
Ensaio luminescencia																	■	■	■	■								
Redacción									■	■	■	■					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Información xeral

Os reactivos empregados foron reactivos comerciais que non se purificaron de forma adicional. A auga foi purificada empregando un sistema Mili-Q (*Millipore*).

O seguimento das reaccións levouse a cabo mediante cromatografía HPLC-MS cun equipo Brüker Elute SP con detector cuadrupolo amaZon speed Toxyper.

A monitorización das reaccións por HPLC mediante absorción de UV foron levados a cabo cun equipo Thermo Scientific UltiMate 3000 conectado a un detector de matriz de fotodiodos (PDA). A columna utilizada para as analíticas é unha columna analítica Aeris (C18 de fase estacionaria).

Para a purificación utilizouse un equipo HPLC Agilent 1200 series utilizando unha columna semipreparativa Aeris de Phenomenex (C18 de fase estacionaria). Como elúntes utilizáronse unha disolución de 20 mM NH₄Ac en H₂O e de 0.1% da disolución anterior en MeCN. A elución foi en gradiente lineal de 10% a 18,5% de MeCN en 15 minutos.

A cuantificación da concentración do péptido levouse a cabo nun espectrofotómetro Jasco V-750 de dobre haz, empregando unha cubeta de cuarzo de 1 mL.

As medidas de luminescencia leváronse a cabo nun espectrofluorímetro Horiba Fluoromax, empregando unha cubeta de cuarzo Semi-Micro de axitación para os ensaios enzimáticos.

Desenvolvemento sintético

- Resina: H-Rink amide Chem Matrix (0.42 mmol/g)
- Base: DIEA 0.195M
- Test TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico)¹⁹: test para a protección/desprotección de grupo amino: 1% TNBS/DMF + 10% DIEA/DMF
- Axente de eliminación Fmoc: 4-metilpiperidina

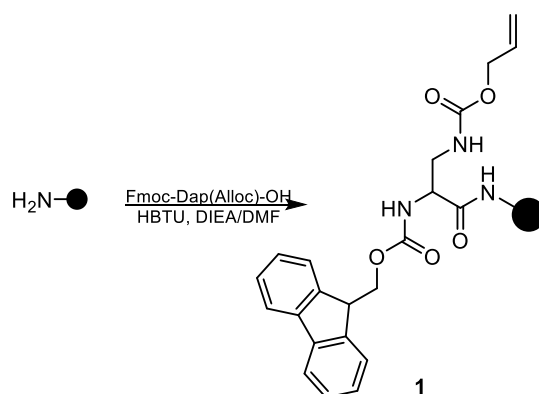
- Axente de eliminación Alloc: Pd(OAc)₂, Pd(PPh₃)₄
- Secuencia péptido: EGLAEDap

A resina (238 mg) se deposita no reactor de fase sólida e se lava con CH₂Cl₂ (30 min) baixo o burbuxeo de N₂. Posteriormente, a resina se lava e se filtra con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min).



Figura 23. Montaxe para a síntese en fase sólida.

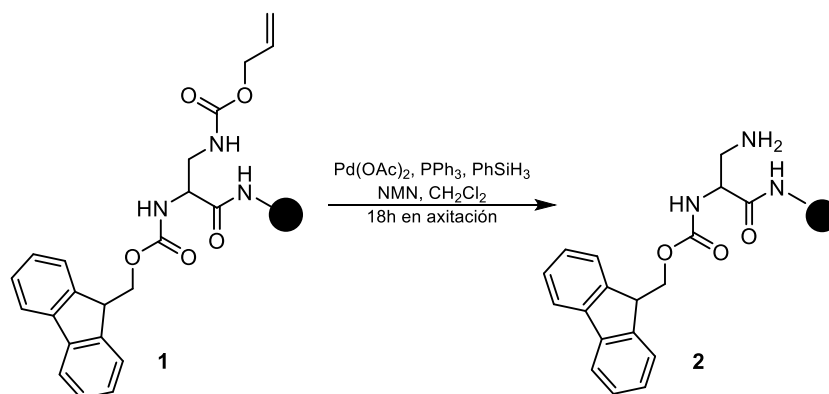
1. Acoplamento do primeiro aminoácido Dap (compuesto 1)



Esquema 14. Esquema do acoplamento do Dap á resina.

Disólvese o Dap (0.4 mmol) en DMF (2 mL), DIEA 0.195M (0.6 equivalentes, 3 mL) e, HBTU para preactivar a mestura (2 min), a continuación, esta disolución se engade na resina e se deixa en axitación durante 30 minutos. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con DMF (2×3 mL, 3min) e con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min).

2. Desprotección do grupo Alloc do composto 1

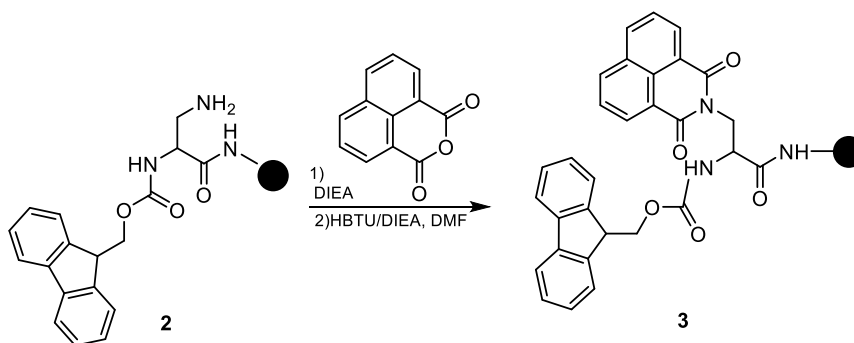


Esquema 15. Esquema de desprotección do grupo Alloc do composto 1.

O composto **1** se trata cunha mestura de PPh₃ (0.15 mmol, 39.34 mg) en CH₂Cl₂ (3 mL), NMM (*N*-metilmorfolina) (1 mmol, 0.1099 mL), PhSiH₃ (1 mmol, 0.1324

mL) e Pd(OAc)₂ (0.03 mmol, 6.73 mg), e esta se engade na resina con axitación durante toda a noite. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min), DMF (2×3 mL, 3min), DEDTC²⁰ (dietilditiocarbamato) (25 mg/5 mL DMF, 10min), CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min) e DMF (2×3 mL, 3min).

3. Acoplamento da antena, 1,8-naftalimida (Naph, reactivo comercial) ao composto 2



Esquema 16. Esquema de acoplamento da antena 1,8-naftalimida ao composto 2.

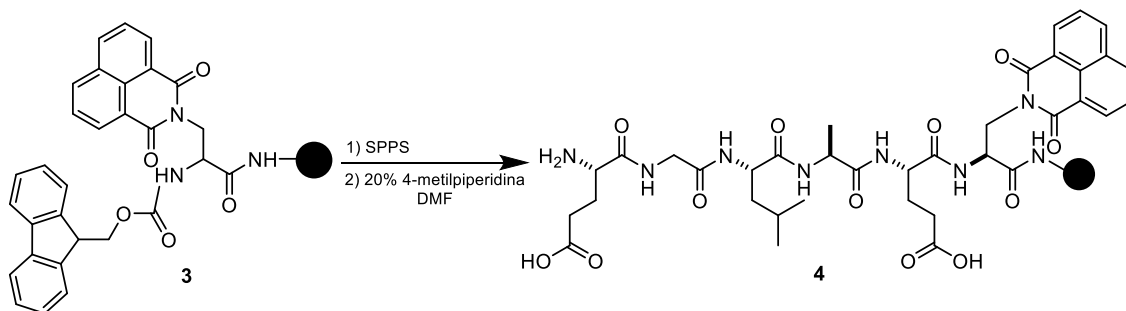
Disólvese 1,8-naftalimida (0.2 mmol, 43 mg) en DIEA 0.195M (0.6 mmol, 3 mL), esta disolución se engade na resina e se deixa en axitación toda a noite. A resina se filtra e se lava con DMF (3×1 mL, 2min). Disólvese HBTU (0.2 mmol, 76 mg) en DMF (1 mL), DIEA 0.195M (0.6 mmol, 3 mL), e a mestura resultante burbuxéase na resina con N₂ durante 45 min. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con DMF (2×3 mL, 3min) e con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min).

Para monitorizar a reacción mediante HPLC, 4 mg de resina foron tratados con 125 µL do cóctel de desprotección (25 µL TIS + 25 µL H₂O + 950 µL TFA) durante 1.5h. A continuación a resina se filtra, o filtrado se verte sobre o éter enfriado (1.2 mL) e, se centrifuga durante 5 min. O disolvente se evapora a sequidade e o residuo obtido se dissolve en 50 µL de H₂O:MeCN (1:1). O análise foi levado a cabo en fase reversa e con gradiente, utilizando unha columna C18 e unhas fases móbiles H₂O:MeCN (1:1) e TFA.

t_R : 17.8 min

ESI-MS m/z calculado para C₃₀H₂₄N₃O₅⁺ 506.17 [MH]⁺, atopado 506.178 [MH]⁺

4. Síntese da cadea peptídica (composto 4) unida á resina co Naph ciclado e co N-terminal libre



Esquema 17. Esquema da síntese do péptido EGLAEDap (composto 4) unido á resina co Naph ciclado e co N-terminal libre.

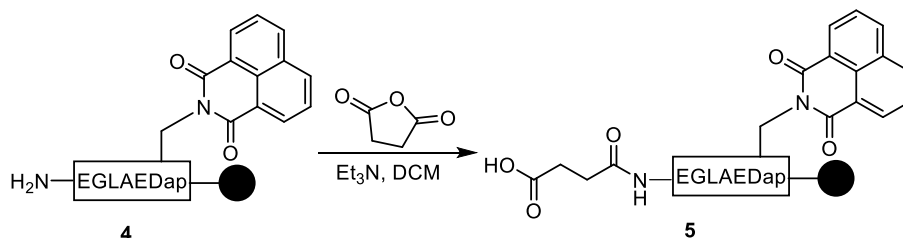
Disólvese o aminoácido correspondente (0.4 mmol) con HBTU (0.2mmol,76 mg) en DMF (2 mL), DIEA 0.195 M (3 mL) se preactiva a mestura (2 min) e se burbuxea na resina con N₂ durante 45 min. Se lava e filtra a resina con DMF (2×3 mL, 3min), se desprotexe o Fmoc con 20% 4-metilpiperidina/DMF (2 mL). A continuación, despois de cada acoplamento se realiza o test TNBS para comprobar si o acoplamento foi óptimo, dando lugar a un resultado positivo. A secuencia de aminoácidos a sintetizar é EGLAEDap, onde o procedemento a seguir para acoplar aminoácidos é sempre o mesmo, disólvese o aminoácido (0.4 mmol) con HBTU (0.2 mmol, 76 mg) en DMF (2 mL), HBTU 0.195 M (3 mL), se preactiva a mestura (2 min) e se burbuxea na resina con N₂ durante 45 min. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con DMF (2×3 mL, 3min) e con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min). Finalmente se volve levar a cabo o test TNBS para comprobar a eficiencia do acoplamento. Se desprotexe o grupo Fmoc con metilpiperidina (15 min) e se filtra e se lava a resina con DMF (3×1 mL, 2min).

Para monitorizar a reacción mediante HPLC, 4 mg de resina foron tratados con 125 µL do cóctel de desprotección (25 µL TIS + 25 µL H₂O + 950 µL TFA) durante 1.5h. A continuación a resina se filtra, o filtrado se verte sobre o éter enfriado (1.2 mL) e, se centrifuga durante 5 min. O disolvente se evapora a sequidade e o residuo obtido se dissolve en 100 µL de H₂O:MeCN (1:1). O análise foi levado a cabo en fase reversa e con gradiente lineal, utilizando unha columna C18 e unhas fases móbiles H₂O:MeCN (1:1) e TFA.

t_R : 16.5 min

ESI-MS m/z calculado para C₅₁H₅₇N₈O₁₄⁺ 1005.40 [MH]⁺, atopado 1005.505 [MH]⁺, atopado 503.18 [MH₂]⁺²

5. Acoplamento do espacidor, anhídrido succínico, ao péptido lineal (composto 4)



Esquema 18. Esquema de acoplamento do anhídrido succínico ao composto 4.

Disólvese anhídrido succínico (1 mmol, 100.07 mg) en CH₂Cl₂ e Et₃N (0.11 mmol, 15 µL), esta disolución se engade sobre a resina e se deixa en axitación toda a noite. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con DMF (2×3mL, 2min) e con CH₂Cl₂ (2×3mL, 2min).

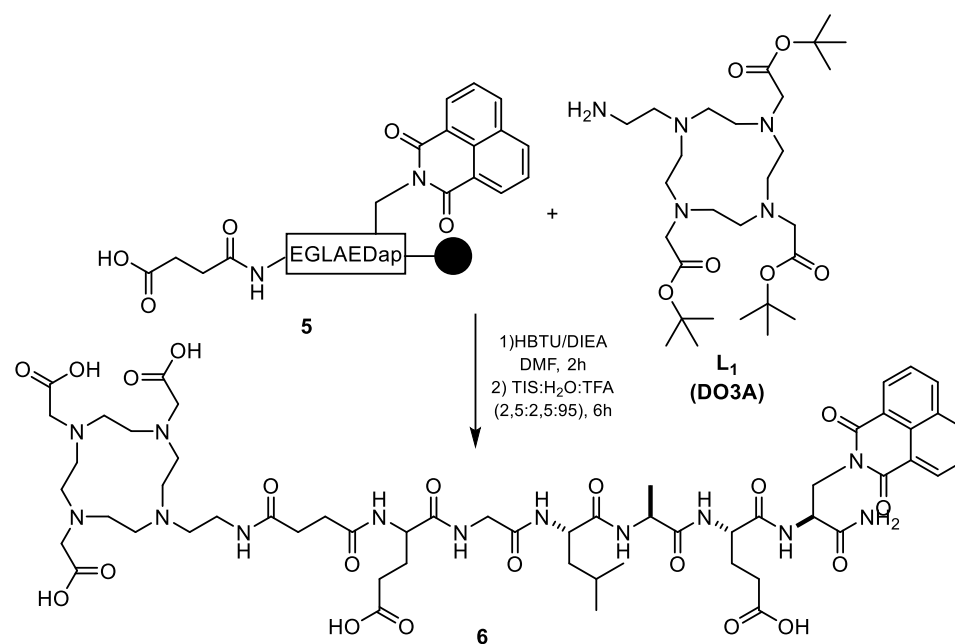
Para monitorizar a reacción mediante HPLC, 4 mg de resina foron tratados con 125 µL do cóctel de desprotección (25 µL TIS + 25 µL H₂O + 950 µL TFA) durante 1.5 horas. A continuación a resina se filtra, o filtrado se verte sobre o éter enfriado (1.2 mL) e, se centrifuga durante 5 min. O disolvente se evapora a sequidade e o residuo obtido se dissolve en 50 µL de H₂O:MeCN (1:1). O análise foi levado a cabo en fase reversa e con gradiente lineal, utilizando unha columna C18 e unhas fases móbiles H₂O:MeCN (1:1) e TFA.

t_R : 12.7 min

ESI-MS m/z calculado para $C_{40}H_{51}N_8O_{15}^+$ 883.35 $[MH]^+$, atopado 883.352 $[MH]^+$, atopado 442.177 (3.24%) $[MH]^{+2}$

6. Acoplamento do derivado de DO3A ao composto 5 e escisión do péptido sintetizado da resina

O derivado de DO3A foi sintetizado polo grupo de investigación seguindo procedementos publicados con anterioridade²¹.



Esquema 19. Esquema de acoplamento do derivado do DO3A ao composto 5 e escisión do péptido sintetizado da resina.

Disólvese HBTU (0.1 mmol, 37.92 mg) en DMF (2 mL), DIEA 0.195M (2 mL, 2min), se preactiva a mestura (2 min) e, deseguido se dissolve tamén DO3A (0.2 mmol, 111.68 mg) en DMF, esta disolución se burbuxea na resina baixo N₂ durante 2 horas. Posteriormente, a resina se filtra e se lava con DMF (2×3 mL, 3min) e con CH₂Cl₂ (2×3 mL, 3min).

Para monitorizar a reacción mediante HPLC, se vai desprotexer todo o péptido da resina (96.3 mg) e se trata co cóctel de desprotección (TIS:H₂O:TFA, 2.5:2.5:95) durante 6 horas. A continuación a resina se filtra, o filtrado se verte sobre o éter enfriado (25 mL) e se acondiciona a centrifuga (4 °C, 22 min) e a resina se centrifuga durante 15min. O precipitado se dissolve en 1 mL de H₂O:MeCN (1:1). O análise foi levado a cabo en fase reversa e con gradiente lineal, utilizando unha columna C18 e unhas fases móbiles de de NH₄Ac 20 mM en H₂O e NH₄Ac 20 mM en MeCN.

t_R : 10.9 min

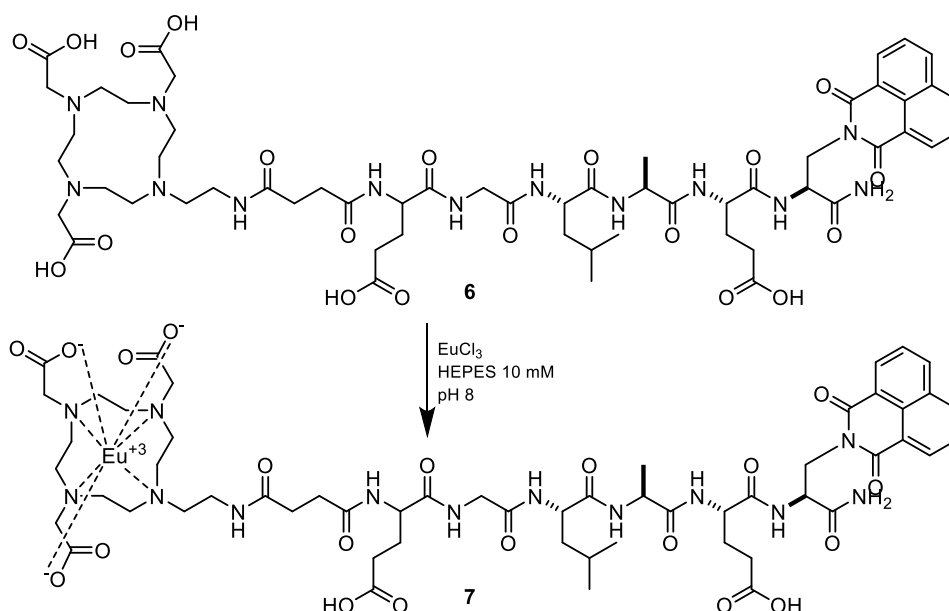
ESI-MS m/z calculado para $C_{56}H_{80}N_{13}O_{20}^+$ 1254.56 $[MH]^+$, atopado 1254.647 (25.35%) $[MH]^+$, atopado 627.917 (100%) $[MH_2]^{+2}$

7. Purificación, liofilización e cálculo da concentración do péptido sintetizado

A purificación do péptido levouse a cabo mediante HPLC-UV, previamente hai que optimizar o método a utilizar e deseguido pódese proceder a recoller tódalas fraccións do pico de interese. Estas fraccións se xuntan e se reparten en volumes iguais, se meten nunha disolución de N₂ (l) e posteriormente se liofilizan. Estas fraccións liofilizadas serán analizadas en HPLC-MS.

A continuación, levouse a cabo mediante espectroscopía de UV-Vis a determinación da concentración do péptido. Se dissolve o péptido (5.8 mg) en 200 μ L H₂O MQ. Sobre 800 μ L dunha disolución de tampón fosfato 10mM pH 7.5, engadíronse alícuotas do composto **6** e tras cada adición rexístrase un espectro de UV-Vis da disolución resultante. A concentración calcúlase a partir da ecuación de Lambert-Beer nun máximo de absorción de 344 nm, xa que é de onde sabemos o valor teórico de ϵ ²².

8. Coordinación do composto 6 co Eu e caracterización sensor



Esquema 20. Esquema de coordinación do composto 6 con Eu(III).

Para os estudos da emisión de fosforescencia, sobre 17.5 μ L dunha disolución 2.4 mM do péptido en tampón 10 μ M HEPES pH 8 (4.2 mL), engádense 1.28 μ L dunha disolución 25 mM de EuCl₃ en 1 mM HCl e, a mestura axítase durante 30 min (500 rpm). A continuación, engádese 1 μ L de 1 mM CaCl₂, 2.5 μ L da enzima e se mide.

Para monitorizar a degradación do sensor mediante HPLC, prepáranse 27 μ L dunha disolución 1.33 mM do péptido en tampón 10 μ M HEPES pH 8 (10.7 μ L), engádense 1.43 μ L dunha disolución 25 mM de EuCl₃ en 1 mM HCl, a mestura axítase durante 45 min (310 rpm) no Thermo-Shaker e, a continuación, engádese 3.59 μ L de 1 M CaCl₂.

Luminescencia

As medicións de emisión foron levadas a cabo co espectrofluorímetro Horiba Fluoromax, no modo de fosforescencia empregando unha lámpara de flash de xenón. En tódalas medicións se empregaron unha cubeta de cuarzo Semi-Micro de axitación para os ensaios enzimáticos realizados a 37 °C, 70 rpm de axitación e 25 ciclos, un a cada hora. Os parámetros utilizados nas medidas foron: 344 nm de lonxitude de onda de excitación; 10 nm e 3 nm de ancho de slits de emisión e excitación, respectivamente; incremento 1 nm; retraso inicial 0.2 ms.

CONCLUSIONES

Este traballo centrouse no deseño e síntese dun sensor luminescente da enzima LasB, secretada pola bacteria *P. aeruginosa*. O metalopéptido preparado contén a secuencia de corte correspondente da enzima (-GLA-) e foi sintetizado e modificado seguindo protocolos ortogonais habituais en síntese de fase sólida, sen atopar problemas sintéticos.

Leváronse a cabo estudos das propiedades fotofísicas do complexo peptídico de Eu(III) e a través de medidas experimentais comprobouse que, o complexo mediante a enerxía que capta a antena sensibilizadora e que transmite ao Eu(III), emite luminescencia.

A maiores se levaron a cabo estudos de detección da enzima LasB, onde se realizaron medidas de luminescencia para o sensor en presenza do sobrenadante de cultivos de bacterias modificadas ou sen modificar. Como era o resultado a esperar, o sensor en presenza do sobrenadante da enzima sen modificar realizará a secuencia de corte correspondente, provocando desta maneira un decrecemento na intensidade lumínica. Estes resultados tamén se corroboraron mediante HPLC en fase reversa comprobando así que o sensor en presenza do sobrenadante da enzima sen modificar realizou correctamente a secuencia de corte.

Desta maneira, pódese concluír que se preparou un sensor específico da enzima LasB que permitiría detectar a bacteria *P. aeruginosa*.

CONCLUSIONES

Este trabajo se centro en el diseño y síntesis de un sensor luminiscente de la enzima LasB, secretada por la bacteria *P. aeruginosa*. El metalopéptido preparado contiene la secuencia de corte correspondiente de la enzima (-GLA-) y fue sintetizado y modificado siguiendo protocolos ortogonales habituales en síntesis de fase sólida, sin encontrar problemas sintéticos.

Se llevaron a cabo estudios de las propiedades fotofísicas del complejo peptídico de Eu(III) y a través de medidas experimentales se comprobó que, el complejo mediante la energía que capta la antena sensibilizadora y que transmite al Eu(III), emite luminiscencia.

A mayores se llevaron a cabo estudios de detección de la enzima LasB, donde se realizaron medidas de luminiscencia para el sensor en presencia del sobrenadante de cultivos de bacterias modificadas o sin modificar. Como era el resultado a esperar, el sensor en presencia del sobrenadante de la enzima sin modificar realizará la secuencia de corte correspondiente, provocando de esta manera un decrecimiento en la intensidad lumínica. Estos resultados también se corroboraron mediante HPLC en fase reversa comprobando así que el sensor en presencia del sobrenadante de la enzima sin modificar realizó correctamente la secuencia de corte.

De esta manera, se puede concluir que se preparó un sensor específico de la enzima LasB que permitiría detectar la bacteria *P. aeruginosa*.

CONCLUSIONS

This work focused on the design and synthesis of a luminescent sensor for the enzyme LasB, secreted by the bacterium *P. aeruginosa*. The prepared metallopeptide contains the corresponding cutting sequence of the enzyme (-GLA-) and was synthesized and modified following usual orthogonal protocols in solid phase synthesis, without encountering synthetic problems.

Studies of the photophysical properties of the Eu(III) peptide complex were carried out and through experimental measurements it was verified that, through the energy captured by the sensitizing antenna and transmitted to Eu(III), the complex emits luminescence.

Further detection studies of the LasB enzyme were carried out, where luminescence measurements were made for the sensor in the presence of the supernatant of cultures of modified or unmodified bacteria. As was the result to be expected, the sensor in the presence of the unmodified enzyme supernatant will carry out the corresponding cutting sequence, thus causing a decrease in light intensity. These results were also corroborated by reverse phase HPLC, thus verifying that the sensor, in the presence of the supernatant of the unmodified enzyme, correctly performed the cutting sequence.

In this way, it can be concluded that a specific sensor for the LasB enzyme was prepared that would allow the detection of the *P. aeruginosa* bacterium.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Paz-Zarza, V. M.; Mangwani-Mordani, S.; Martínez-Maldonado, A.; Álvarez-Hernández, D.; Solano-Gálvez, S. G.; Vázquez-López, R.; Paz-Zarza, V. M.; Mangwani-Mordani, S.; Martínez-Maldonado, A.; Álvarez-Hernández, D.; Solano-Gálvez, S. G.; Vázquez-López, R. *Pseudomonas Aeruginosa: Patogenicidad y Resistencia Antimicrobiana En La Infección Urinaria. Rev. Chil. Infectol.* **2019**, *36* (2), 180–189.
- (2) Burrows, L. L. The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4* (7), 1041–1047.
- (3) Balibar, C. J.; Grabowicz, M. Mutant Alleles of LptD Increase the Permeability of *Pseudomonas Aeruginosa* and Define Determinants of Intrinsic Resistance to Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (2), 845–854.
- (4) Lister, P. D.; Wolter, D. J.; Hanson, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (4), 582–610.
- (5) Camberlein, V.; Jézéquel, G.; Haupenthal, J.; Hirsch, A. K. H. The Structures and Binding Modes of Small-Molecule Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase LasB. *Antibiotics* **2022**, *11* (8), 1060.
- (6) Everett, M. J.; Davies, D. T. *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase (LasB) as a Therapeutic Target. *Drug Discov. Today* **2021**, *26* (9), 2108–2123.
- (7) Camberlein, V.; Jézéquel, G.; Haupenthal, J.; Hirsch, A. K. H. The Structures and Binding Modes of Small-Molecule Inhibitors of *Pseudomonas Aeruginosa* Elastase LasB. *Antibiotics* **2022**, *11* (8), 1060.
- (8) *Bioorganic Chemistry: Peptides and Proteins*; Hecht, S.M. Oxford University Press, Oxford, 1998.
- (9) Fields, G.B. *Int. J. Pept. Protein Res.* 35th ed. 1990, p 161.
- (10) Luna, O. F.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S. H.; Guzmán, F. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules* **2016**, *21* (11), 1542.
- (11) Valeur, B. *Molecular Florescence Principles and Applications*; 2001; Vol. Vol.8.
- (12) R.E. Whan, G.A. Crosby. *J. Mol.Spectrosc.* Vol. 8. 1962, p 315.
- (13) W.T. Carnall, In; K.A. Gschneidner, J.-C.G. Bünzli; V.K. Pecharsky, Eds. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, North Holland Publ. Co.; Amsterdam, 1979; Vol. Vol. 3.
- (14) W.T. Carnall, In; P. R. Fields; K. Rajnak. *J. Chem. Phys.* Vol. 49. 1968, p 4424.
- (15) Bonnet, C. S.; Devocelle, M.; Gunnlaugsson, T. Luminescent Lanthanide-Binding Peptides: Sensitising the Excited States of Eu(III) and Tb(III) with a 1,8-Naphthalimide-Based Antenna. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (1), 126–133.
- (16) B. Alpha, R. Ballardini; V. Balzani, J-M. Lehn; S. Perathoner; N. Sabbatini. Antenna Effect in Luminescent Lanthanide Cryptates: A Photophysical Study. *Photovhem Photobiol.* ago 1990, pp 299–306.
- (17) Pazos, E.; Goličnik, M.; Mascareñas, J. L.; Eugenio Vázquez, M. Detection of Phosphorylation States by Intermolecular Sensitization of Lanthanide–Peptide Conjugates. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (76), 9534.

- (18) González-Vera, J. A.; Bouzada, D.; Bouclier, C.; Eugenio Vázquez, M.; Morris, M. C. Lanthanide-Based Peptide Biosensor to Monitor CDK4/Cyclin D Kinase Activity. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (45), 6109–6112.
- (19) Fields, R. [38] The Rapid Determination of Amino Groups with TNBS. In *Methods in Enzymology*; Enzyme Structure, Part B; Academic Press, 1972; Vol. 25, pp 464–468.
- (20) 228680 *Sigma-Aldrich*.
- (21) Pazos, E.; Goličnik, M.; Mascareñas, J. L.; Eugenio Vázquez, M. Detection of Phosphorylation States by Intermolecular Sensitization of Lanthanide–Peptide Conjugates. *Chem. Commun.* **2012**, 48 (76), 9534.
- (22) Bonnet, C. S.; Devocelle, M.; Gunnlaugsson, T. Structural Studies in Aqueous Solution of New Binuclear Lanthanide Luminescent Peptide Conjugates. *Chem. Commun.* **2008**, No. 38, 4552.

ANEXO

Síntese cadea peptídica coa antena acoplada

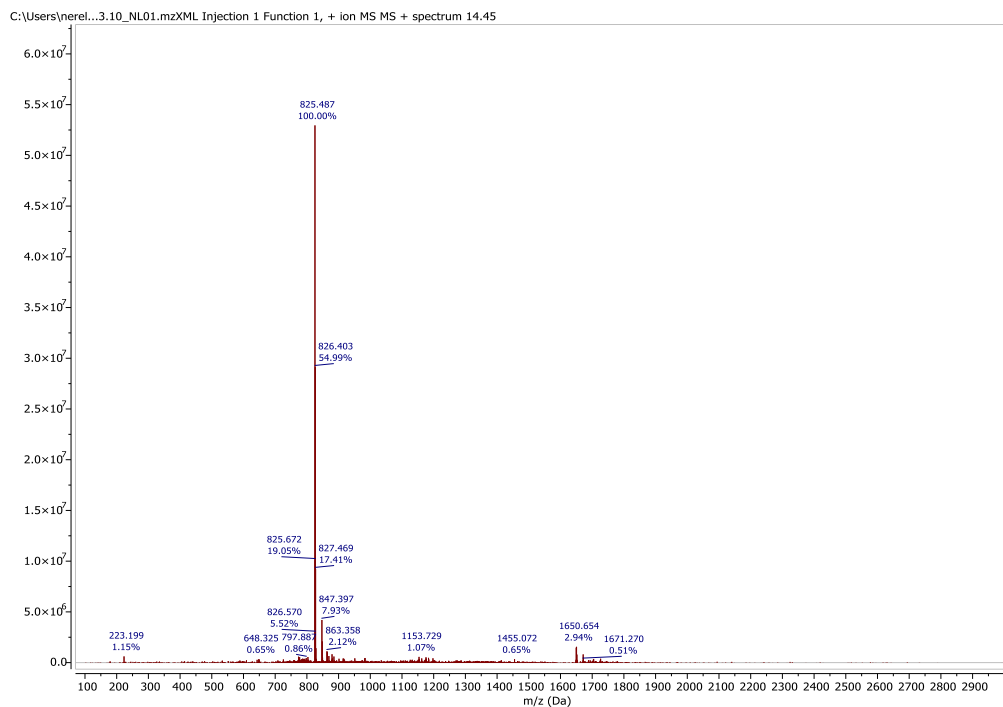


Figura 24. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 14.4$ min.

Acoplamento DO3A ao péptido

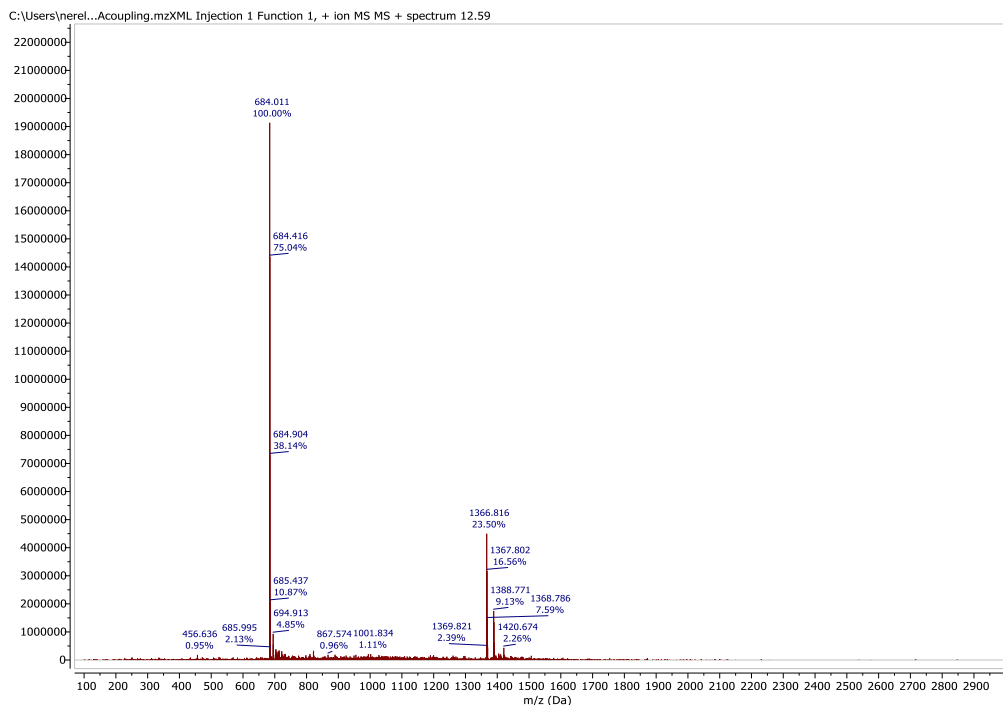


Figura 25. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.6$ min.

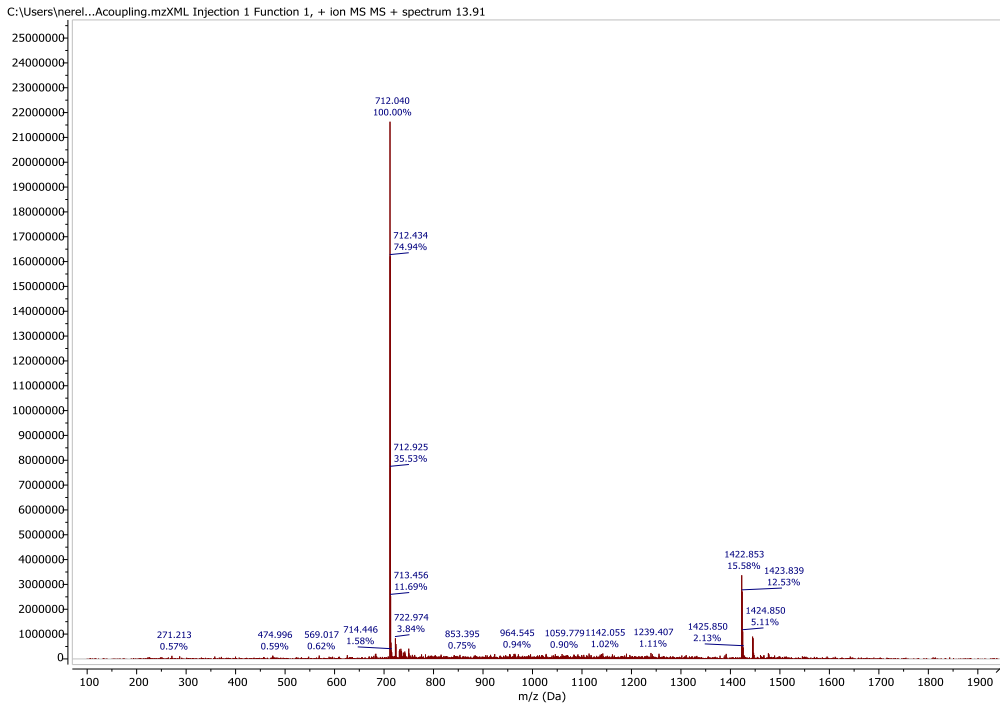


Figura 26. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 13.9$ min

Estudos da emissão de fosforescência do sensor sintetizado

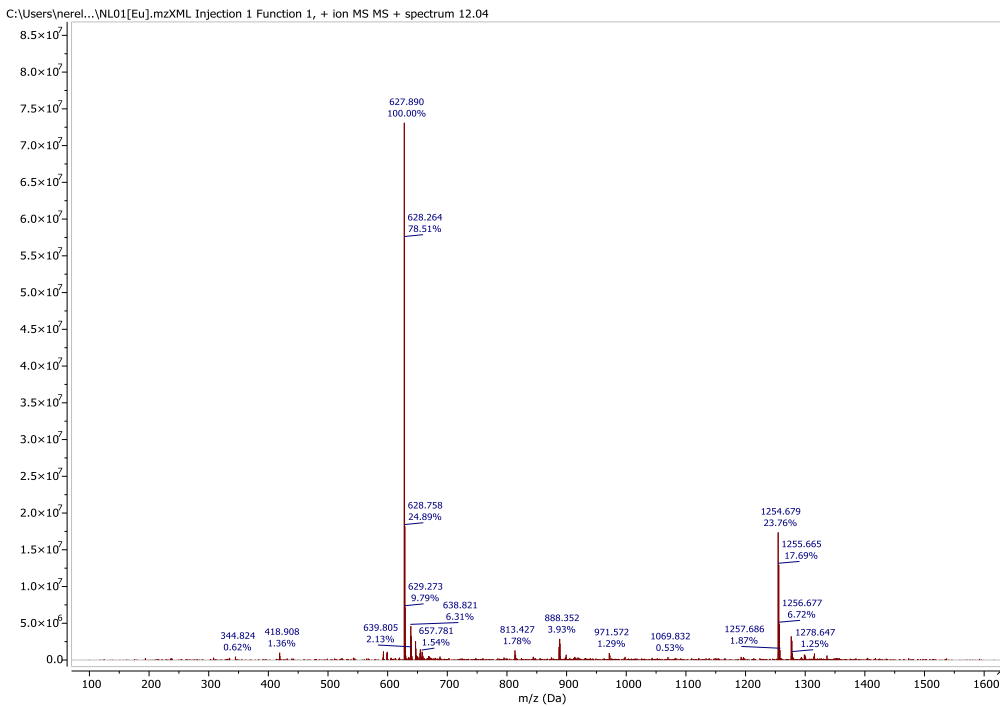


Figura 27. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.0$ correspondente ao sensor sen enzima.

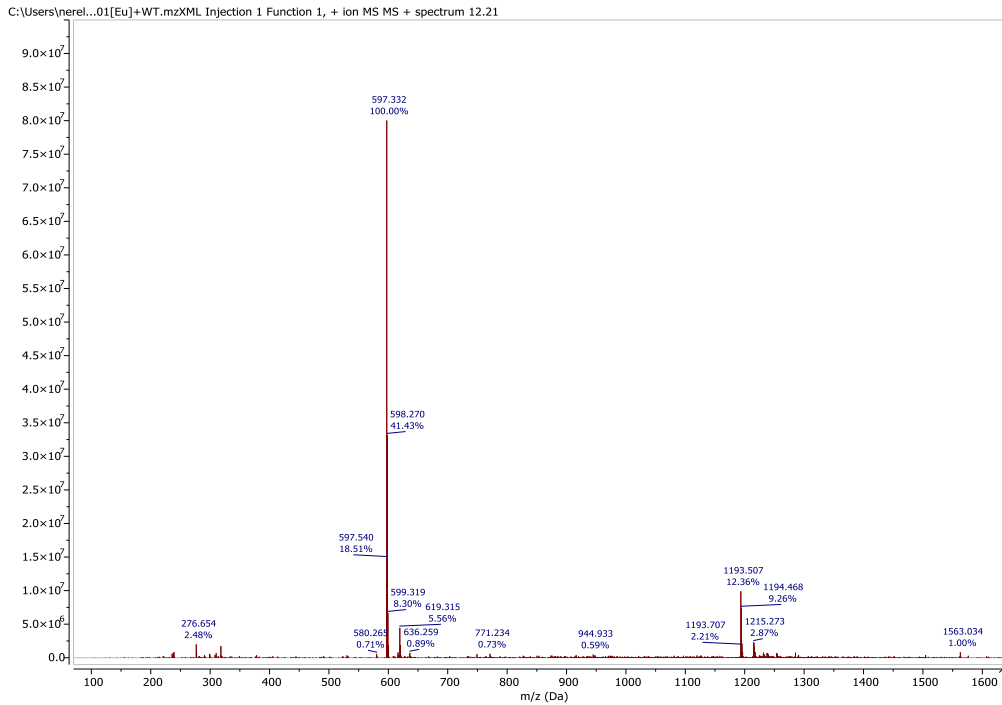


Figura 28. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.2$ min correspondente ao sensor em presença do sobrenadante que contém a enzima natural.

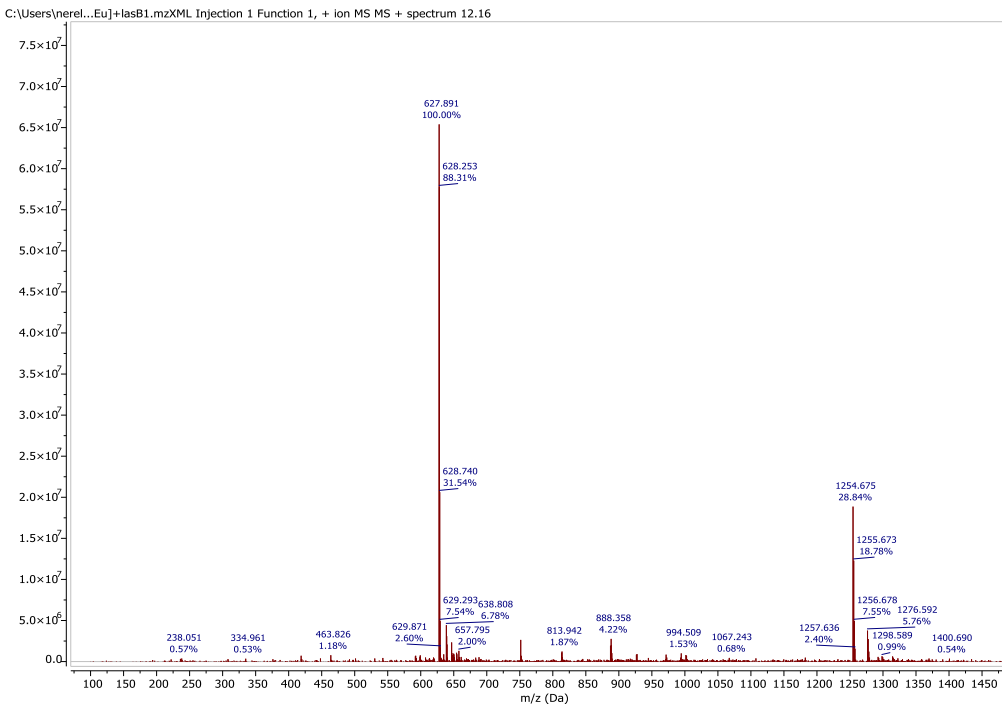


Figura 29. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.2$ min correspondente ao sensor em presença do sobrenadante que contém a enzima mutada LasB1.

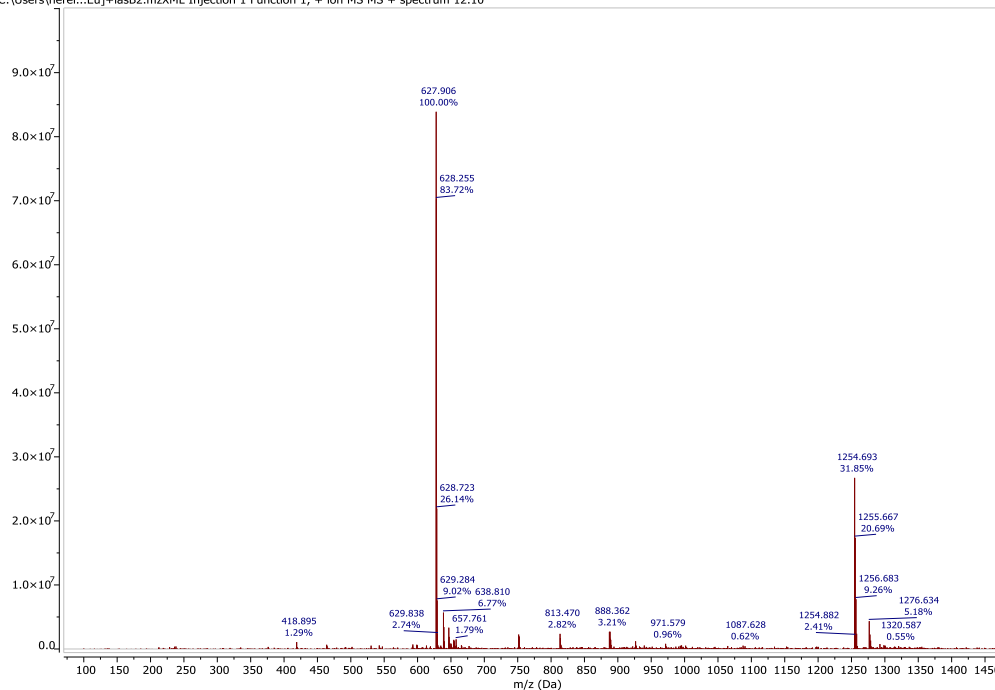


Figura 30. ESI-MS do HPLC para o pico a $t_R = 12.1$ min correspondente ao sensor em presença do sobrenadante que contém a enzima mutada LasB2.