



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

*Síntese de ferramentas peptídicas para o estudo de estrés
oxidativo en mitocondria*

*Síntesis de herramientas peptídicas para el estudio de estrés
oxidativo en mitocondria*

*Synthesis of peptide tools for the study of oxidative estress on
mitochondria*

Directores: Marcos Daniel García Romero

Elena Pazos Chantrero

ANTÍA PINTOR LABANDEIRA

Curso: 2018/2019 – Convocatoria: xuño

AGRADECEMENTOS:

Quero dar as grazas aos meus titores, Dra. Elena Pazos Chantrero e Dr. Marcos D. García Romero, por darme a oportunidade de formar parte deste proxecto e o seu apoio e axuda constante.

Grazas a Arturo, por todo o que me ensinaches, polos bos momentos e sobre todo por transmitir tanta paixón.

Grazas a Pablo, por ensinarme e facer que todo pareza fácil.

Grazas tamén a Iago e a Paula, por axudarme sempre que o necesitei.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
CONTEXTUALIZACIÓN DO TFG.....	6
INTERESE DA SÍNTESE DE SONDAS MITOCONDRIAIS.....	7
DESEÑO E ESTRUTURA DE SONDAS MITOCONDRIAIS.....	9
VECTORES MITOCONDRIAIS.....	10
SUBUNIDADES XERADORAS-SINALIZADORAS DE ROS.....	12
SÍNTESE DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS).....	13
OBJECTIVOS.....	17
RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	18
SÍNTESE E CARACTERIZACIÓN DO VIOLÓXENO 1·3Br.....	18
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DAS SALES 3·2Br E 1·3Br.....	19
DESEÑO E SÍNTESE DO PÉPTIDO.....	26
ACOPLAMENTO DE VIOLÓXENO E PÉPTIDO.....	27
EXPERIMENTAL.....	32
XERAL.....	32
SÍNTESE EN DISOLUCIÓN.....	33
SÍNTESE EN FASE SÓLIDA.....	34
CONCLUSIÓNS.....	39
CONCLUSIONES.....	40
CONCLUSIONS.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXO.....	43

COMPOSTO 3 ·2Br	43
COMPOSTO 1 ·3Br	48
COMPOSTO 2 ·3TFA.....	53

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ACN	acetonitrilo
ATP	adenosín trifosfato
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Bzl	benciloxicarbonil
CB[8]	cucurbit[8]urilo
COSY	espectroscopia de correlación homonuclear
¹³C-RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono
δ	desplazamiento químico
d	doblete
DCM	diclorometano
DEPT	mellora sen distorsión por transferencia de polarización
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
ESI-MS	espectrometría de masas con ionización por electroespray
eq	equivalentes
Et₂O	dielil éter
EtOH	etanol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FO	fosforilación oxidativa
HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HF	ácido fluorhídrico
HMBC	correlación de enlace múltiple heteronuclear
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
¹H-RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón
HSQC	correlación heteronuclear de un único cuanto
J	constante de acoplamiento
m	multiplete
MeOH	metanol
m/z	relación masa- carga
³¹P-RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear de fósforo
ROS	especies osixenadas reactivas
SPPS	síntese de péptidos en fase sólida

SSp	péptidos Szeto-Schiller
t	triplete
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -butil
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	triisopropilsilano
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico
TPP	trifenilfosfonio
t_R	tempo de retención

RESUMO

Neste proxecto búscase combinar a química supramolecular e a química biolóxica para a preparación dunha sonda con diana mitocondrial mediante o acoplamento de un violóxeno (derivado de 4,4'-bipiridinio) a un péptido.

Para este propósito, preparouse un precursor peptídico mediante a metodoloxía de síntese de péptidos en fase sólida empregando a estratexia Fmoc. Posteriormente este modificouse por acoplamento con un violóxeno sintetizado seguindo metodoloxías sintéticas en disolución ben establecidas. Dito acoplamento entre ambas unidades levouse a cabo en fase sólida, empregando o extremo *N*-terminal do péptido e o grupo carboxilo do violóxeno como puntos de unión.

As técnicas empregadas para o seguimento das reaccións e caracterización dos produtos foron RMN mono e bidimensional e HPLC-MS. Empregouse HPLC semipreparativo para a purificación do conxugado péptido-violóxeno.

Palabras chave: química supramolecular, química biolóxica, sondas mitocondriais, síntese de péptidos en fase sólida, conxugados péptido-violóxeno.

RESUMEN

En este proyecto se busca combinar la química supramolecular y la química biológica para la preparación de una sonda con diana mitocondrial mediante el acoplamiento de un viológeno (derivado de 4,4'-bipiridinio) a un péptido.

Para este propósito, se preparó un precursor peptídico mediante la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida empleando la estrategia Fmoc. Posteriormente este fue modificado por acoplamiento con un viológeno sintetizado siguiendo metodologías sintéticas en disolución bien establecidas. Dicho acoplamiento entre ambas unidades se llevó a cabo en fase sólida, empleando el extremo *N*-terminal del péptido y el grupo carboxilo del viológeno como puntos de unión.

Las técnicas empleadas para el seguimiento de las reacciones y caracterización de los productos fueron RMN mono y bidimensional y HPLC-MS. Se empleó HPLC semipreparativo para la purificación del conjugado péptido-viológeno.

Palabras clave: química supramolecular, química biológica, sondas mitocondriales, síntesis de péptidos en fase sólida, conjugados péptido-viológeno.

ABSTRACT

This project pretends to combine supramolecular and biological chemistries for the preparation of a mitochondrial labelled probe through the coupling between a viologen (4,4'-bipyridinium derivative) and a peptide.

For this purpose, a peptidic precursor was synthesized through the solid-phase peptide synthesis methodology following the Fmoc strategy. Then, this peptide was modified with the viologen unit, synthesized following well established synthetic methodologies. This coupling between both units was performed in solid phase, using the *N*-terminal end from the peptide and the carboxy group from the viologen as linking points.

Mono and bidimensional NMR and HPLC-MS were techniques used for following the reactions and to characterize the products. Semipreparative HPLC was used for the purification of the peptide-viologen conjugate.

Keywords: supramolecular chemistry, biological chemistry, mitochondrial probes, solid phase peptide synthesis, peptide-viologen conjugates.

INTRODUCCIÓN

CONTEXTUALIZACIÓN DO TFG.

O presente TFG inclúese dentro dun proxecto de investigación máis amplo centrado no uso de interruptores supramoleculares como sondas de especies osixenadas reactivas (ROS) na mitocondria. Na **Figura 1**, recóllese brevemente a aproximación que, de forma moi resumida, pretende aproveitar a química receptor-substrato cucurbit[8]urilo-violóxeno para a preparación de estruturas de tipo [2]-rotaxano. Á súa vez, estas servirían para a preparación de complexos de inclusión ternarios con fluoróforos adecuados, dando lugar a agregados supramoleculares capaces de transducir un cambio no seu estado redox nun sinal óptico.

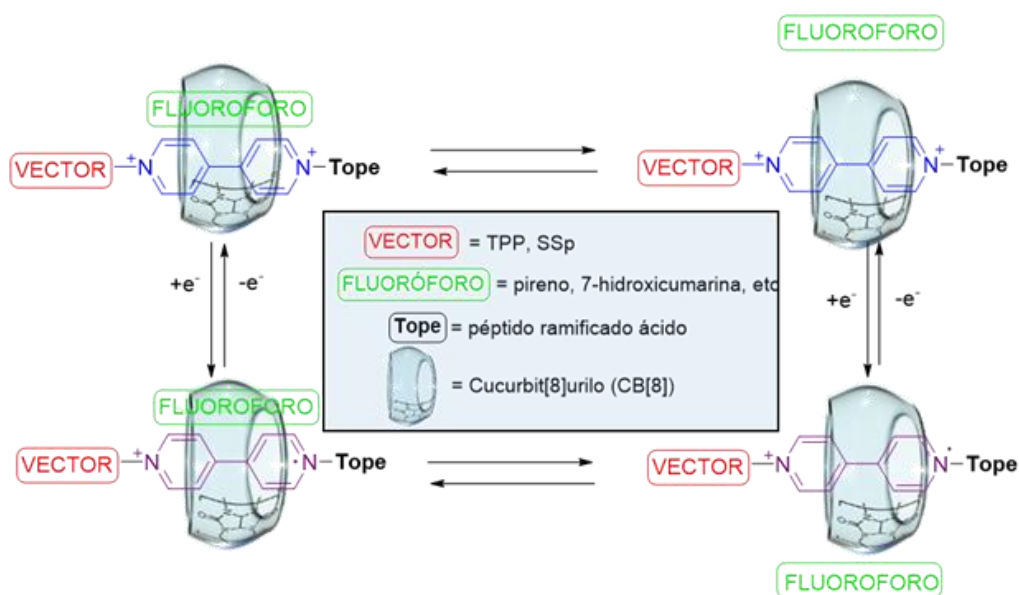


Figura 1. Representación esquemática do desenvolvemento de sondas fluorescentes de procesos redox baseadas en complexos ternarios CB[8]/violóxeno/fluoróforo.

Segundo o mostrado, o ensamblaxe supramolecular constaría do receptor CB[8] como “roda” dun [2]-rotaxano, mentres que o “fío” ou “eixo” consistiría nun violóxeno asimetricamente substituído por dúas subunidades voluminosas capaces de actuar como “topes” das moléculas mecanicamente entrelazadas propostas. Así, a estrutura de [2]-rotaxano sería capaz de recoñecer fluoróforos de natureza adecuada, dando lugar ao ensamblaxe supramolecular funcional. De esta forma, o trifenilfosfonio (TPP) garantiría a potencial acumulación da sonda na mitocondria, onde a redución monoelectrónica da subunidade de violóxeno levaría consigo a xeración de ROS. Ademais, os cambios nesta subunidade terían potencialmente outras dúas consecuencias na ensamblaxe supramolecular. Así, o fluoróforo atoparíase inicialmente apagado polo efecto da transferencia de carga ao dicatión, formando un complexo heteroternario co CB[8]. Unha vez se producise a redución, a transferencia electrónica

entre dador e aceptor veríase fortemente diminuída, provocando a saída do fluoróforo do interior do CB[8] e a restitución da súa emisión.

Neste contexto, e como se verá na sección de obxectivos, o presente TFG centrarase na síntese dun dos potenciais “fíos” moleculares propostos para a síntese de [2]-rotaxanos con CB[8]. Por esta razón, e por motivos de espazo, discutiránse na presente introdución só aqueles aspectos máis relevantes referidos á importancia do estudo de ROS mitocondrial e ó deseño de sondas para dito estudo. Do mesmo xeito, tamén se introducirán aspectos relevantes da síntese en fase sólida de péptidos, metodoloxía usada para a preparación da molécula obxectivo.

INTERESE DA SÍNTESE DE SONDAS MITOCONDRIAIS

As mitocondrias desempeñan un papel crucial na xeración de enerxía metabólica nas células eucariotas. Son responsables da xeración da maior parte da enerxía útil derivada da degradación de carbohidratos e ácidos graxos, que é convertida en ATP mediante o proceso de fosforilación oxidativa (FO).

Estes orgánulos están rodeados dun sistema de dobre membrana, constituído por unha membrana mitocondrial interna e outra externa, separadas por un espazo intermembrana (**Figura 2**). A membrana interna forma numerosos pregos (crestas), que se estenden cara ao interior (matriz) do orgánulo.

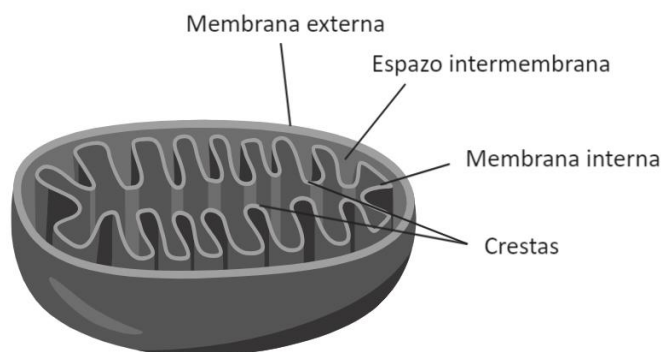


Figura 2. Estrutura da mitocondria. Creado con Biorender: <https://biorender.com/>.

A membrana mitocondrial interna representa o lugar principal de xeración de ATP, e este papel fundamental refléxase na súa estrutura. Primeiro, o incremento da súa superficie mediante o seu pregamento en crestas aumenta a área superficial. Ademais, a membrana interna contén unha proporción moi elevada de proteínas (máis do 70%), que interveñen tanto na FO coma no intercambio de metabolitos co citosol. Por outra parte, a membrana interna é impermeable á maioría de ións e moléculas pequenas, unha propiedade crítica para manter o gradiente de protóns que dirixe a FO.

Por outra banda, a membrana mitocondrial externa é completamente permeable a moléculas de pequeno tamaño, debido á presenza de pequenas proteínas denominadas porinas, que forman canles que permiten a difusión libre de moléculas menores de 1000 daltons.¹

Durante a FO a enerxía liberada resultado do transporte de electróns emprégase para bombear protóns dende a matriz mitocondrial cara ao espazo intermembranal a través dos complexos I, III e IV (**Figura 3**). Isto establece un gradiente de protóns a través da membrana interna, onde a enerxía almacenada úsase para a síntese de ATP polo complexo V (ATP sintasa).

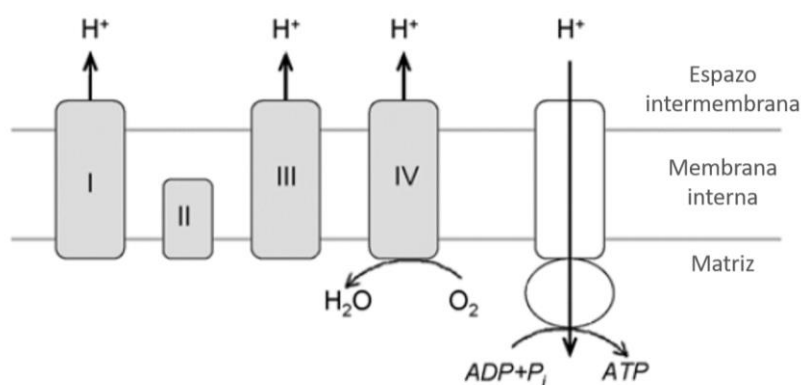


Figura 3. Cadea de transporte de electróns e síntese de ATP na membrana mitocondrial interna.²

Normalmente, o osíxeno é o aceptor da cadea de transporte de electróns, reducíndose a auga. Sen embargo, baixo determinadas condicións nas que os electróns poden “saír” da cadea de transporte de electróns, o osíxeno pode tamén reducirse a ión superóxido (O₂^{•-}), que é transformado a peróxido de hidróxeno (H₂O₂) por enzimas localizadas na matriz ou no espazo intermembranal. Ademais, en presenza de metais de transición reducidos, o H₂O₂ pode transformarse no radical hidroxilo HO[•] a través da reacción de Fenton, radical que á súa vez pode reaccionar novamente con bicarbonato para dar lugar ao anión radical carbonato (CO₃^{•-}). O O₂^{•-} tamén pode reaccionar con outros radicais libres, como o óxido nítrico NO[•] xerando o peroxinitrito (ONOO⁻), un anión altamente reactivo. Estas e outras especies derivadas agrúpanse baixo o nome de especies reactivas de osíxeno (ROS).

O H₂O₂ pode difundir libremente a través da membrana mitocondrial cara ao citosol pero, sen embargo, outros radicais como o O₂^{•-} e o HO[•] quedan retidos no interior da mitocondria, podendo causar danos nos ácidos nucleicos, proteínas e lípidos. O ADN mitocondrial é máis vulnerable que o nuclear ao dano oxidativo, pola súa proximidade ao lugar de xeración de ROS e pola falta de histonas. Tamén é especialmente susceptible a cardiolipina, o fosfolípido maioritario da membrana mitocondrial interna.

A formación de certa taxa de radicais libres é un proceso normal e inevitable que en condicións normais non causan dano oxidativo, xa que a célula conta con mecanismos antioxidantes de protección. Neste contexto, o estrés oxidativo defínese como unha alteración do equilibrio entre as especies prooxidantes e as antioxidantes, que como resultado produce un dano oxidativo que modifica diversas funcións fisiolóxicas.³

O mal funcionamento das mitocondrias, así como o estrés oxidativo, están relacionados co envellecemento e coa aparición de enfermidades neurodexenerativas como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermidade de Huntington e ataxia de Friedrich.² A mitocondria é a principal fonte de ROS intracelular, e ao mesmo tempo é moi vulnerable ao estrés oxidativo, de xeito que a medida que aumenta a concentración de ROS dentro da mitocondria diminúe a súa funcionalidade o que provoca unha maior síntese de ROS, dando lugar a un ciclo de retroalimentación positiva. A redución do estrés oxidativo mitocondrial pode previr ou desacelerar a progresión das enfermidades mencionadas anteriormente, por iso resulta lóxico deseñar axentes antioxidantes con diana mitocondrial. Tamén se destaca a importancia do desenvolvemento de metodoloxías de imaxe non invasoras que permitan a monitorización en tempo real da xeración, acumulación e consumo de ROS nas mitocondrias en células vivas para poder dilucidar o mecanismo subxacente ás patoloxías mencionadas.

DESEÑO E ESTRUTURA DE SONDAS MITOCONDRIAIS

Nos últimos anos véñense deseñando sondas mitocondrias como axentes antioxidantes e como indicadores do estado redox da mitocondria. Aínda que son variadas as estratexias a seguir, unha das máis comúns é a síntese de sondas con tres subunidades: unha secuencia de internalización na mitocondria (vector), unha subunidade moduladora de ROS e unha terceira subunidade que sinalice o proceso de produción/inhibición das especies oxidantes (**Figura 4**).⁴

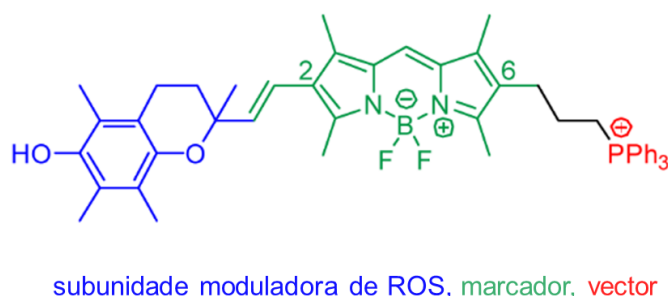


Figura 4. Exemplo de estrutura dunha sonda mitocondrial con carácter antioxidante (Mito-Bodipy-TOH). As distintas cores marcan os tres segmentos diferentes que forman a sonda. ⁴

VECTORES MITOCONDRIAIS

A estrutura da mitocondria fai que sexa un orgánulo difícil de manipular farmacoloxicamente. O sistema de dobre membrana, altamente hidrófobo e denso, conta cun potencial de membrana interno moi negativo (aproximadamente -180 mV), o que constitúe unha barreira que impide o paso de moitos compostos bioactivos. Por isto, os vectores con diana mitocondrial deben ser deseñados en base a ditas limitacións.

Unha estratexia moi empregada a este respecto é a da unión covalente mediante unha cadea alquílica de moléculas bioactivas ao catión trifenílfosfonio (TPP), que aumenta adicionalmente o carácter lipófilo da sonda facilitando a súa inserción na mitocondria. A deslocalización da carga positiva a través da superficie hidrófoba do TPP, aumenta a permeabilidade destes catións permitindo a difusión a través das bicapas lipídicas. Debido aos potenciais de membrana negativos, tanto da membrana citoplásmica como da mitocondrial, estes compostos acumúlanse na matriz mitocondrial en altas concentracións (**Figura 5**). Esta asimilación selectiva aumenta a especificade e a eficacia das moléculas deseñadas, ao mesmo tempo que se minimizan as reaccións secundarias.⁵

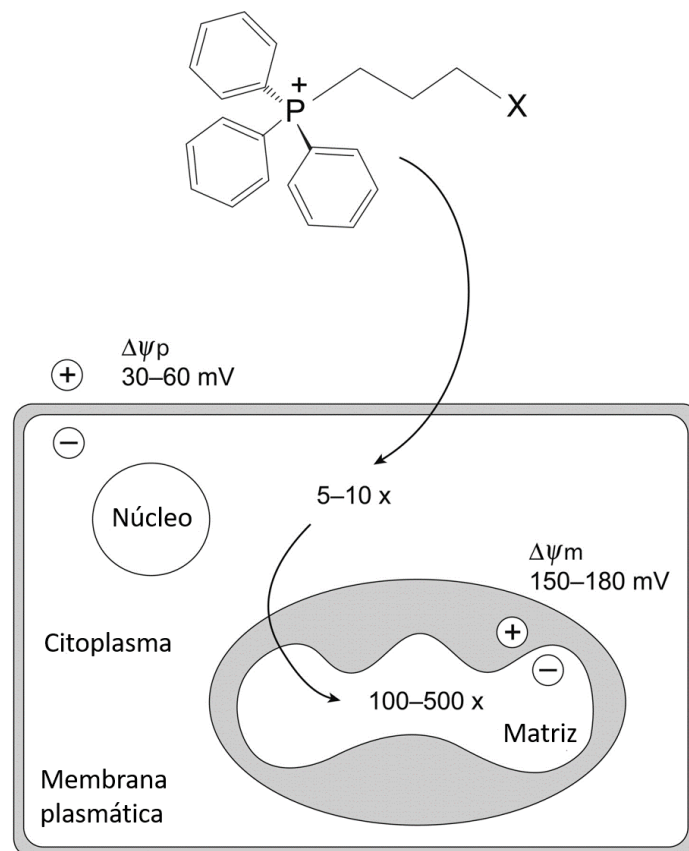


Figura 5. Paso a través das membranas do TPP unido a unha molécula bioactiva (X). Como resultado dos potenciais de membrana ($\Delta\psi_p$) e membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), con respecto a X, o catión acumúlase de 5-10 veces máis no citoplasma dende o espazo extracelular, e no interior da mitocondria entre 100-500 veces máis.⁵

O TPP presenta unha serie de vantaxes respecto a outras alternativas, xa que sinteticamente é relativamente sinxelo unilo ao composto de interese, simplemente por desprazamento dun grupo saínte empregando trifenilfosfina como nucleófilo ao final da ruta sintética. Mediante esta estratexia pódense obter unha ampla variedade de compostos con actividade antioxidante mitocondrial, ou por extensión sondas que reflexen o estado de oxidación do orgánulo (**Figura 6**). Ademais, o catión TPP presenta outras vantaxes, como elevada estabilidade e pouca reactividade nos sistemas biolóxicos, resultando nunha toxicidade relativamente baixa.

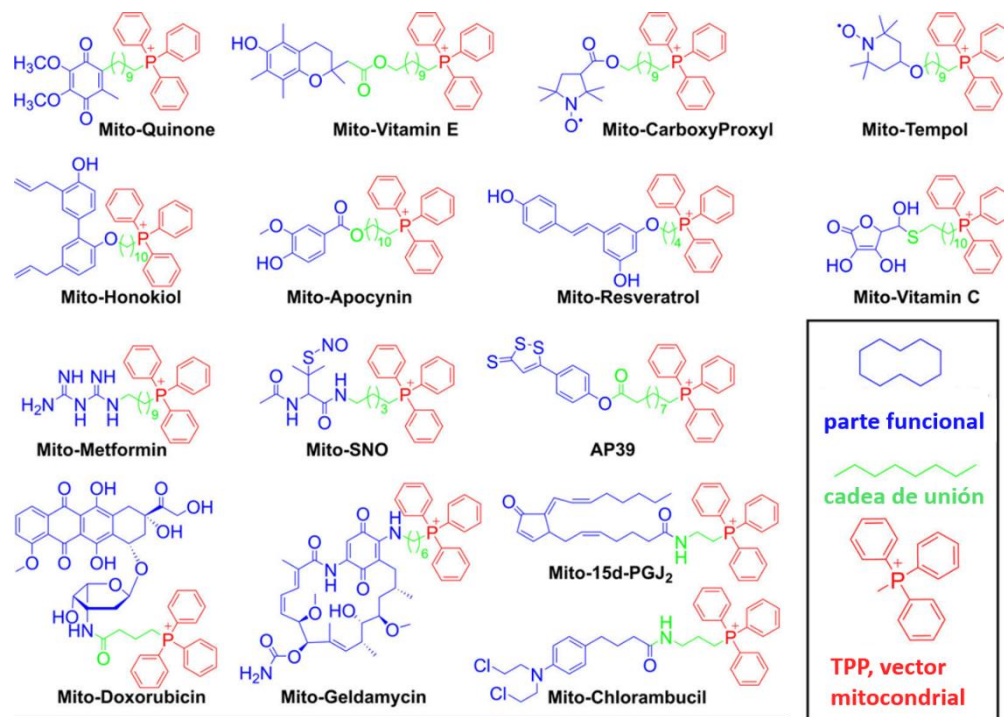


Figura 6. Algúns exemplos de posibles conjugados empregando TPP como vector. As distintas cores representan cada unha das partes da molécula: en azul a parte funcional, en verde a cadea alquílica de unión e en vermello o TPP como vector mitocondrial.⁶

Estes compostos teñen un elevado potencial como terapias antioxidantes. Por exemplo, o MitoVitE concéntrase na mitocondria arredor de 80 veces máis que a propia vitamina E, resultando máis efectivo na protección da mitocondria contra o estrés oxidativo.⁷

Unha alternativa ao TPP como vector mitocondrial é o uso de péptidos con diana mitocondrial. Os primeiros péptidos deste tipo foron os péptidos Szeto-Schiller (SSp), que ademais de acumularse na matriz mitocondrial presentan de forma intrínseca actividade antioxidante, debido á presenza dun residuo de dimetil tirosina que funciona como subunidade moduladora de ROS (**Figura 7**). O motivo estrutural do vector, neste caso, consiste na alternancia de residuos aromáticos e aminoácidos básicos. A pH fisiolóxico os SSp teñen carga positiva +3, uníndose rapidamente á mitocondria mediante un proceso que é independente do potencial de membrana, e que ademais

non se ve afectado dun xeito significativo ao producirse a rotura física da membrana. Isto suxire que estes péptidos únense selectivamente á membrana mitocondrial interna en vez de acumularse na matriz, aínda que a natureza desta interacción é incerta. O proceso de transporte a través da membrana plasmática consiste nunha difusión directa a través da bicapa lipídica e trátase por tanto dun proceso non saturable.⁸

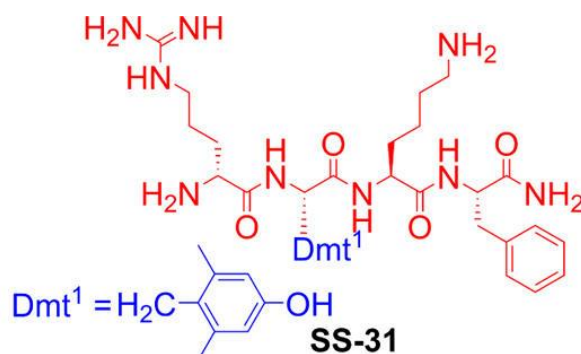


Figura 7. Exemplo de péptido tipo Szeto-Schiller con diana mitocondrial.⁶

Algunhas das vantaxes que presentan os péptidos fronte a outras alternativas son a súa fácil síntese e facilidade para funcionalizalos con residuos orgánicos.

SUBUNIDADES XERADORAS-SINALIZADORAS DE ROS

A subunidade moduladora de ROS e a subunidade marcadora do proceso de produción/inhibición das especies oxidantes poden estar unidas covalentemente. Así, por exemplo, a resposta dun fluoróforo como unidade sinalizadora pode cambiar dependendo do estado de oxidación da molécula (**Figura 8**). Baixo situacións de estrés oxidativo, ou bloqueo da fosforilación oxidativa, prodúcese un cese do transporte de electróns na membrana interna mitocondrial, o que provoca un exceso de electróns nos complexos I, III e V, e a conseqüente redución da molécula empregada como sonda.

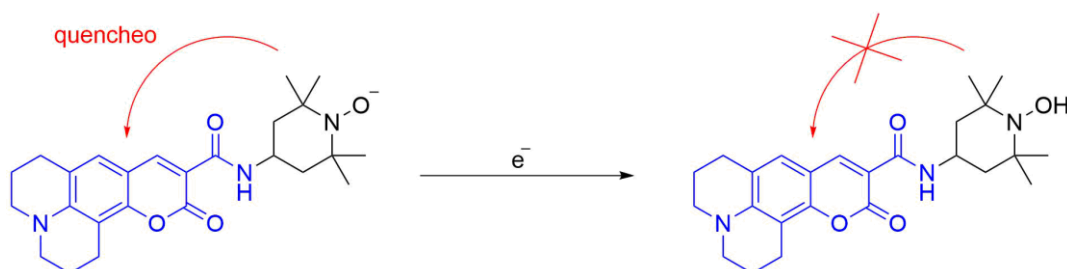


Figura 8. Exemplo de sonda fluorescente. En estado oxidado non se emite fluorescencia, ao reducirse prodúcese a emisión.⁹

No que se refire a moléculas capaces da xeración de ROS, e no contexto do presente TFG, os violóxenos son derivados *N,N'*-disubstituídos de 4,4'-bipiridina (V^{2+} , **Figura 9**).¹⁰ Os V^{2+} son aceptores electrónicos debido ao seu carácter π -deficiente e, ademais, compórtanse como interruptores moleculares redox, debido á reversibilidade e accesibilidade das súas reducións mono- e dielectrónicas ($V^{2+} + e^- \rightleftharpoons V^+ + e^- \rightleftharpoons V$). Dita

capacidade ten feito que compostos de tipo V^{2+} teñan sido utilizados como unidades xeradoras de ROS na mitocondria.¹¹

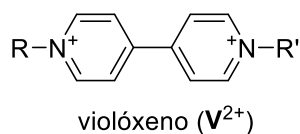


Figura 9. Estrutura xeral dos violóxenos.

Outra característica interesante dos violóxenos, que os fai bos candidatos para a súa implementación en sondas de fluorescencia, é o feito de que se comporten como potentes aceptores π .¹² Así, son capaces de formar complexos de transferencia de carga con compostos dadores π , os cales ven apagada a súa fluorescencia, de posuíla, debido á transferencia de carga. De forma crucial, dita transferencia de carga vese moi diminuída cando se produce a redución $V^{2+} + e^- \rightleftharpoons V^+$ o que provoca a ruptura reversible e controlable do complexo de transferencia de carga e polo tanto a recuperación da emisión do compoñente dador π .

SÍNTESE DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS)

Dende a súa introdución por Merrifield en 1963,¹³ a síntese de péptidos en fase sólida (SPPS) converteuse no método máis empregado para a obtención de péptidos dunha maneira rápida e eficiente. Así, nesta metodoloxía prodúcese a adición secuencial de α -aminoácidos convenientemente protexidos a unha resina polimérica que actúa como soporte. A resina está unida a través de un conector ou espaciador ao extremo C-terminal do aminoácido, polo que a elongación do péptido prodúcese do extremo C-terminal ao N-terminal.¹⁴ En cada acoplamento fórmase un enlace amida entre o extremo N-terminal da cadea peptídica unida á resina e un novo aminoácido.

O soporte polimérico usado inflúe claramente na SPPS, principalmente en función da súa capacidade para solvatar e permitir desta forma un acceso eficiente dos reactivos aos substratos inmovilizados na resina. Do mesmo xeito, é tamén de gran importancia o conector ou espaciador, que proporciona: 1) unha unión reversible entre o péptido sintético e a resina, 2) protección do extremo C-terminal durante a síntese e, 3) determina a funcionalización de dito extremo ao finalizar a síntese.

Para que se poidan levar a cabo os acoplamentos de maneira efectiva, as cadeas laterais dos aminoácidos protéxense durante toda a síntese, empregando para elo grupos protectores que non se vexan afectados polas condicións dos acoplamentos. Así, os aminoácidos vanse engadindo co seu grupo amino protexido temporalmente, e a desprotección deste realízase antes da seguinte etapa de acoplamento (**Figura 10**).

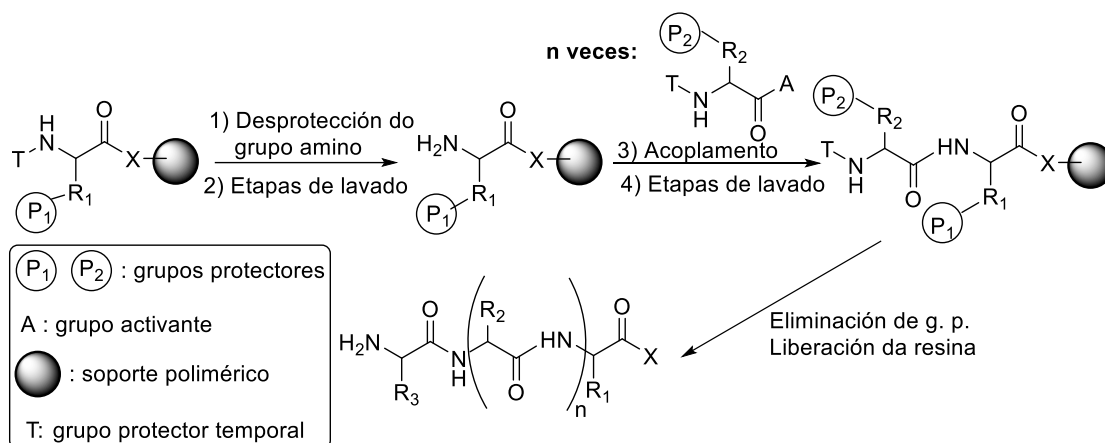


Figura 10. SPPS: P_1 e P_2 son os grupos protectores das cadeas laterais dos aminoácidos. T é o grupo protector temporal empregado no extremo N-terminal.

En base á combinación dos grupos protectores empregados podemos diferenciar dúas metodoloxías diferentes: Boc/Bzl e Fmoc/*t*-Bu. A primeira delas utiliza o grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) para a protección temporal do grupo α -amino dos aminoácidos, e grupos do tipo bencilo (Bzl), para protexer as cadeas laterais. Ambos grupos se desprotexen con medio ácido, pero mentres que o Boc o fai por tratamento con TFA diluído, o Bzl precisa condicións máis agresivas, como HF (**Figura 11**).

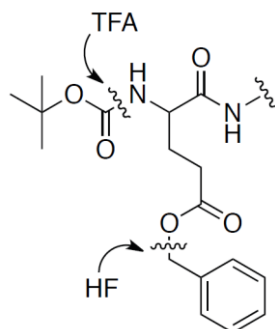


Figura 11. Rotura dos grupos protectores Boc e Bzl con TFA e HF, respectivamente.

A segunda estratexia, Fmoc/*t*-Bu fai uso do grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como grupo protector do α -amino, e os grupos *tert*-butil (*t*-Bu) para as cadeas laterais. O grupo Fmoc desprotéxese en medio básico con piperidina e o Fmoc por tratamento con TFA (**Figura 12**).¹⁵

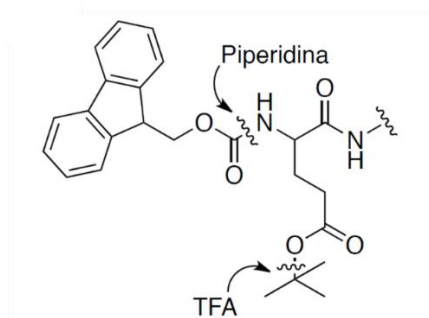


Figura 12. Rotura dos grupos protectores Fmoc e t-Bu con piperidina e TFA, respectivamente.

A estratexia Fmoc/*t*-Bu presenta unha serie de vantaxes fronte á outra alternativa que a fan máis convinte para a maioría de sínteses. O tratamento continuado con TFA para a desprotección do extremo *N*-terminal, que require a estratexia Boc/Bzl, pode ocasionar problemas nas cadeas laterais sensibles dos aminoácidos, mentres que na estratexia Fmoc/*t*-Bu dito extremo desprotéxese baixo condicións suaves, usando piperidina, que non afecta as cadeas laterais dos aminoácidos, sendo necesario o TFA unicamente para a desprotección final. Ademais coa estratexia Boc/Bzl a desprotección final require uso de HF, que é altamente perigoso.

No tocante á formación do enlace amida entre os aminoácidos, é necesario activar o grupo carboxilo dun deles. Así, existen fundamentalmente catro formas distintas de levar a cabo dita activación: carbodiimidas, anhídridos de ácido, ésteres activados e ésteres activados formados *in situ*. A formación de ésteres activados *in situ*, mediante un axente acoplante en medio básico, é o método máis importante (**Figura 13**), debido á súa facilidade de uso, con reaccións limpas e rápidas. Os ésteres activados degrádanse en presenza de DIEA (base máis utilizada en SPSS), polo que a activación tense que realizar xusto antes do acoplamento.

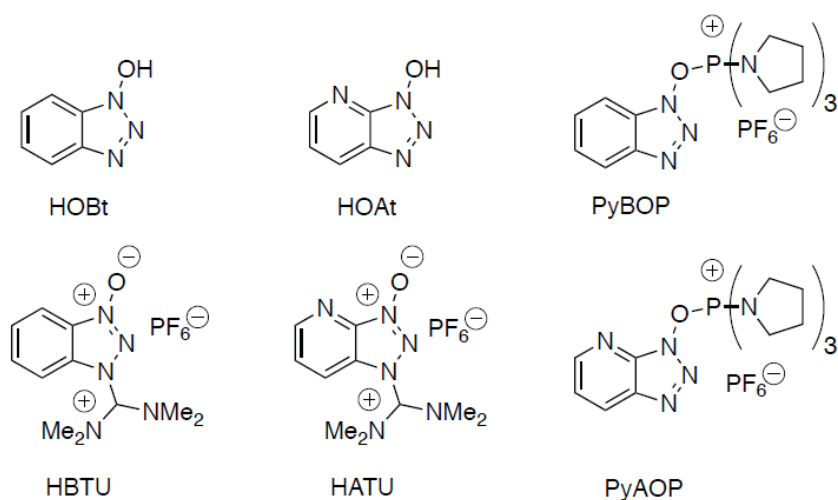


Figura 13. Exemplos de axentes de acoplamento.

No que se refire ao mecanismo da reacción de activación, este exemplifícase a continuación para o HBTU (**Figura 14**):

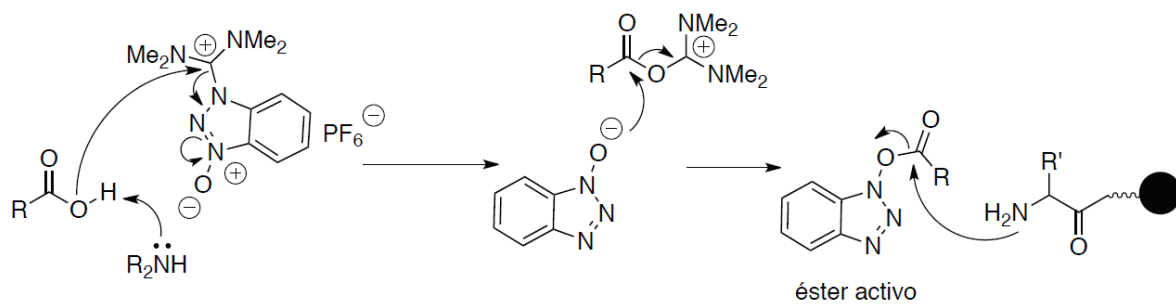


Figura 14. Activación dun ácido, formación in situ do éster activo e acoplamento.

OBXECTIVOS

Dentro do proxecto de investigación exposto na introdución, o presente TFG ten como obxectivo xeral a síntese dun dos compoñentes dun interruptor supramolecular como sonda de ROS mitocondrial. En particular, propónse a preparación dun híbrido vector-violóxeno-péptido (**2·3TFA**, **Figura 17**), que poida servir nun futuro para a súa implementación como eixo en estruturas tipo [2]-rotaxano. Os obxectivos concretos do presente traballo de fin de grao son:

1. Síntese do violóxeno asimétrico **1·3Br**.

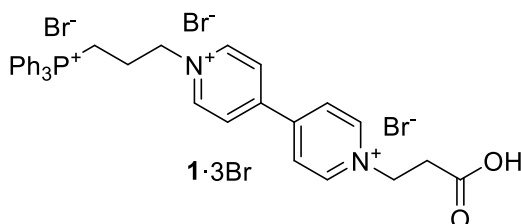


Figura 15. Estrutura do violóxeno asimétrico 1·3Br.

2. Caracterización estrutural do composto **1·3Br**, e os seus intermedios sintéticos, mediante ESI-MS de baixa e alta resolución, e RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono- e bidimensional.
3. SPPS do péptido H-LEE-® (® representa o soporte polimérico).

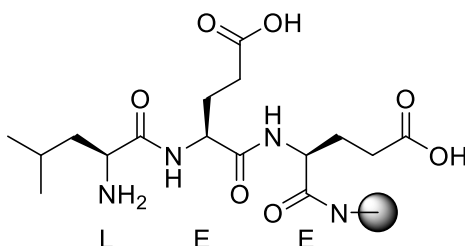


Figura 16. Estrutura do péptido de interese H-LEE-®.

4. Unión das dúas unidades **1·3Br** e H-LEE-® mediante un acoplamento peptídico en fase sólida, desanclaxe do híbrido da resina, illamento e purificación mediante HPLC, e caracterización estrutural mediante ESI-MS e RMN de **2·3TFA**.

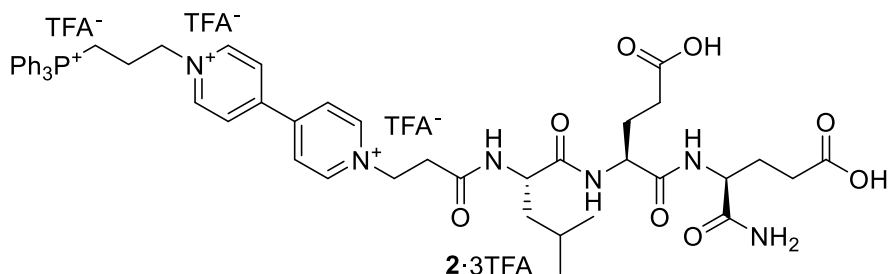


Figura 17. Estrutura do derivado péptido-violóxeno con diana mitocondrial.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

SÍNTESE E CARACTERIZACIÓN DO VIOLÓXENO 1·3Br

No referido ao primeiro obxectivo proposto para este TFG, a síntese do violóxeno planeouse mediante substitución nucleófila de 4,4'-bipiridina con electrófilos adecuados (**Figura 18**). Así, en primeiro lugar propónse a adición da cadea alquílica co trifenilfosfonio, e a partir do produto resultante engádesse a cadea alquílica co grupo ácido.

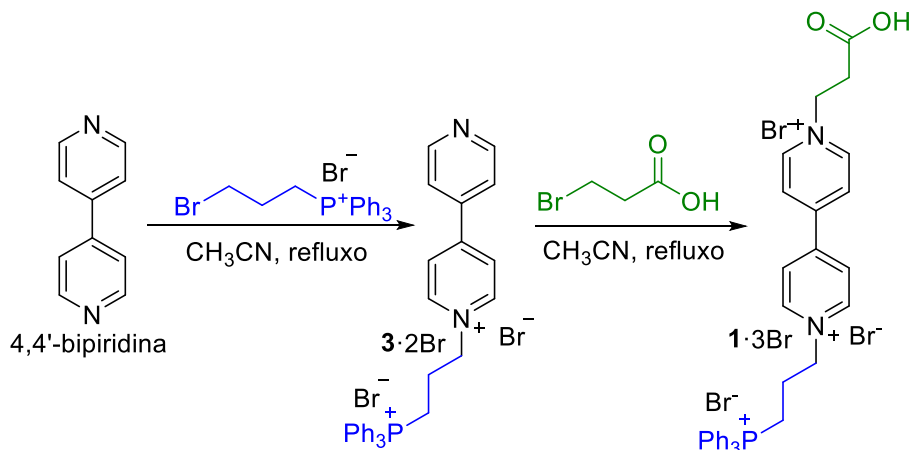


Figura 18. Síntese do violóxeno a partir de 4,4'-bipiridina. En cores aparecen marcadas as dúas partes engadidas por substitución nucleófila.

Segundo o exposto, o composto **3·2Br** foi sintetizado con éxito obtendo un rendemento do 91% mediante substitución nucleófila entre os produtos comerciais bromuro de (3-bromopropil)trifenilfosfonio e 4,4'-bipiridina en acetonitrilo a refluxo. Despois de 96 horas, a mestura de reacción deixouse arrefriar ata temperatura ambiente, e o produto precipitouse con éter (Et₂O), posteriormente separouse mediante filtración ao baleiro e lavouse con Et₂O. Obtívose así o composto **3·2Br** virtualmente puro e con datos espectroscópicos (¹H-RMN, ³⁵P-RMN) coincidentes cos descritos na bibliografía.¹¹

De xeito similar, o composto **1·3Br** obtívose cun rendemento do 74% mediante substitución nucleófila do composto **3·2Br** co ácido 3-bromopropiónico comercial en acetonitrilo a refluxo. Tras 48 horas fórmase un abundante precipitado no seno da disolución, o cal se separa mediante filtración ao baleiro e lávase con Et₂O. O sólido de cor amarela caracterizouse completamente mediante técnicas espectroscópicas.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DAS SALES 3·2Br E 1·3Br

No contexto da caracterización estrutural dos compostos 3·2Br e 1·3Br, a súa simplicidade permite a familiarización coa utilización estendida de técnicas de RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ mono- e bidimensional (COSY, HSQC, HMBC) así como RMN de ^{31}P para a elucidación estrutural e asignación dos diversos núcleos presentes nos mencionados compostos. Do mesmo xeito, a espectrometría de masas permite tamén a elucidación estrutural de este tipo de sales dunha forma sinxela, ben a través do achado de picos monoisotópicos con relación masa/carga (m/z) coincidentes cos calculados para a molécula ou fragmentos da mesma, ou por comparación das distribucións isotópicas de estes picos cos teóricos. Así, propúxose como un dos obxectivos do presente TFG a familiarización da autora de esta memoria con estas técnicas de elucidación estrutural avanzada. Os resultados obtidos pásanse a discutir a continuación.

Comézase por facer unha asignación inicial dos sinais dos RMN monodimensionais.

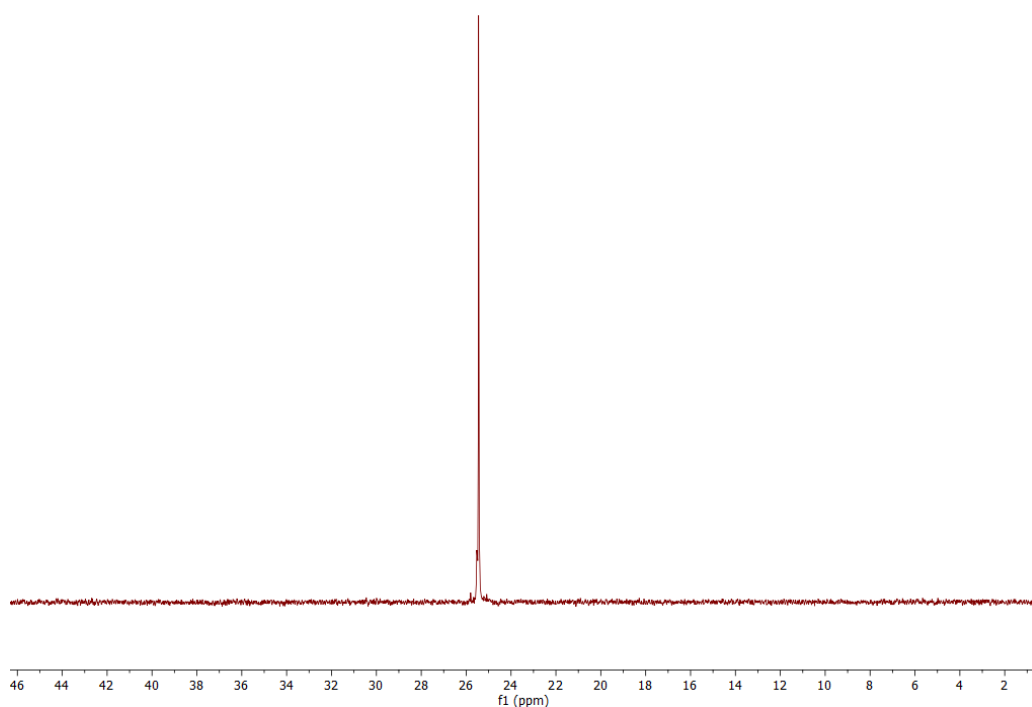


Figura 19. Espectro de ^{31}P -RMN. Confírmase que se produciu a unión do TPP.

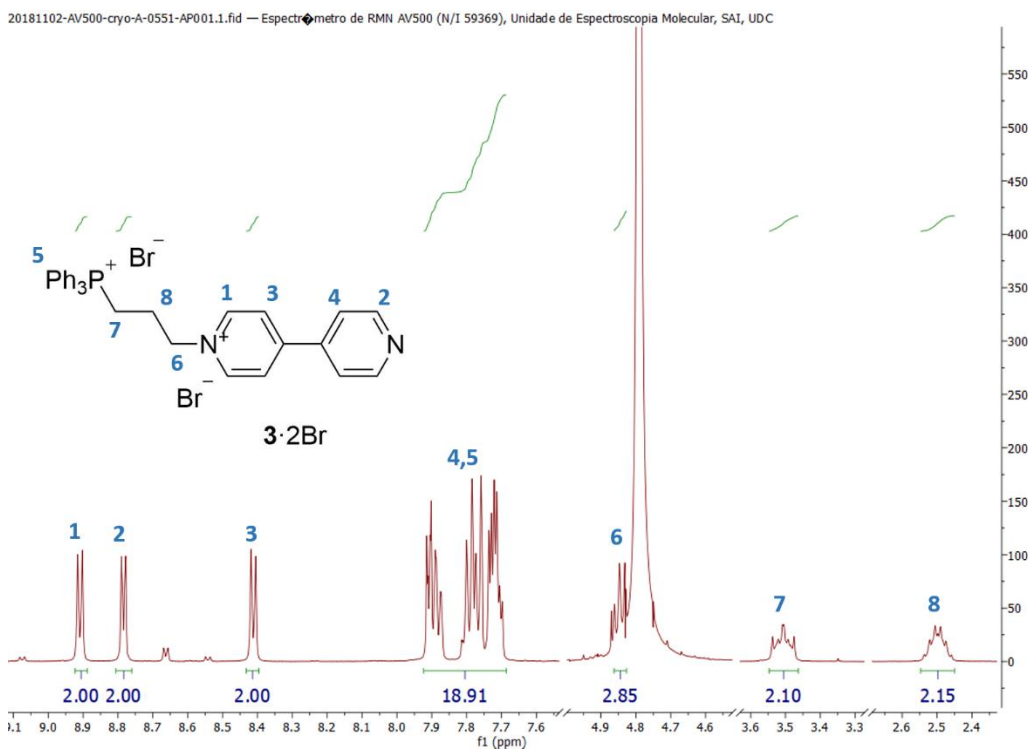


Figura 20. Espectro e asignación dos sinais do ^1H -RMN. Os números separados por comas (,) indican que hai solapamento entre os sinais, que se integran como un pero corresponden a dous. Os protóns do TPP inclúense dentro do mesmo sinal, non se fai diferenciación entre eles.

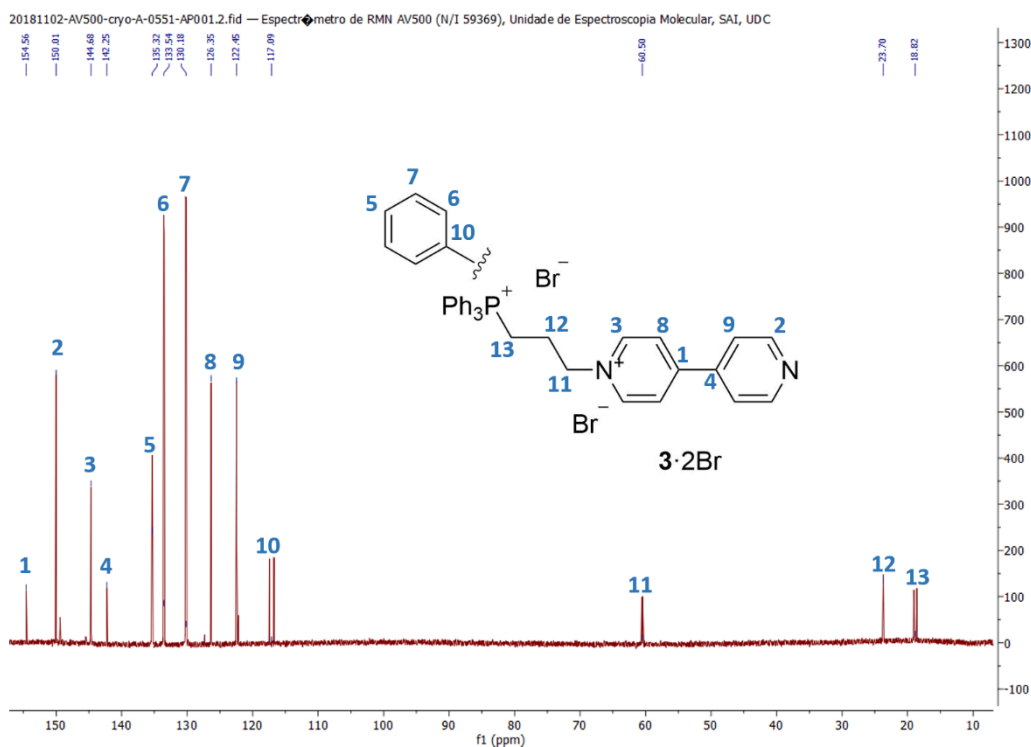


Figura 21. Espectro e asignación dos sinais do ^{13}C -RMN. Faíse a asignación en base á información aportada polo DEPT (ver Anexo) e aos desprazamentos químicos observados.

A continuación faíse a análise dos espectros bidimensionais.

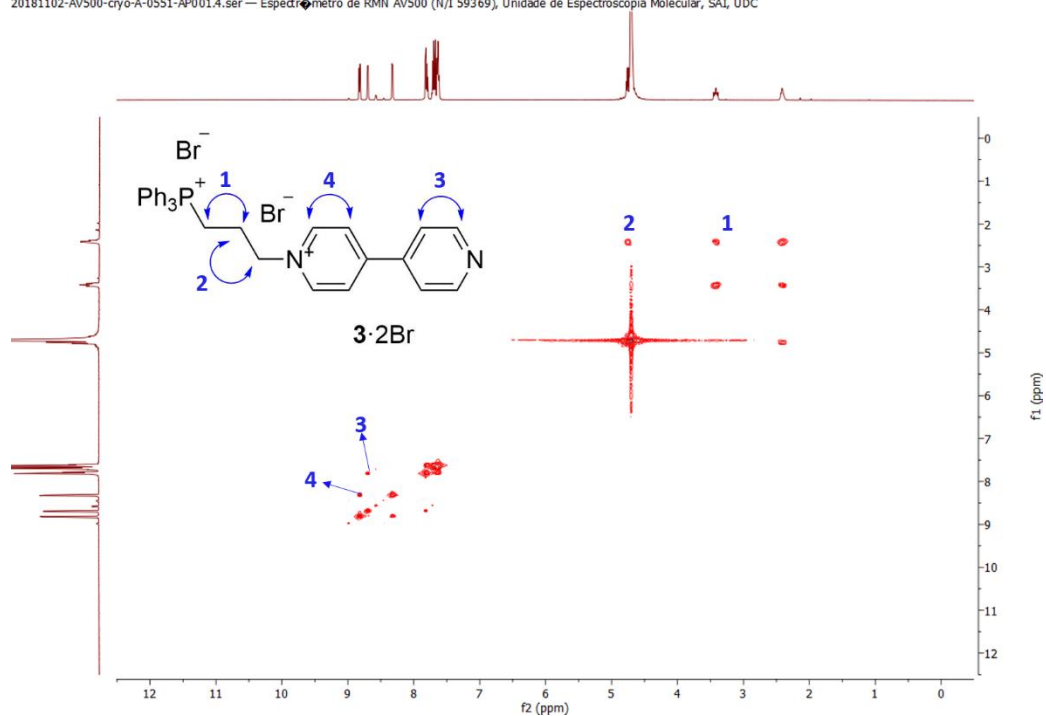


Figura 22. ^1H -RMN bidimensional, COSY. As frechas indican que se observa acoplamento entre os protóns.

O COSY mostra acoplamentos H-H contiguos. Analízanse así os sinais por encima ou por debaixo da diagonal (que aportan a mesma información). Permítenos confirmar que a asignación inicial é parcialmente correcta, obsérvanse os acoplamentos esperados en base ao proposto na **Figura 20**.

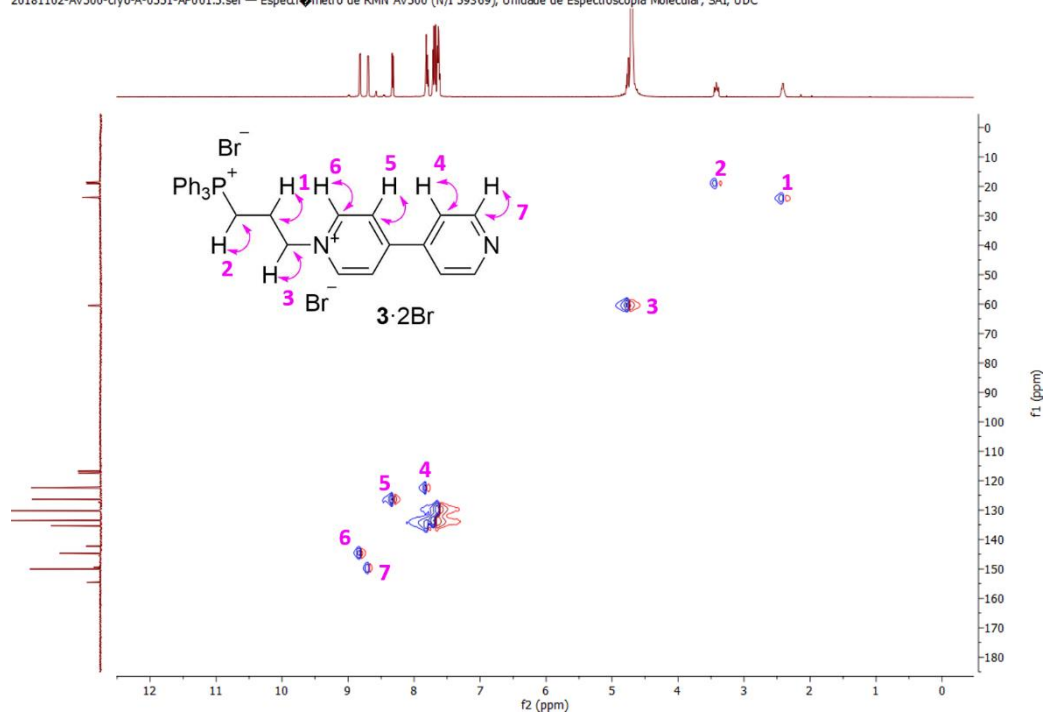


Figura 23. ^1H -RMN, ^{13}C -RMN bidimensional, HSQC. As frechas indican que se observa acoplamento entre o protón e o carbono.

A partir do HSQC compróbase que hai correlación entre os sinais dos carbonos e os protóns unidos a eles. Non hai incongruencias respecto á asignación inicial, novamente obsérvanse os acoplamentos esperados.

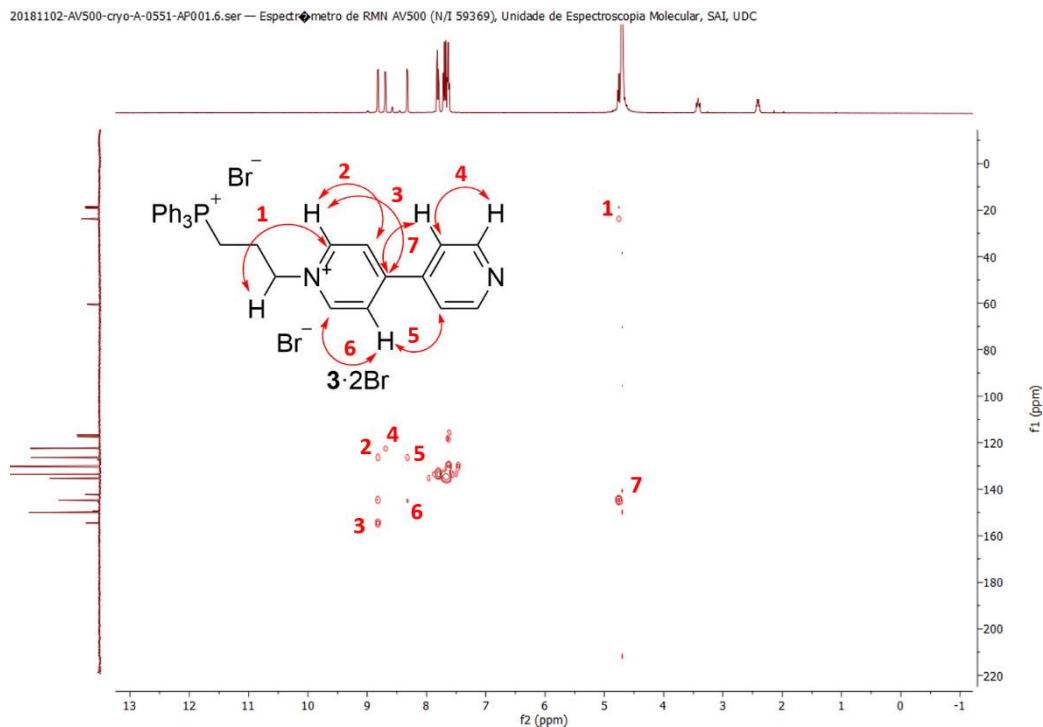


Figura 24. ^1H -RMN, ^{13}C -RMN bidimensional, HMBC. As frechas indican que se observa acoplamento entre o protón e o carbono.

A partir do HMBC compróbase que hai correlación entre os sinais dos carbonos e os protóns situados a dous ou máis enlaces de distancia. Non hai incongruencias respecto á asignación inicial, novamente obsérvanse os acoplamentos esperados.

No ESI-MS de baixa resolución encóntrase o pico $[\text{M}]^{2+}$; (m/z) calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{P}^{2+}$: 230.10, encontrado: 230.10 $[\text{M}]^{2+}$.

A masa exacta obtense co ESI-MS de alta resolución, e compárase o patrón isotópico obtido co simulado co *software* mMass.

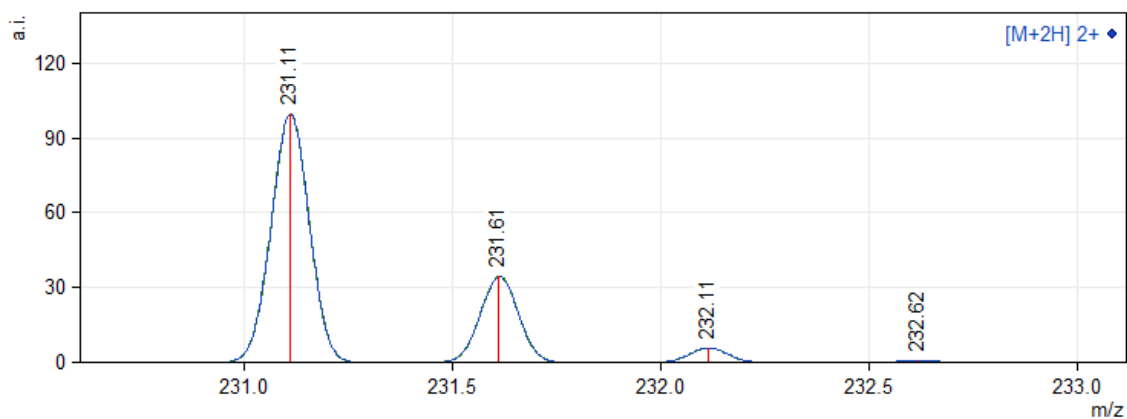


Figura 25. Patrón isotópico calculado co software *mMass* para $C_{31}H_{29}N_2P^{2+}$ ($3 \cdot 2Br$).

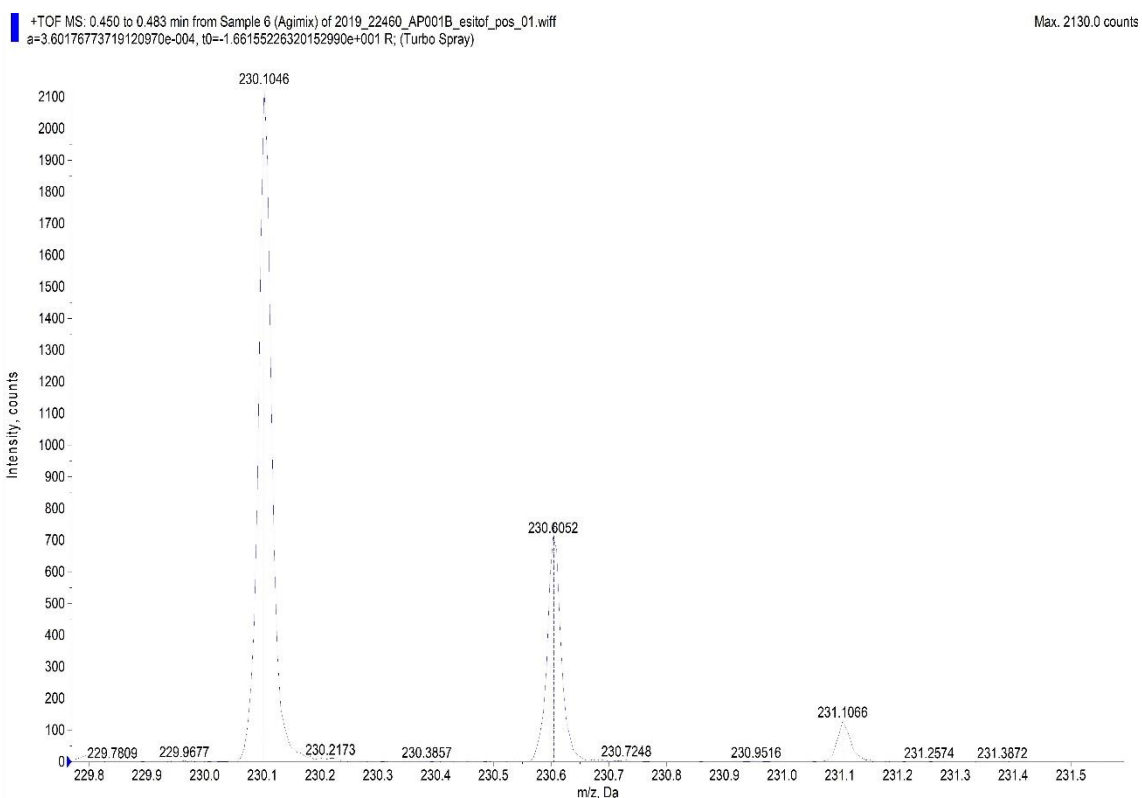


Figura 26. Patrón isotópico experimental para $C_{31}H_{29}N_2P^{2+}$ ($3 \cdot 2Br$).

Séguese o mesmo procedemento para o composto $1 \cdot 3Br$. Móstrase a asignación inicial, cos espectros de 1H -RMN e ^{13}C -RMN, e os acoplamentos observados nos bidimensionais. Os espectros de ^{31}P -RMN, así como os bidimensionais inclúense no Anexo.

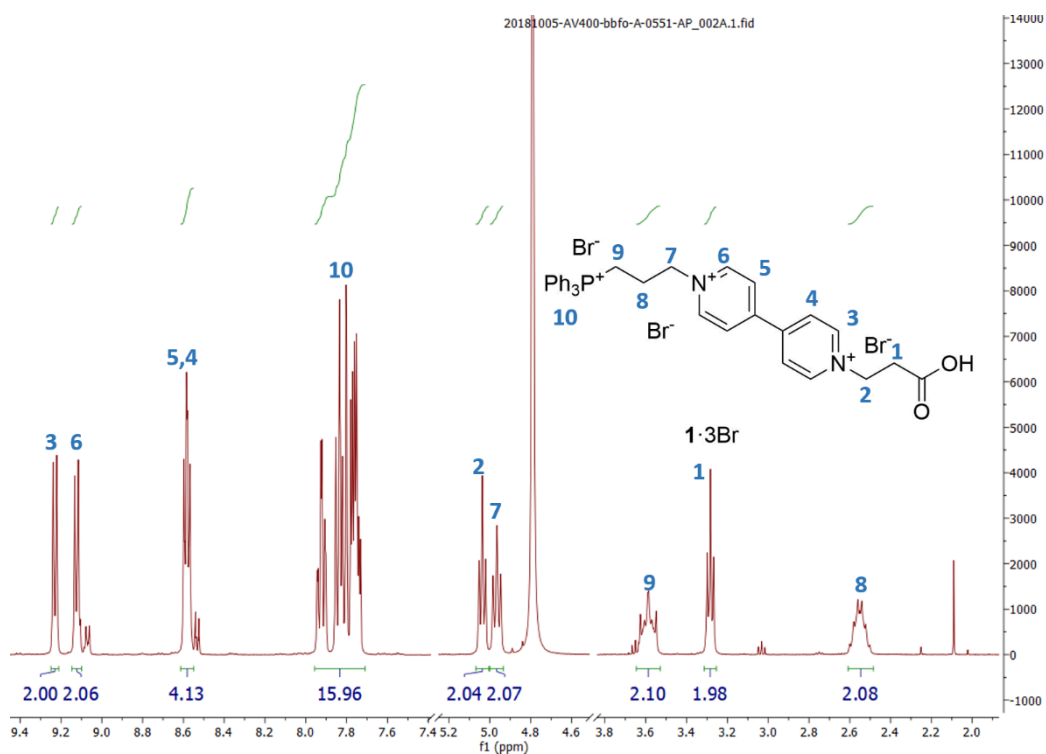


Figura 27. Espectro e asignación dos sinais do ¹H-RMN. Os números separados por comas (,) indican que hai solapamento entre os sinais, na integración xa se indica o número total de protóns aos que corresponde o sinal. Os protóns do TPP inclúense dentro do mesmo sinal, non se fai diferenciación entre eles.

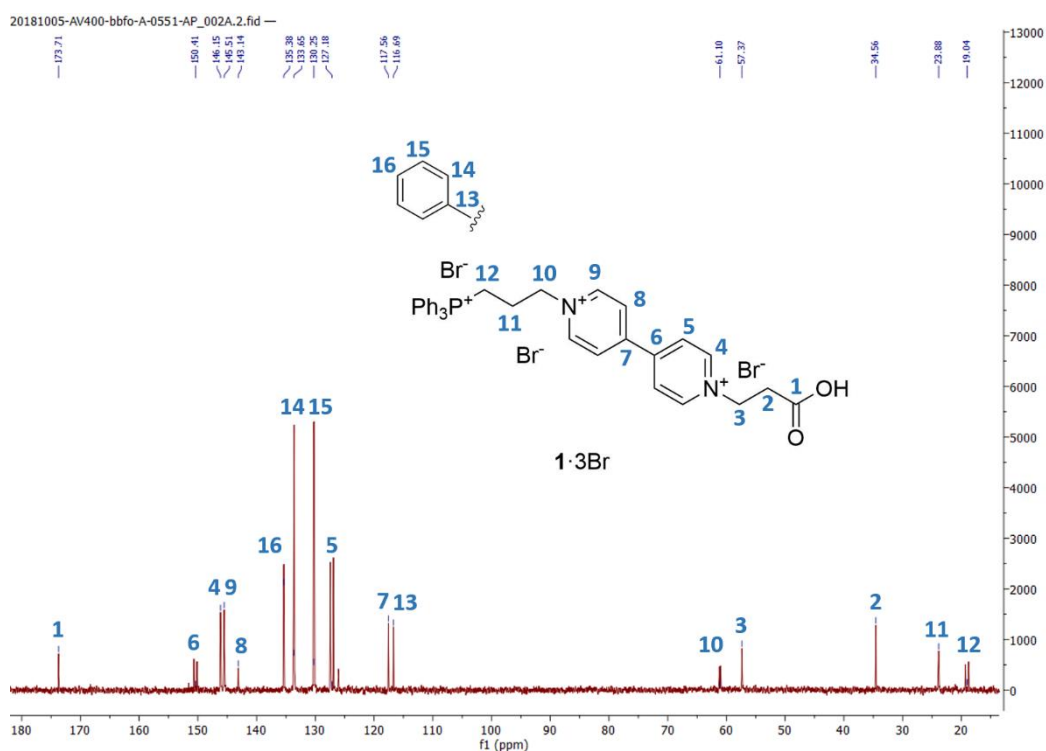


Figura 28. Espectro e asignación dos sinais do ¹³C-RMN. Faise a asignación en base á información aportada polo DEPT (ver Anexo) e aos desprazamentos químicos observados.

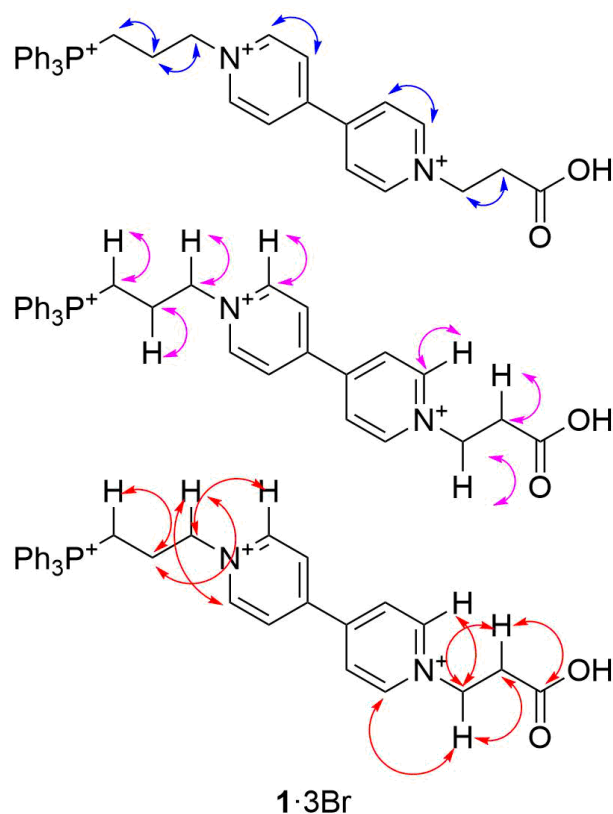


Figura 29. En azul amósanse os acoplamentos observados en COSY, en rosa os observados en HSQC e en vermello os observados en HMBC.

Nos RMNs bidimensionais obtéñense datos acordes á asignación inicial.

No ESI-MS de baixa resolución encóntrase o pico $[M]^+$; (m/z) calculado para $C_{34}H_{33}N_2O_2BrP^+$: 611.15, encontrado: 611.15 $[M]^+$.

A masa exacta obtense co ESI-MS de alta resolución, e compárase o patrón isotópico obtido co simulado co *software* mMass. Obsérvase a distribución isotópica que caracteriza a presenza de Br na molécula.

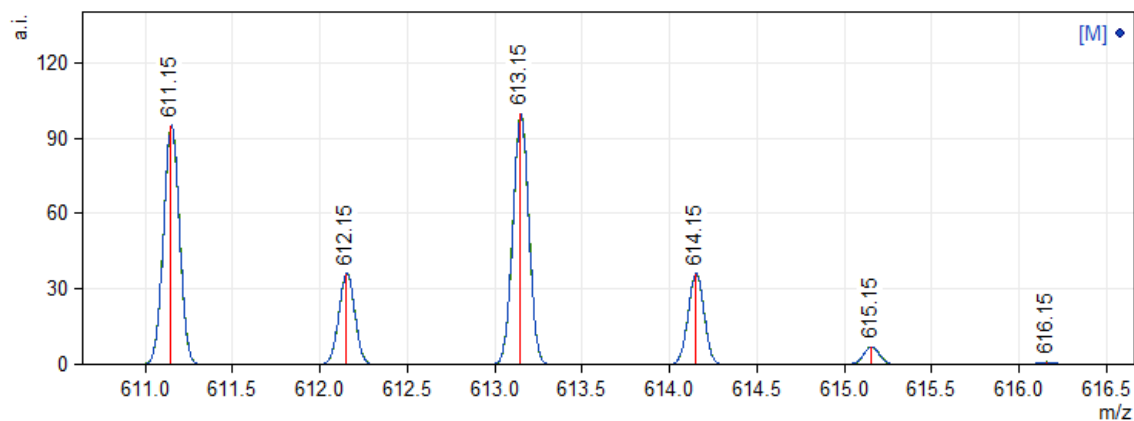


Figura 30. Patrón isotópico calculado co *software* mMass para $C_{34}H_{33}N_2O_2BrP^+$ (1·3Br).

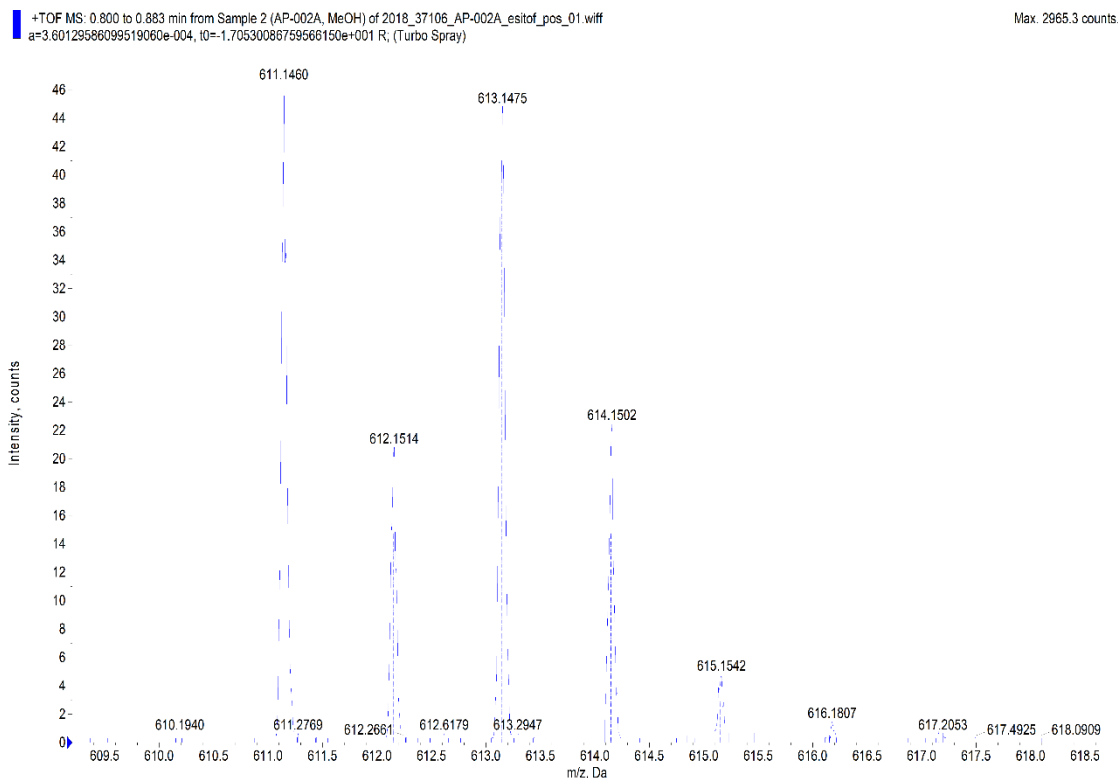


Figura 31. Patrón isotópico experimental para $C_{34}H_{33}N_2O_2BrP^+$ ($1 \cdot 3Br$).

DESEÑO E SÍNTESE DO PÉPTIDO

No referido á preparación dun “tope” peptídico para a súa implementación no “fío molecular” obxectivo do presente TFG, a secuencia LEE foi escollida por ter grupos ácidos, cargados negativamente a pH fisiolóxico, e tamén grupos laterais voluminosos. Debido a estas características espérase que a cadea aminoacídica actúe como “tope” en estruturas de tipo [2]-rotaxano con CB[8], tanto por motivos estéricos como de repulsión electrostática co portal do receptor.

Os péptidos sintetizáronse mediante SPPS utilizando a estratexia Fmoc/*t*-Bu. Polo tanto, seleccionáronse aminoácidos protexidos adecuadamente para seguir esta estratexia (**Figura 32**). Así, os grupos amino dos aminoácidos protéxense con Fmoc, mentres que as cadeas laterais dos dous residuos de Glu (E) son protexidas con *t*-Bu. Como soporte sólido utilizouse a resina H-Rink Amide ChemMatrix, coa que se obteñen péptidos co grupo funcional amida no extremo C-terminal.

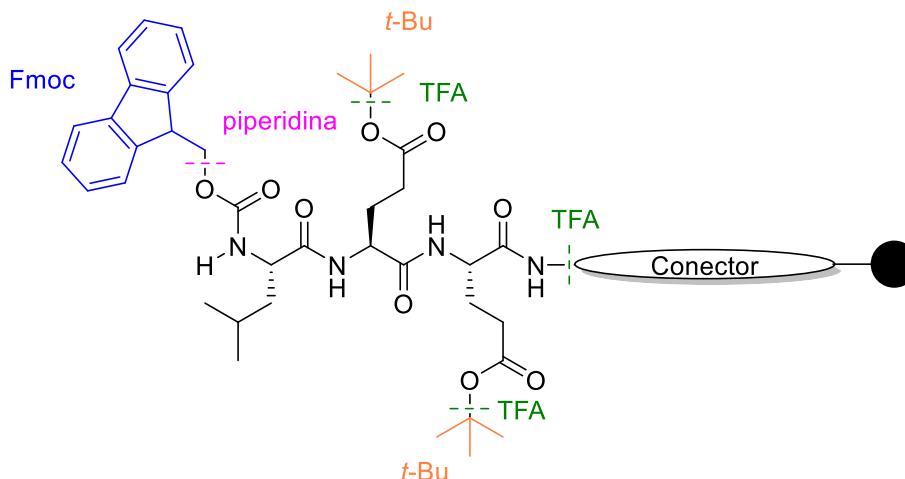


Figura 32. Deseño do péptido para a súa posterior conxugación co violóxeno.

A adición de cada aminoácido considérase un ciclo formado por 4 etapas (**Figura 10**): 1) desprotección do grupo amino terminal, 2) etapas de lavado, 3) acoplamento do aminoácido seguinte convenientemente protexido, 4) etapas de lavado. Os acoplamentos tardaron 30 minutos en completarse, por cada aminoácido, e fixéronse empregando a mestura HBTU/HOBt como axente de acoplamento e DMF como disolvente. As etapas de desprotección leváronse a cabo por tratamento cunha disolución ao 20% de 4-metilpiperidina en DMF durante 15 minutos. Na sección de procedemento experimental descríbese o proceso máis detalladamente.

ACOPLAMENTO DE VIOLÓXENO E PÉPTIDO

Segundo a planificación sintética levada a cabo, o acoplamento prodúcese entre o extremo *N*-terminal do péptido H-LEE-® e o grupo carboxilo do violóxeno 1-3Br, co péptido aínda unido á resina polimérica. Polo tanto, para que se produza a conxugación é necesario desprotexer o grupo *N*-terminal seguindo as condicións de reacción habituais, e a continuación realízase a unión do violóxeno ao péptido (**Figura 33**).

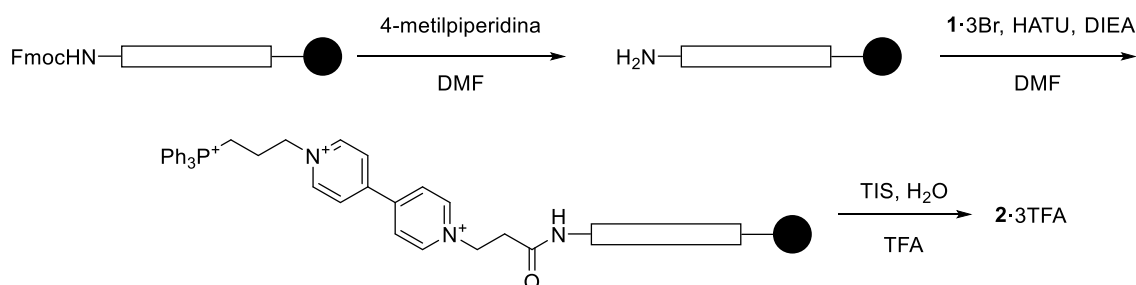


Figura 33. Esquema xeral dos pasos do acoplamento e posterior separación do produto da resina.

O acoplamento faise cunha fracción da resina Fmoc-LEE-® (21 mg, 8 µmol), realizándose un primeiro lavado da resina con DCM antes de proceder co acoplamento. A continuación engadeuse o ácido 1-3Br (2 eq), previamente activado con HATU, sobre unha suspensión da resina en DMF, e deixouse reaccionando a temperatura ambiente durante 45 minutos. Despois de lavar a resina varias veces, engadeuse a mestura TIS/H₂O/TFA (2.5:2.5:95) sobre a resina, para romper a unión do conxugado péptido-viológeno da resina, manténdose a suspensión baixo axitación durante 2 horas.

A identidade e pureza do composto final 2-3TFA confirmáronse mediante HPLC-MS, tras a análise dos picos cromatográficos maioritarios. Así, o espectro de masas do pico 2 correspóndese co esperado para o derivado peptídico de interese (**Figura 34**).

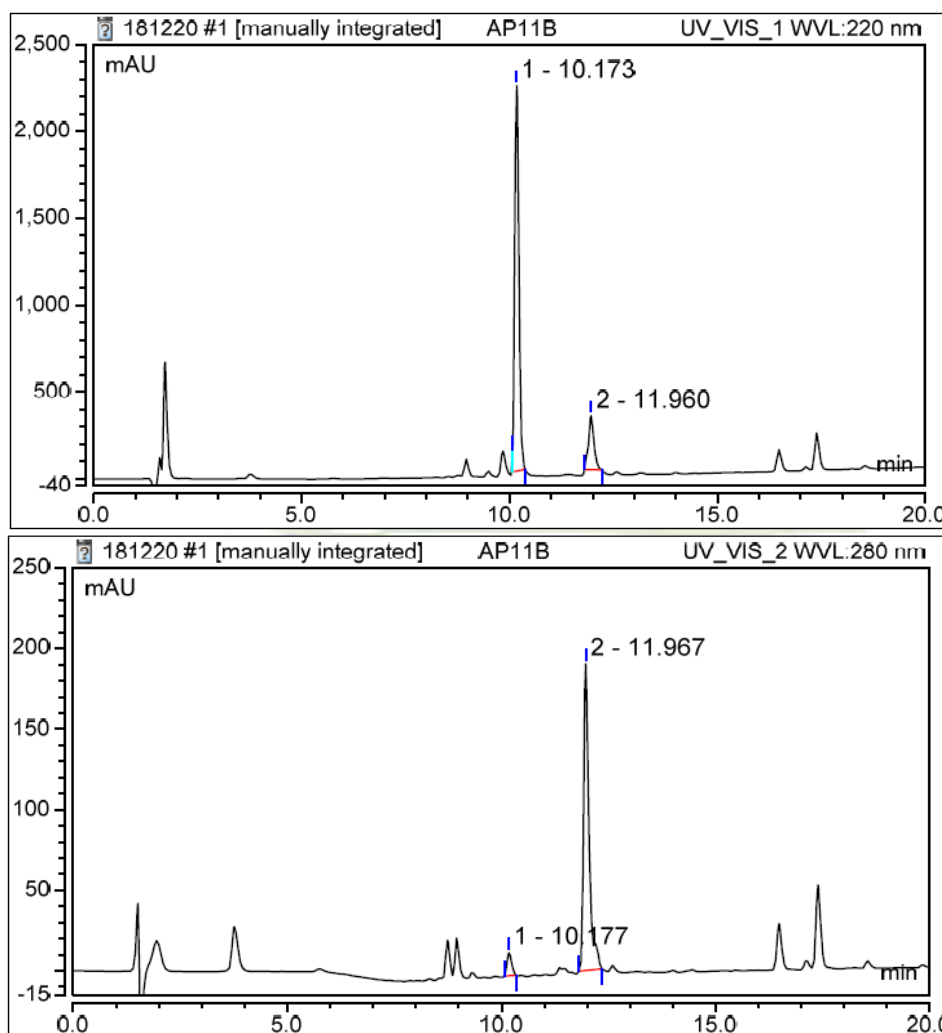


Figura 34. Cromatogramas de HPLC correspondentes ao crudo da desprotección/rotura da resina, rexístrase o espectro a dúas lonxitudes de onda, 220 e 280 nm.

En vista de que os resultados foron os esperados, faise a continuación o acoplamento dunha fracción maior de resina (25 µmol), e o cru purifícase mediante HPLC

semipreparativo en fase reversa (**Figura 35**). As fraccións co conxugado puro foron liofilizadas e obtívose un residuo branco en moi pouca cantidade, de tal modo que non se puido calcular o seu rendemento final, pero suficiente para facer a caracterización correspondente.

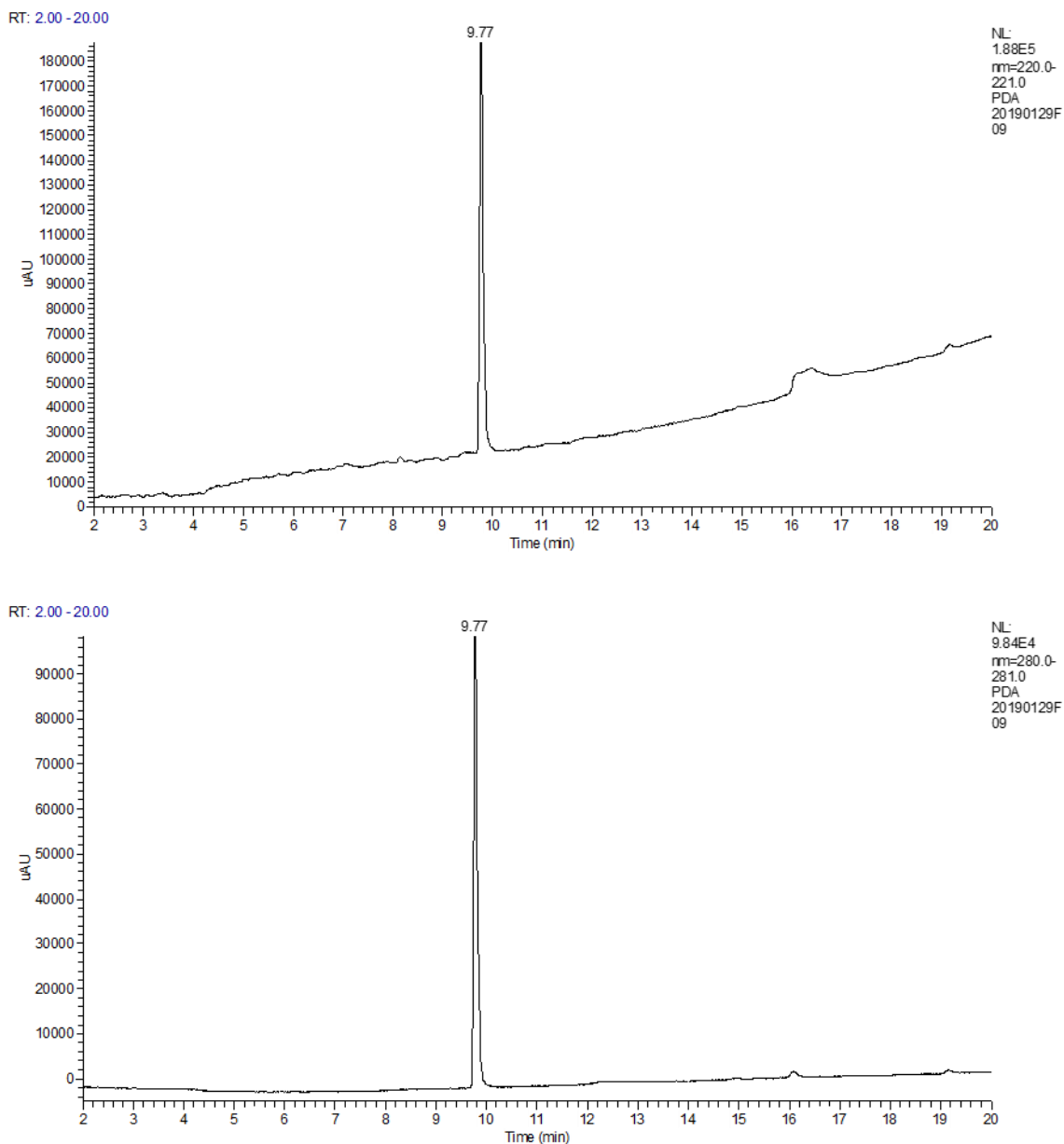


Figura 35. Cromatogramas de HPLC correspondentes á etapa de purificación, observándose un único pico a un t_R de 9.77 min correspondente ao produto 2·3TFA.

O residuo disolveuse en D₂O para a súa caracterización por RMN.

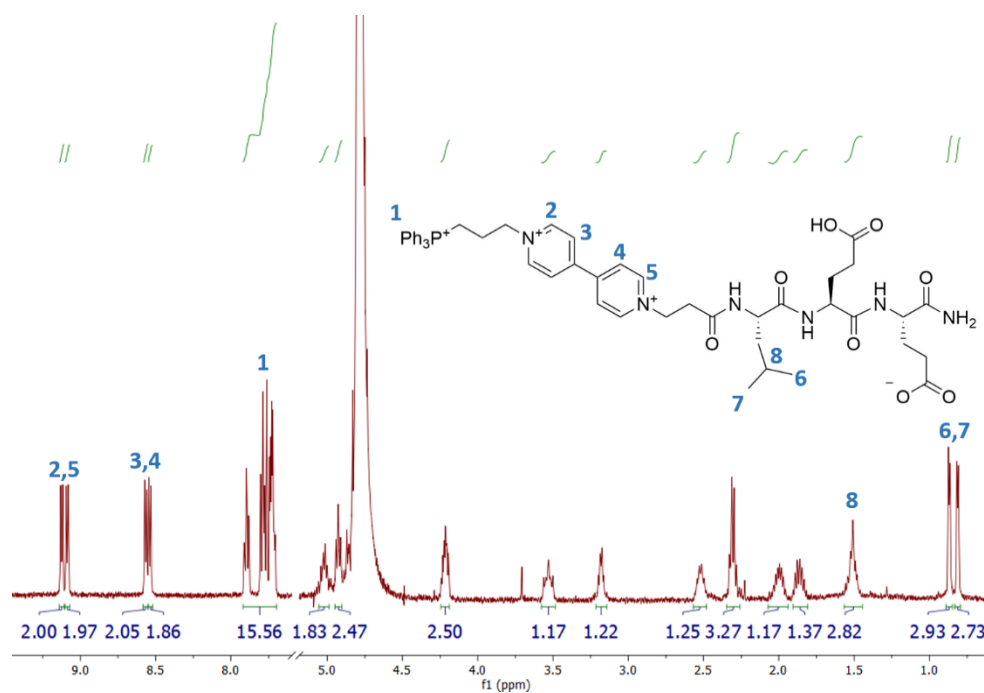


Figura 36. Espectro de ¹H-RMN (D₂O, 500 MHz) e asignación parcial da parte peptídica e do violóxeno.

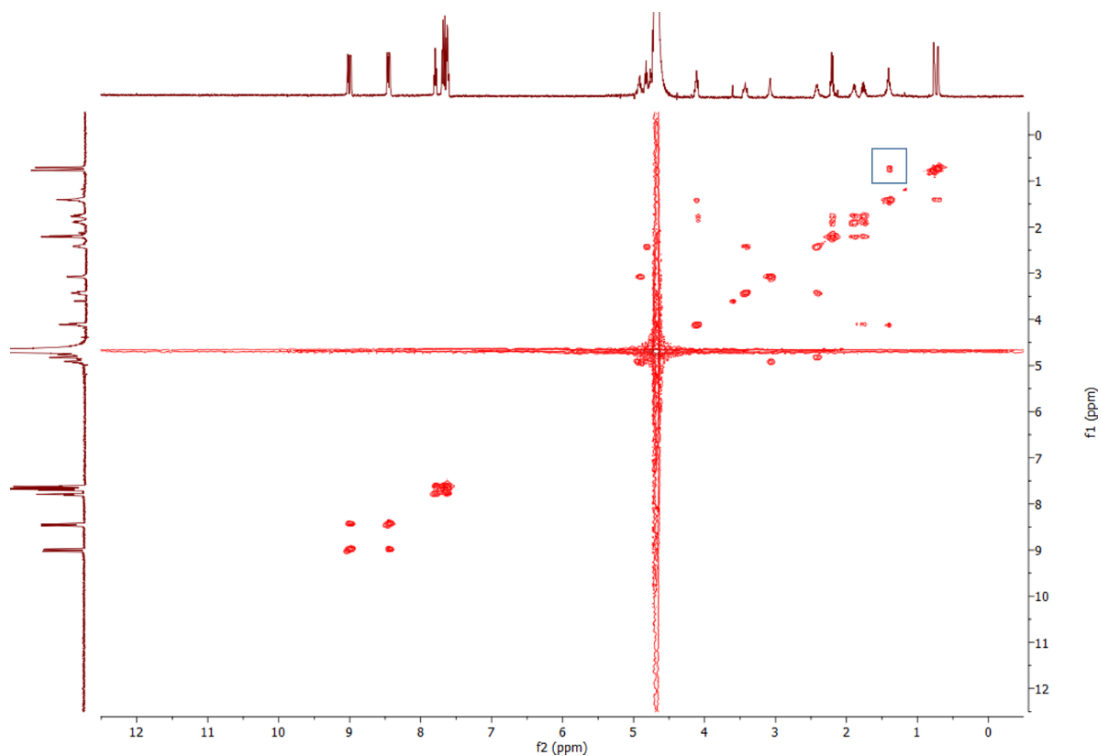


Figura 37. Espectro de ¹H-RMN (D₂O, 500 MHz) bidimensional, COSY. Márcase o sinal que permite identificar o protón 8.

Fíxose unha asignación parcial dos sinais observados no espectro de ^1H -RMN. A maior parte dos sinais aparecen solapados e son moi pouco intensos, sen embargo é posible diferenciar sinais das dúas partes da molécula, do violóxeno e do péptido, indicando que se produciu o acoplamento. A asignación dos sinais 1, 2, 3, 4 e 5 faise en base ao visto nos espectros do violóxeno, obsérvanse os desprazamentos e multiplicidade esperada para cada un deles. Ademais no COSY obsérvase acoplamento entre 2 e 3 e entre 4 e 5.

A asignación de 6 e 7 faise en base á integración e multiplicidade, son dous dobletes que integran por tres protóns (son os únicos CH_3 do composto). Obsérvase no COSY o acoplamento entre os protóns 6 e 7 con un mesmo protón, nomeado como 8. O sinal deste último protón encóntrase solapado, non podendo distinguir os outros dous protóns que integran nese sinal.

EXPERIMENTAL

XERAL

Empregáronse reactivos comerciais sen purificación adicional. A auga empregada, de calidade Milli-Q, foi obtida mediante un aparato Millipore Gradient A1.

As reaccións en disolución seguíronse por cromatografía en capa fina, empregando cromatofolios de xel de sílice Merck 60 F254 e radiación ultravioleta (254 e 360 nm) como revelador. Debido á elevada polaridade e ás cargas positivas que presentan estes compostos, como eluente empregouse a mestura formada por ACN (600 ml), MeOH (150 ml), H₂O (150 ml) e NaCl (5g).

O seguimento das reaccións mediante RMN realizouse cun espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz para ¹H e ³¹P), e as mostras analizadas foron preparadas en auga deuterada (D₂O), tomando como referencia o sinal residual do disolvente protonado. Para a realización dos distintos experimentos de RMN para a caracterización empregouse un espectrómetro Bruker advance 500 (500 MHz).

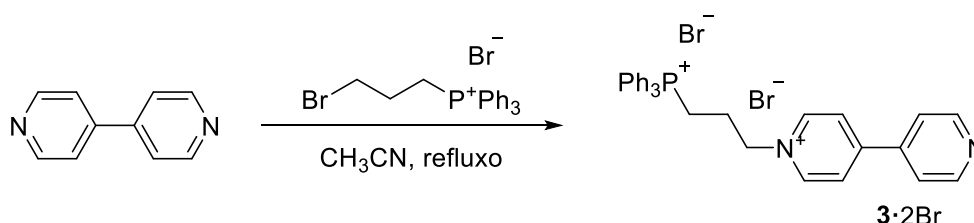
A síntese de péptidos realizouse de forma manual. Os aminoácidos, os reactivos de acoplamento e a resina proveñen das casas comerciais Iris Biotech GmbH e Sigma Aldrich.

Para as análises mediante HPLC en fase reversa empregouse o espectrómetro Thermo Scientific UltiMate 3000 con detector PDA (Photo-Diode Array), acoplado a un espectrómetro de cuadrupolo simple Thermo Scientific MSQ Plus. A detección levouse a cabo a 220 e 280 nm, simultaneamente. Para a purificación empregouse un espectrómetro Agilent 1200 series. Os HPLC-MS do produto final foron realizados no equipo Thermo Scientific Accela acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Discovery, proporcionado polo SAI (Servizos de Apoio á Investigación). Para as inxeccións analíticas empregouse unha columna analítica Aeris 3.6 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 x 2.1 mm) de Phenomenex, e para a purificación unha semipreparativa Aeris 5 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (250 x 10.0 mm) de Phenomenex. O gradiente empregado para as inxeccións analíticas foi de 5→95% e para a purificación de 15→55% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA.

Tras a purificación do conxugado péptido-viológeno este foi liofilizado nun liofilizador Telstar, Cryodos -80.

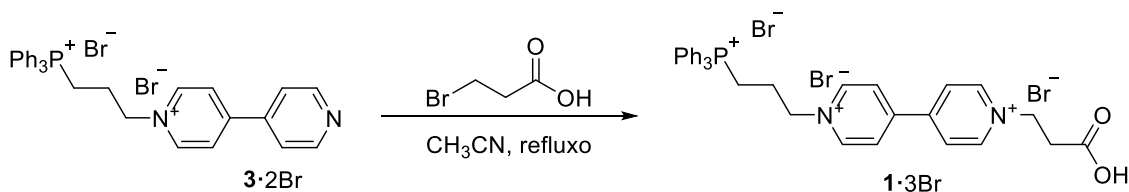
SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN

1. Síntese de dibromuro de 1-(3-(trifenilfosfonio)propil)-[4,4'-bipiridin]-1-ío **3·2Br**



629 mg de 4,4'-bipiridina (4.030 mmol, 5 eq.) disolvéronse en ACN (70 ml). A esta disolución engadíuselle bromuro de (3-bromopropil)trifenilfosfonio (374 mg, 0.806 mmol, 1 eq.) e a mestura quentouse a refluxo durante 96 horas con axitación. A mixtiión de reacción deixouse arrefriar a temperatura ambiente e engadiuse Et_2O (40 ml). O precipitado de cor amarela producido separouse mediante filtración ao baleiro e lavouse con Et_2O . Obtivéronse así 455.3 mg do produto **3·2Br** (455.3 mg, 91%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 8.78 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 8.41 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.98 – 7.63 (m, 17H), 4.88 – 4.82 (m, 2H), 3.54 – 3.46 (m, 2H), 2.54 – 2.46 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O) δ (ppm): 154.6 (C), 150.0 (CH), 144.7 (CH), 142.3 (C), 135.3 (CH), 133.5 (CH), 130.2 (CH), 126.4 (CH), 122.5 (CH), 117.1 (C), 60.5 (CH_2), 23.7 (CH_2), 18.8 (CH_2).

1. Síntese de tribromuro de 1-(2-carboxietil)-1'-(3-(trifenilfosfonio)propil)-[4,4'-bipiridina]-1,1'-diío **1·3Br**.



O composto **3·2Br** (200 mg, 0.322 mmol, 1 eq.) disolveuse en ACN (15 ml) e engadiuse ácido 3-bromopropiónico (250 mg, 1.634 mmol, 5 eq.), mantívose con axitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Formouse un precipitado no seno da disolución que se separou por filtración ao baleiro, o precipitado lavouse con Et_2O . Obtivéronse 186 mg do produto **1·3Br**, un sólido de cor amarela (186 mg, 74%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.23 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 9.12 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.59 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 8.58 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 8.06 – 7.68 (m, 15H), 5.04 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.63 – 3.53 (m, 2H), 3.28 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O) δ (ppm): 173.7 (C), 150.4 (C), 146.2 (CH), 145.5 (CH), 143. 3

(CH), 135.4 (CH), 133.7 (CH), 130.3 (CH), 127.2 (CH), 117.6 (C), 116.7 (C), 61.1 (CH₂), 57.4 (CH₂), 34.6 (CH₂), 23.9 (CH₂), 19.0 (CH₂).

SÍNTESI EN FASE SÓLIDA

A secuencia peptídica LEE sintetizouse de forma manual en fase sólida seguindo os procedementos que se explican a continuación.

- **Reactivos e disolventes**

Axentes de acoplamento (HBTU/HOBt/DMF): Mesturáronse 3.8 g de HBTU e 1.35 g de HOBt en 50 ml de DMF, de xeito que a concentración final de HBTU e HOBt fose 0.2 M.

Base (DIEA/DMF): 3 ml de DIEA en 90 ml de DMF, a concentración de DIEA é 0.195 M.

Test TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenceno-sulfónico): 10% DIEA/DMF e 1% TNBS/DMF. Este test permite detectar aminos primarias libres na resina, de xeito que se pode comprobar se as etapas de acoplamento e desprotección transcorreron con éxito. Engádese unha gota de cada disolución a unha pequena porción de resina, se esta adquire unha cor vermella o resultado é positivo, é dicir hai aminos libres. Se pola contra non hai cambio na coloración da resina o resultado do test é negativo, non hai aminos libres. O cambio de coloración débese á formación dunha sulfonamida entre o TNBS e as aminos libres na resina.

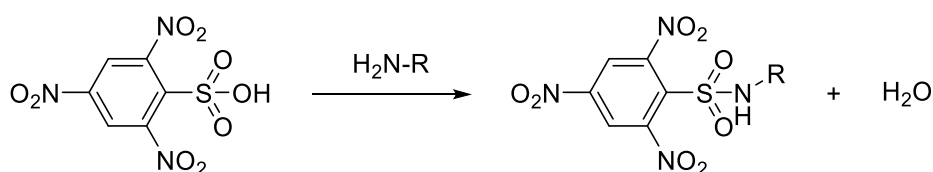


Figura 38. Formación da sulfonamida tras reaccionar o TNBS con unha amina libre da resina.

- **Preparación da resina**

Como soporte sólido usouse a resina H-Rink Amide ChemMatrix con unha carga de 0.47 mmol/g. Presenta un grupo amina que, tras a rotura do enlace péptido-resina con TFA, dará lugar ao péptido de interese con un grupo amida no extremo C-terminal.

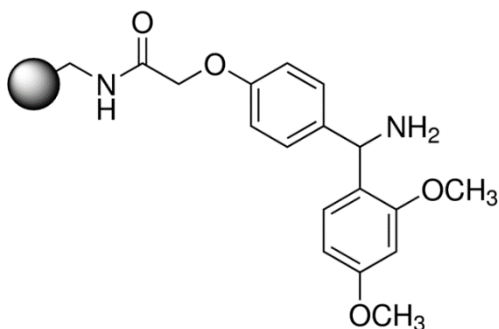


Figura 39. Estrutura da resina H-Rink Amide. Tomado de www.sigmaaldrich.com.

A resina foi sometida a un acondicionamento previo antes de comezar a síntese:

1. Engadiuse a resina ao matraz de reacción (106 mg, 0.05 mmol) e lavouse con DMF (3 x 5 ml x 5 min).
2. Comprobose que o test de TNBS dese un resultado positivo.
3. Lavouse con DMF (2 x 5 ml x 5 min).

Unha vez completada esta secuencia comezouse coa síntese engadindo o primeiro aminoácido.

- **Proceso sintético**

A síntese levouse a cabo utilizando un reactor como o que se mostra na **Figura 40**, os disolventes foron engadidos pola parte superior e elimináronse por filtración ao baleiro. A resina mantívose axitada facendo pasar unha corrente de N₂ a través do sistema.

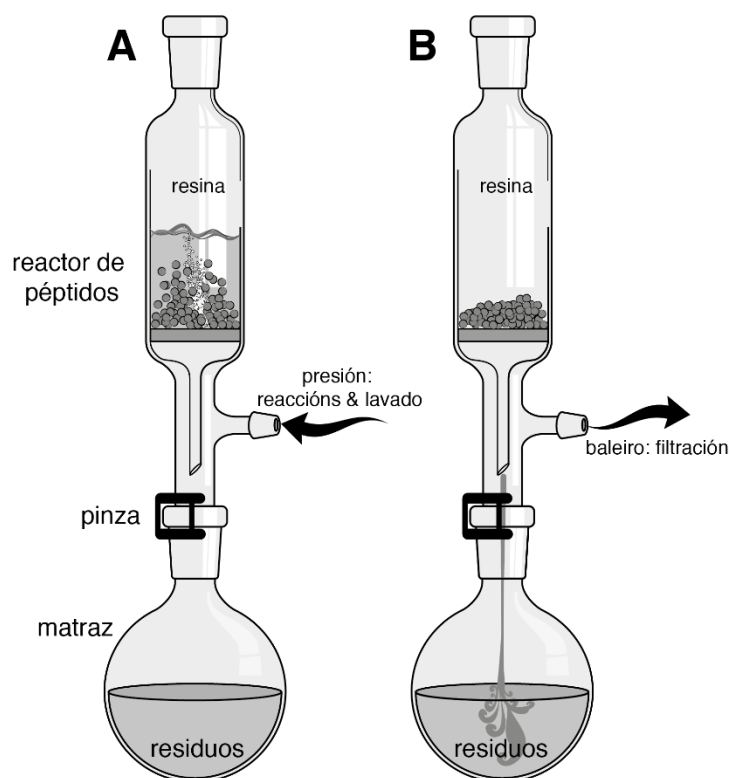


Figura 40. Montaxe para a síntese de péptidos en fase sólida de forma manual.

Acoplamento: Disólvese o aminoácido correspondente (en exceso, 4 eq.) en HBTU/HOBt/DMF (4 eq., 2 ml) e DIEA/DMF (6 eq., 3 ml) e mestúrese durante 2 min para que se completase a activación. Transcorrido este tempo engadiuse a mixión sobre a resina. A suspensión resultante axitouse durante 30 min facendo pasar unha corrente de N_2 .

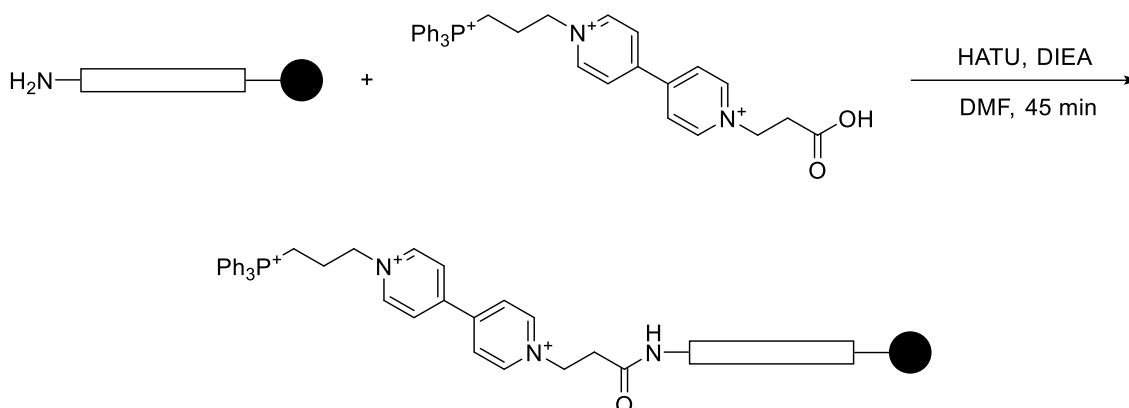
Lavados: Despois de cada acoplamento con DMF (2 x 5 ml x 2 min).

Test TNBS: Despois dos lavados fíxose o test para comprobar se o acoplamento se completara con éxito. Sempre se obtivo un resultado negativo e polo tanto continuouse coa síntese, desprotexendo o grupo Fmoc do extremo *N*-terminal. Se o resultado fose positivo sería necesario repetir o acoplamento.

Desprotección do grupo protector temporal (Fmoc): Levouse a cabo por tratamento básico con 20% 4-metilpiperidina/DMF (5 ml) durante 15 min. A continuación, lavouse a resina desprotexida con DMF (2 x 5 ml x 2 min) e DCM (1 x 5 ml x 2 min). Despois da desprotección engadiuse o seguinte aminoácido e repetíronse as etapas anteriores.

- **Conxugación péptido-violóxeno**

Acoplamento co violóxeno:



Fíxose o acoplamento cunha fracción da resina (21 mg, 8 μmol). Esta foi resuspendida en DMF (280 μl). A continuación engadiuse a seguinte mestura preactivada durante 2 minutos sobre a resina: 1·3Br (12.3 mg, 15.98 μmol), HATU (15.98 μmol , 6 mg), 0.195 M DIEA en DMF (24 μmol , 123 μl), e a suspensión resultante deixouse reaccionando durante 45 minutos con axitación mecánica. Unha vez eliminado o disolvente por filtración ao baleiro fixéronse lavados sucesivos da resina con DMF (2 x 2.5 ml x 5 min) e con DCM (2 x 2.5 ml x 5 min).

A continuación unha fracción de 3 mg desta resina tratouse con 0.2 ml da mixtión de desprotección e rotura (2.5% TIS, 2.5% H_2O e 95% TFA) durante 2.5 horas. A continuación filtrouse a resina e o filtrado concentrouse a sequidade baixo unha corrente de N_2 . O residuo sólido disolveuse en ACN/ H_2O (1:1) e foi analizado mediante HPLC e MS.

$t_R = 11.96$ min (columna Aeris 3.6 μm PEPTIDE XB-C18; gradiente lineal 5 \rightarrow 95% ACN, 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA).

ESI-MS (m/z): $[\text{M}]^{2+}$ calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}^{2+}$: 451.21, encontrado: 451.20 $[\text{M}]^{2+}$.

Tras comprobar que a reacción transcorreu axeitadamente, a reacción repetiuse con máis cantidade de resina. Neste caso, 65.7 mg da resina co péptido acoplado (25 μmol) foi resuspendida en DMF (1.6 ml). Engadiuse 1·3Br (50 μmol , 38.7 mg) previamente activado con HATU (50 μmol , 19 mg) e 0.195 M DIEA en DMF (75 μmol , 385 μl) durante 2 minutos. Deixouse reaccionando durante 45 minutos con axitación mecánica. Unha

vez eliminado o disolvente por filtración ao baleiro fixéronse lavados sucesivos da resina con DMF (2 x 2.5 ml x 5 min) e con DCM (2 x 2.5 ml x 5 min).

A continuación a resina foi tratada con 5ml da mixtión de desprotección e rotura (2.5% TIS, 2.5% H₂O e 95% TFA) durante 2.5 horas. Transcorrido este tempo filtrouse a resina e o filtrado concentrouse a sequidade facendo pasar unha corrente de N₂. O residuo sólido dissolveuse en 800 µl de H₂O e foi purificado mediante HPLC semipreparativo en fase reversa.

$t_R = 9.77$ min (columna Aeris 5 µm PEPTIDE XB-C18100 Å; 250 x 10 mm.; gradiente lineal 5 → 95% ACN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 23 min).

ESI-MS (m/z): [M]²⁺ calculado para C₅₀H₅₉N₆O₈P²⁺: 451.21, encontrado: 451.21 [M]²⁺.

CONCLUSIÓNS

Segundo os resultados obtidos, cumpríronse os seguintes obxectivos establecidos para este traballo de fin de grao:

1. Preparouse con éxito o derivado de 4,4'-bipiridinio **1**-3Br, e fíxose a súa caracterización estrutural, así como dos seus intermedios sintéticos, mediante ESI-MS de baixa e alta resolución, e RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ mono- e bidimensional.
2. Sintetizouse o péptido precursor para o derivado péptido-violóxeno: LEE, empregando protocolos de síntese de péptidos en fase sólida e seguindo a estratexia Fmoc/*t*-Bu.
3. Preparouse o correspondente conxugado péptido-violóxeno mediante o acoplamento en fase sólida entre o extremo *N*-terminal do péptido e o grupo carboxilo do violóxeno, e posterior desanclaxe da resina dando lugar ao derivado desexado **2**-3TFA.
4. O conxugado **2**-3TFA purificouse mediante HPLC en fase reversa, e a súa caracterización estrutural realizouse mediante ESI-MS e RMN de ^1H mono- e bidimensional.

Como traballo futuro plantéxase a formación de [2]-rotaxanos empregando derivados péptido-violóxeno como “fíos”, CB[8] como “roda” e un fluoróforo como segundo hóspede do cucurbiturilo que sexa capaz de sinalizar o proceso redox na matriz mitocondrial.

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se han cumplido los siguientes objetivos establecidos para este trabajo de final de grado:

1. Se preparó con éxito el derivado de 4,4'-bipiridinio **1**·3Br, y se hizo su caracterización estructural, así como la de sus intermedios sintéticos, mediante ESI-MS de baja y alta resolución, y RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ mono- y bidimensional.
2. Se sintetizó el péptido precursor para el derivado péptido-viológeno: LEE, empleando los protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida y siguiendo la estrategia Fmoc/*t*-Bu.
3. Se preparó el correspondiente conjugado péptido-viológeno mediante el acoplamiento en fase sólida entre el extremo *N*-terminal del péptido y el grupo carboxilo del viológeno, y posterior desanclaje de la resina dando lugar al derivado deseado **2**·3TFA.
4. El conjugado **2**·3TFA fue purificado mediante HPLC en fase reversa, y su caracterización estructural se realizó mediante ESI-MS y RMN de ^1H mono- y bidimensional.

Como trabajo futuro se plantea la formación de [2]-rotaxanos empleando derivados de péptido-viológeno como "*hilos*", CB[8] como "*rueda*" y un fluoróforo como segundo huésped del cucurbiturilo que sea capaz de señalar el proceso redox en la matriz mitocondrial.

CONCLUSIONS

According to the reported results, the following objectives of this final degree project have been achieved:

1. The 4,4'-bipyridinium derivative **1**·3Br was successfully synthesized and characterized, as well as its synthetic intermediates, by low and high resolution ESI-MS, and $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ mono- and bidimensional NMR.
2. The peptidic precursor, for the viologen-peptide conjugate, LEE was synthesized using solid phase peptide synthesis protocols following the Fmoc/*t*-Bu strategy.
3. The peptide-viologen conjugate was prepared in solid phase through the coupling between the *N*-terminus of the peptide and the carboxy group of the viologen, and was then cleaved from the resin affording the desired derivative **2**·3TFA.
4. The conjugate **2**·3TFA was purified by reversed-phase HPLC, and characterized by ESI-MS and ^1H mono- and bidimensional NMR.

As future work, the formation of [2]-rotaxanes, using peptide-viologen derivatives as “*threads*”, CB[8] as “*wheel*” and a fluorophore as second host of the cucurbituril, has been planned for the signalling of redox processes in the mitochondrial matrix.

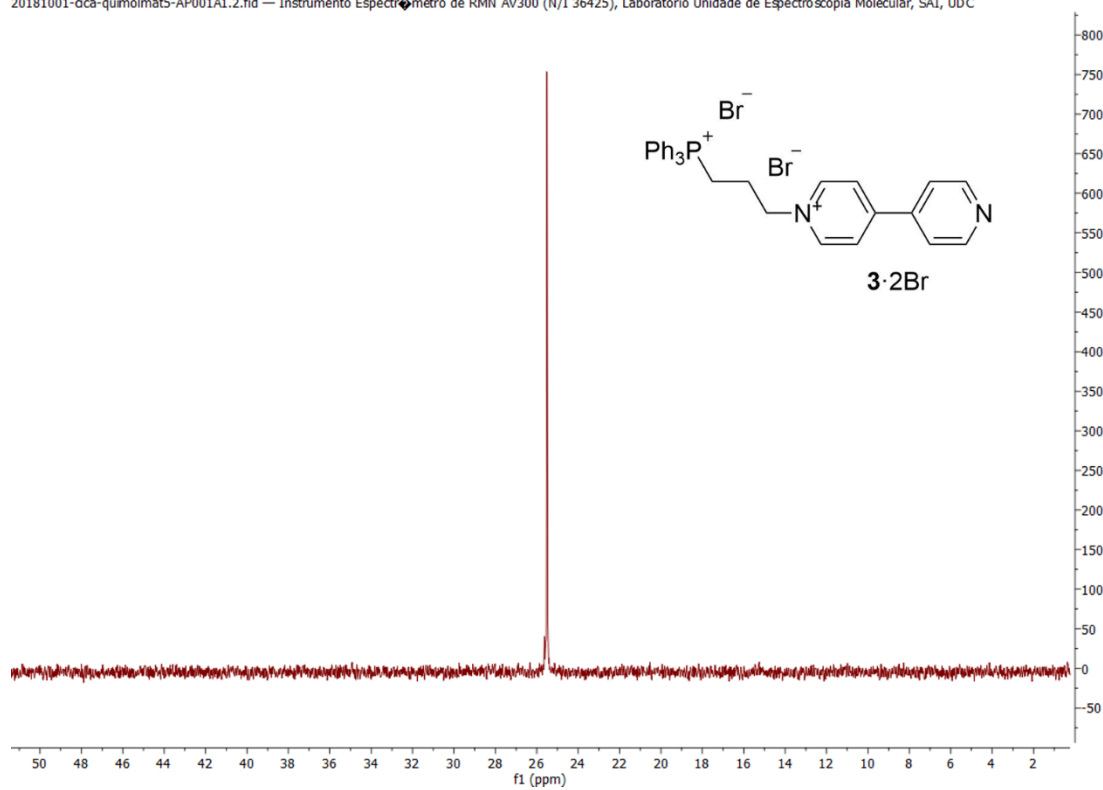
BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, G. and Hausman, R. (2010). *La célula*. Madrid: Marbán.
2. Szeto, H. H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *AAPS J.* **8**, E521–E531 (2006).
3. Feduchi Canosa, E. (2015). *Bioquímica*. Madrid: Médica Panamericana.
4. Krumova, K., Greene, L. E. & Cosa, G. Fluorogenic α -tocopherol analogue for monitoring the antioxidant status within the inner mitochondrial membrane of live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 17135–17143 (2013).
5. Smith R. A., Porteous C. M., Gane A. M., Murphy M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5407–5412 (2013).
6. Zielonka, J. *et al.* Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem. Rev.* **117**, 10043–10120 (2017).
7. R.A. Smith, C.M. Porteous, C.V. Coulter, M.P. Murphy. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **263**, 709–716 (1999).
8. Smith, R. A. J., Hartley, R. C. & Murphy, M. P. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 3021–3038 (2011).
9. Xu, Z. & Xu, L. Fluorescent probes for the selective detection of chemical species inside mitochondria. *Chem. Commun.* **52**, 1094–1119 (2016).
10. Monk, P. M. S. (1998) *The Viologens, Physicochemical Properties, Synthesis and Applications of the Salts of 4, 4'-Bipyridine*. New York: Wiley
11. Prime, T. A. *et al.* Selective superoxide generation within mitochondria by the targeted redox cycler MitoParaquat. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 883–894 (2015).
12. Singh A., Yip W., Halterman R. L. Fluorescence-On Response via CB7 Binding to Viologen–Dye Pseudorotaxanes. *Org. Lett.* **14**, 4046-4049 (2012).
13. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
14. BACHEM. Solid Phase Solid Phase Peptide Synthesis. 1–55 (2014).
15. Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161–214 (2009).

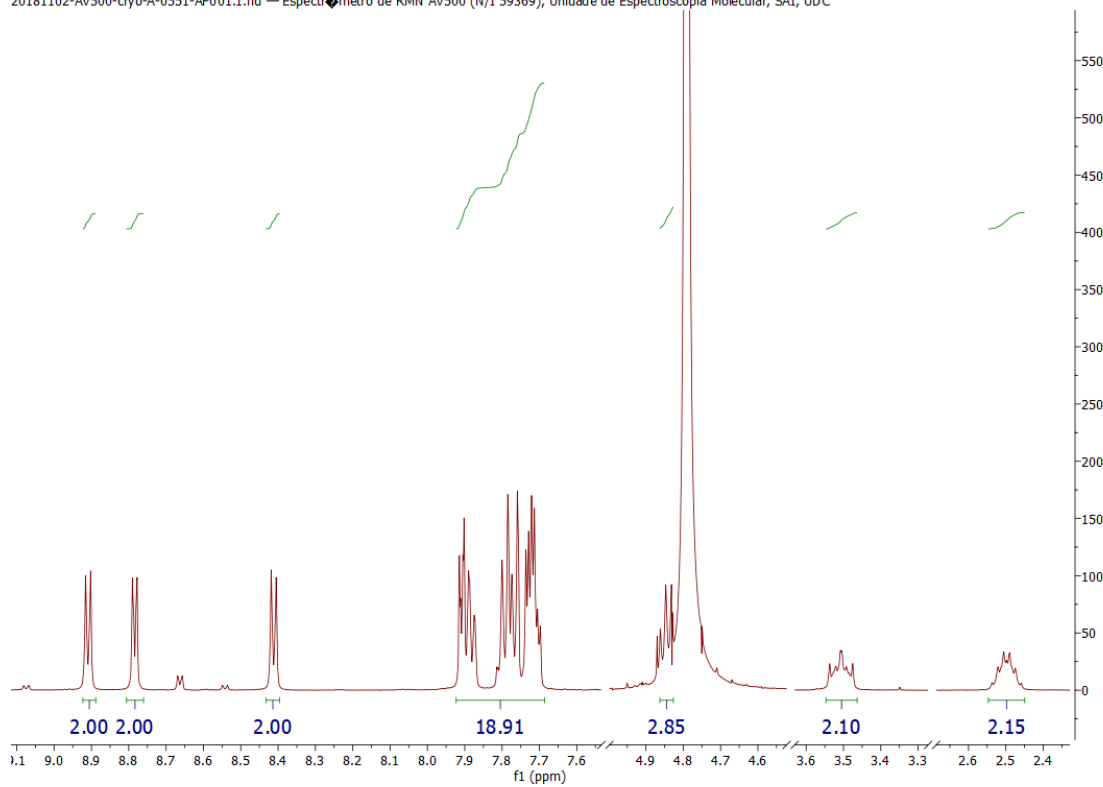
ANEXO

COMPOSTO 3·2Br

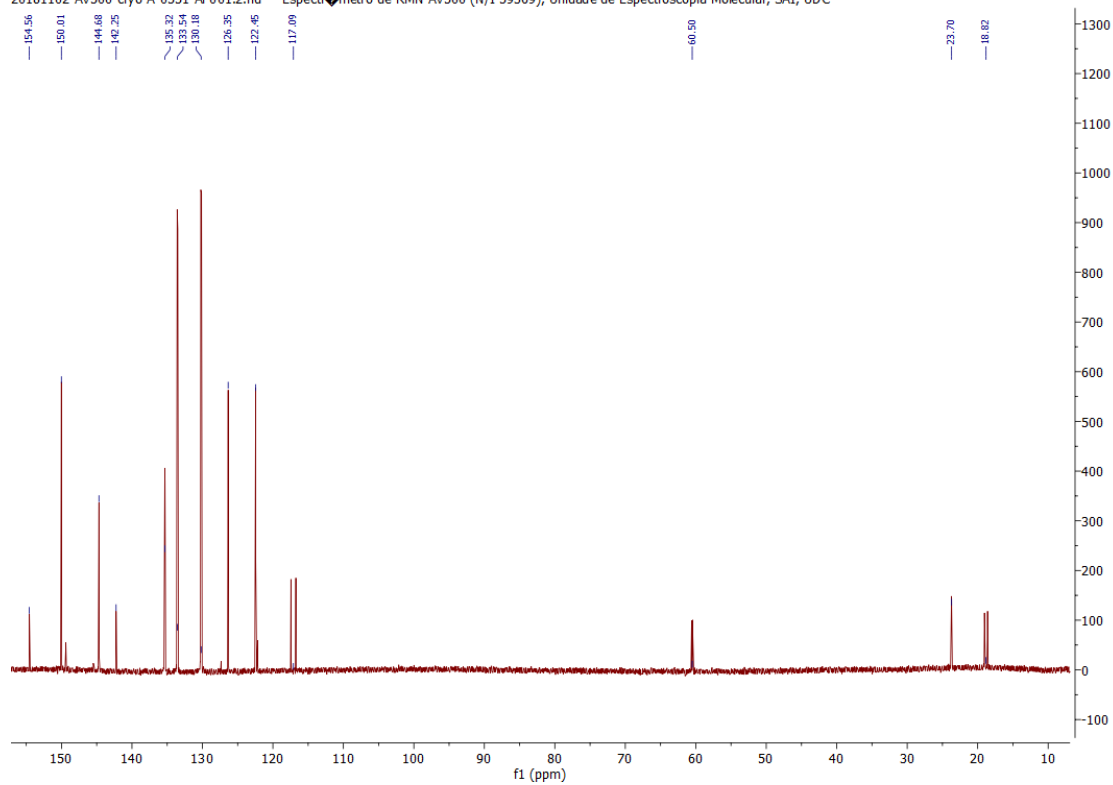
20181001-gca-quimolmat5-AP001A1.2.fid — Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



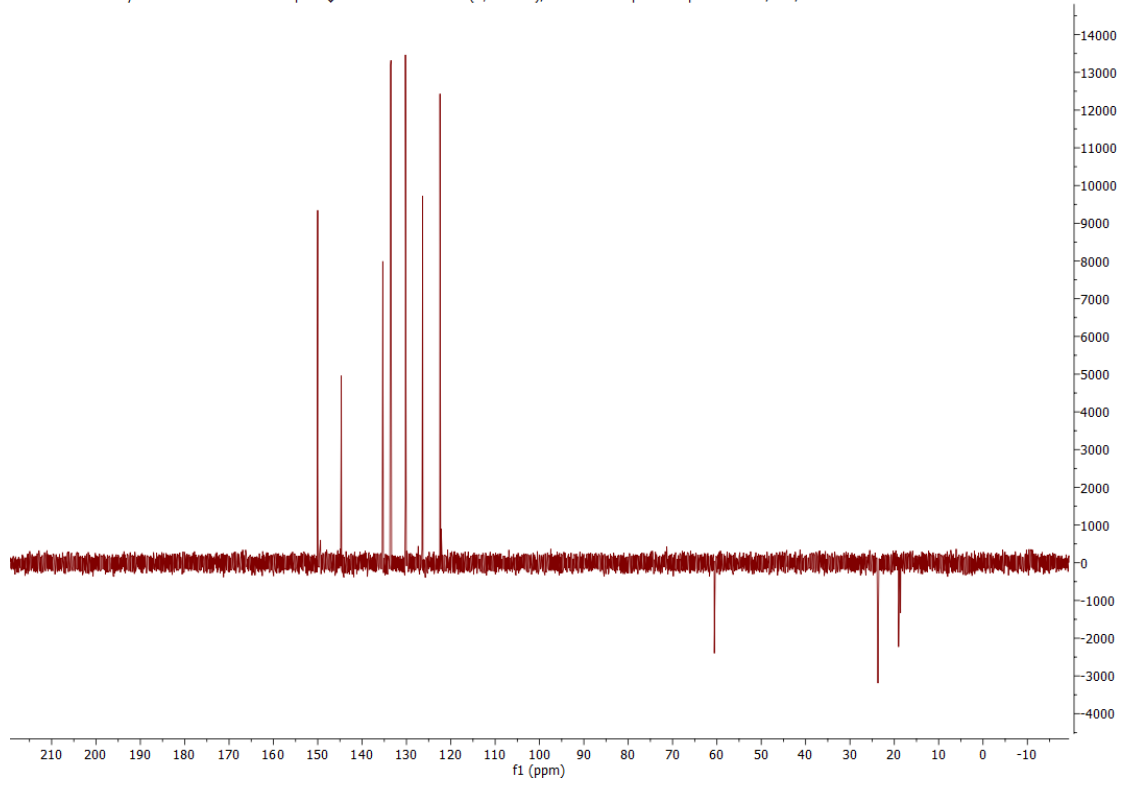
^{31}P -RMN (300 MHz, D_2O)



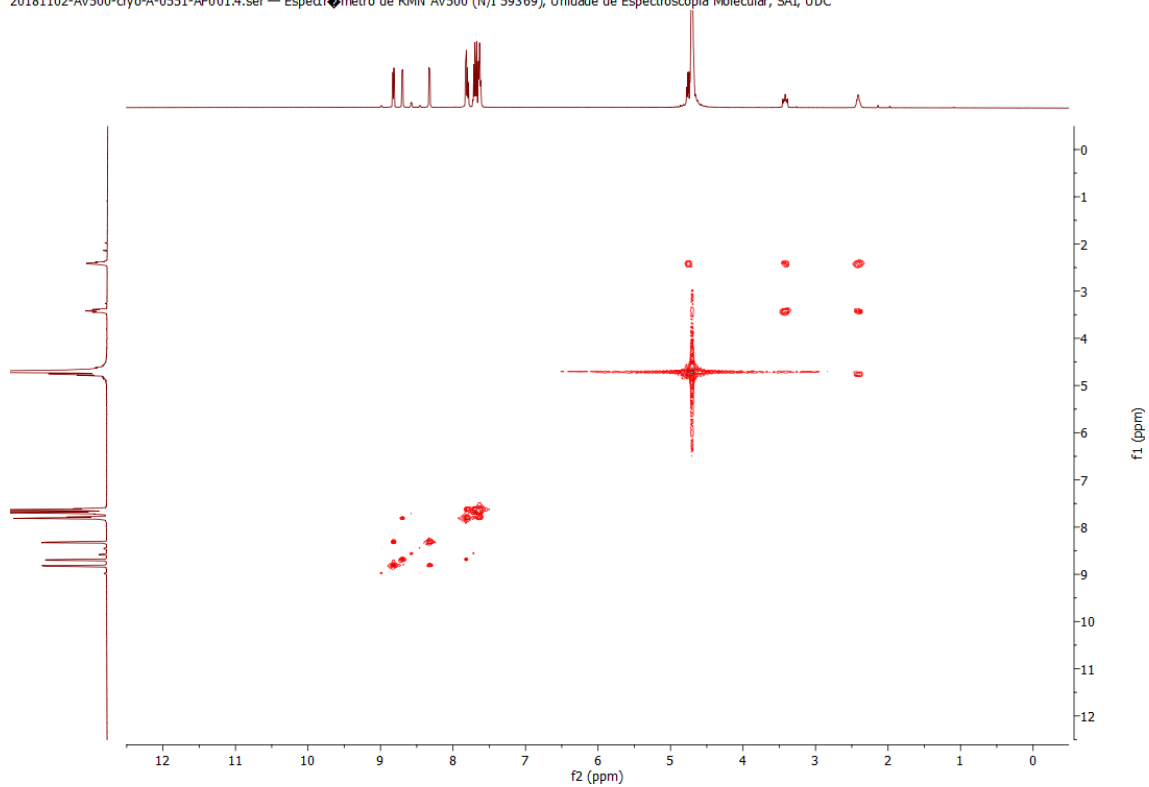
¹H-RMN (500 MHz, D₂O)



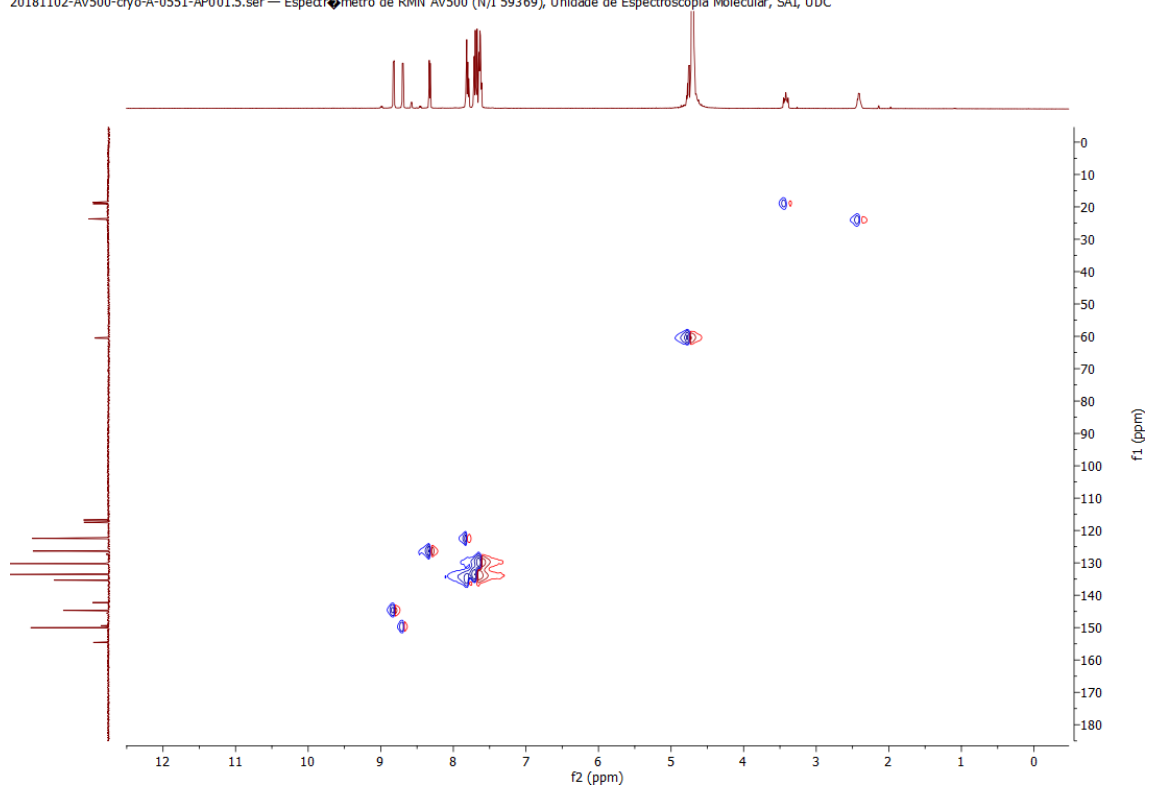
¹³C-RMN (500 MHz, D₂O)



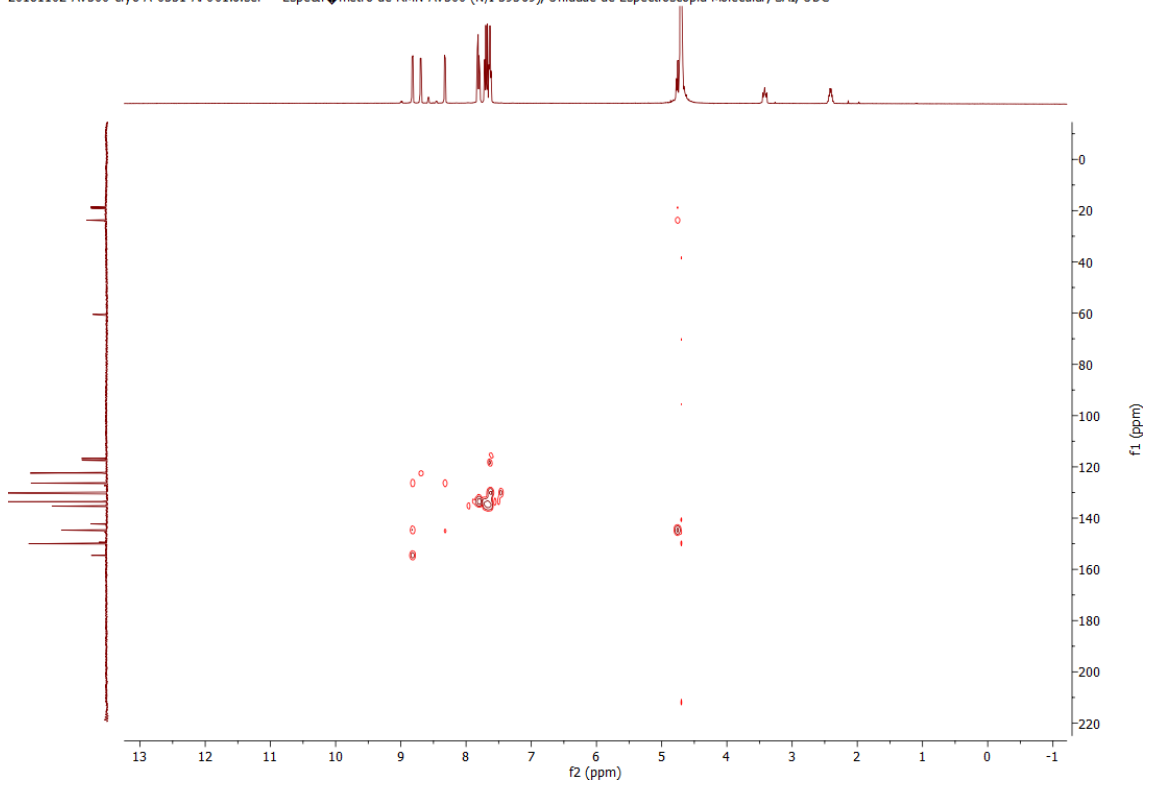
¹³C-RMN, DEPT (500 MHz, D₂O)



¹H-RMN, COSY (500 MHz, D₂O)



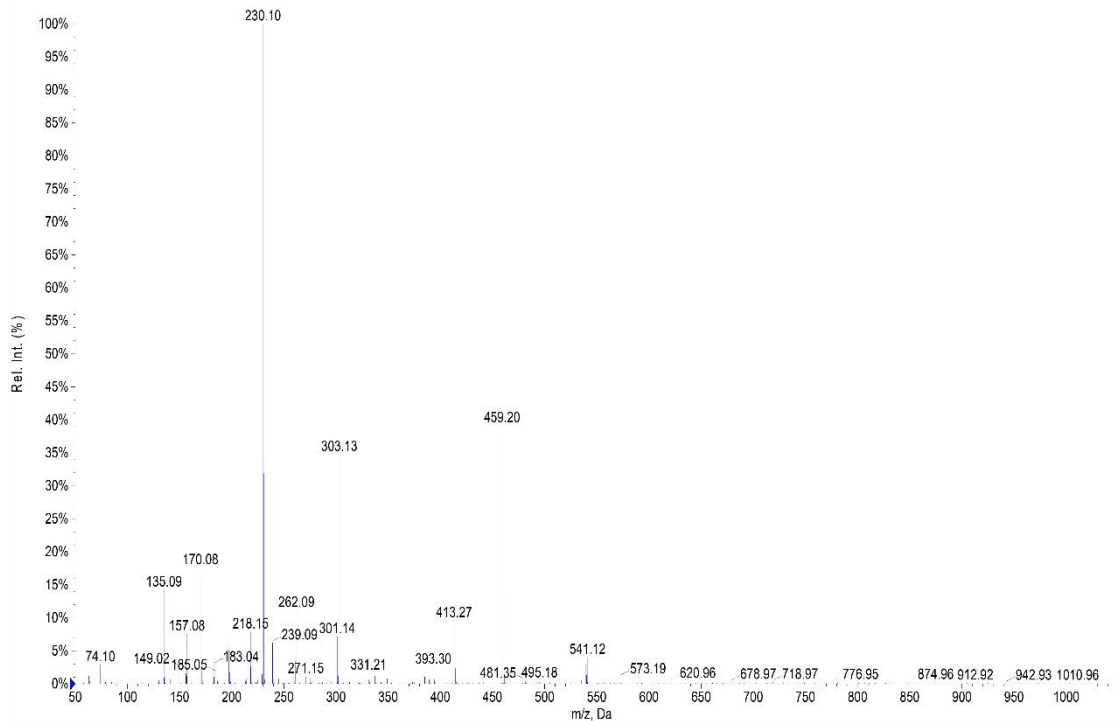
¹H-RMN & ¹³C-RMN, HSQC (500 MHz, D₂O)



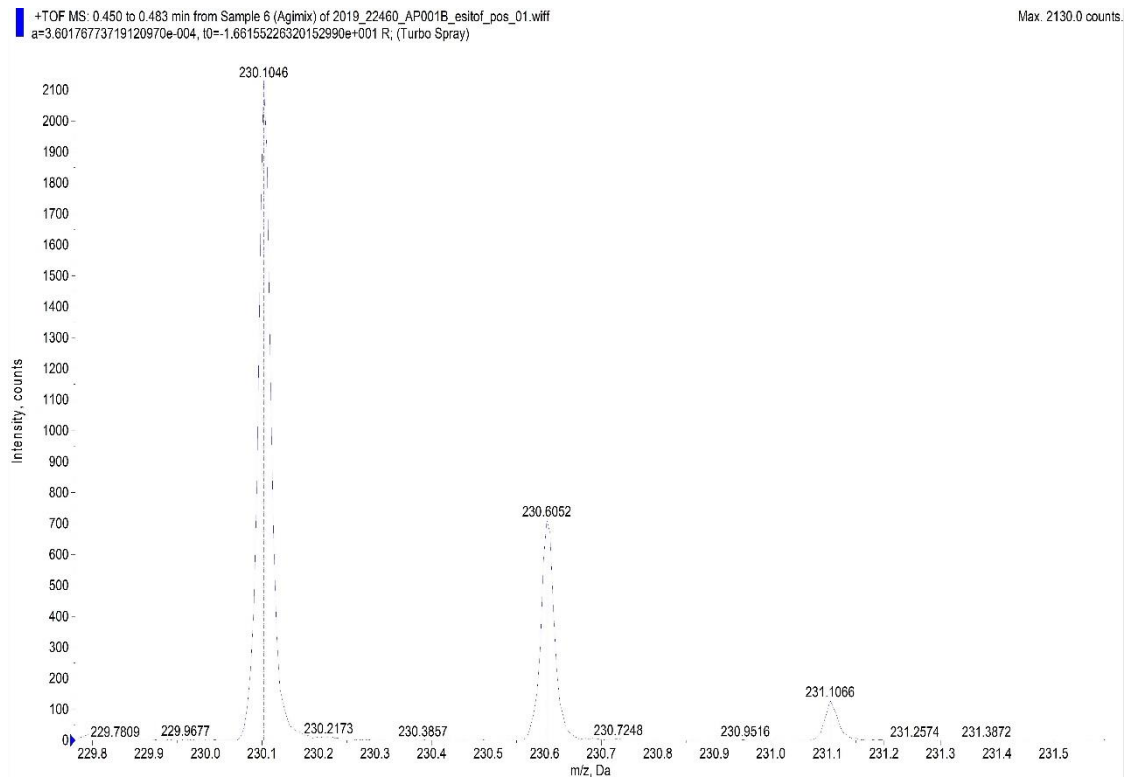
¹³C-RMN, HMBC (500 MHz, D₂O)

+TOF MS: 0.450 to 0.483 min from Sample 6 (Agimix) of 2019_22460_AP001B_esitof_pos_01.wiff
a=3.60176773719120970e-004, t0=-1.66155226320152990e+001 R; (Turbo Spray)

Max. 2130.0 counts



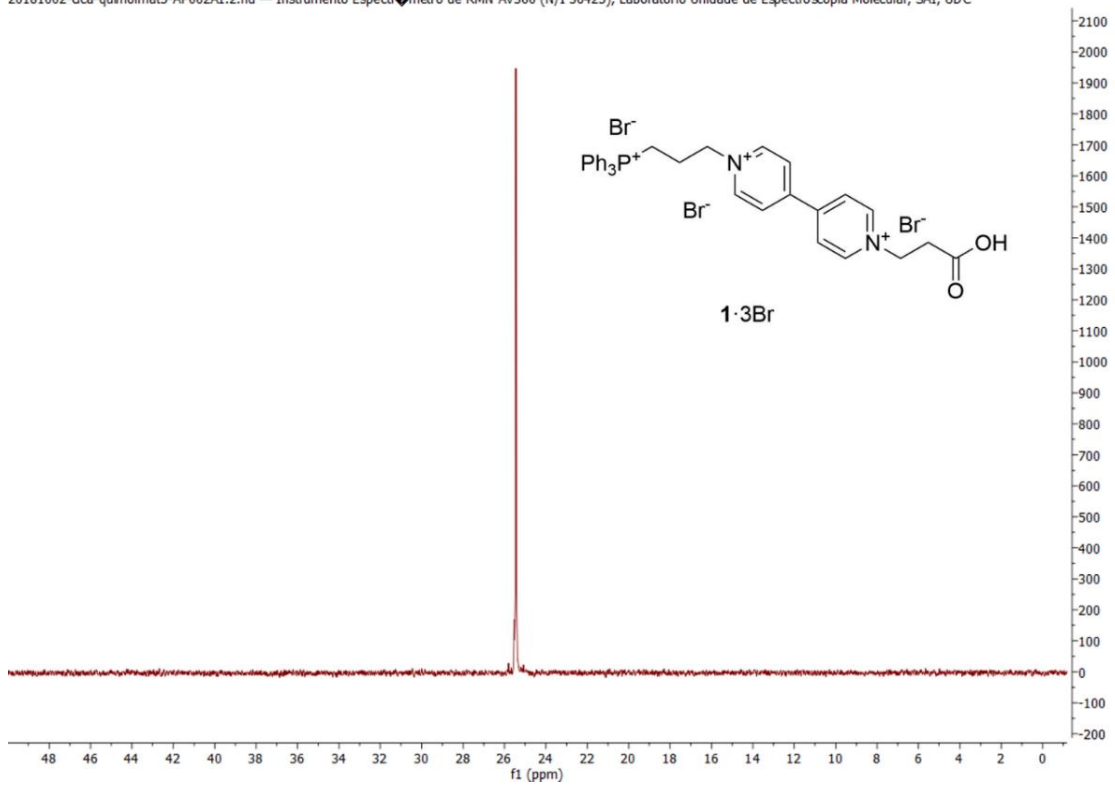
ESI-MS baixa resolución



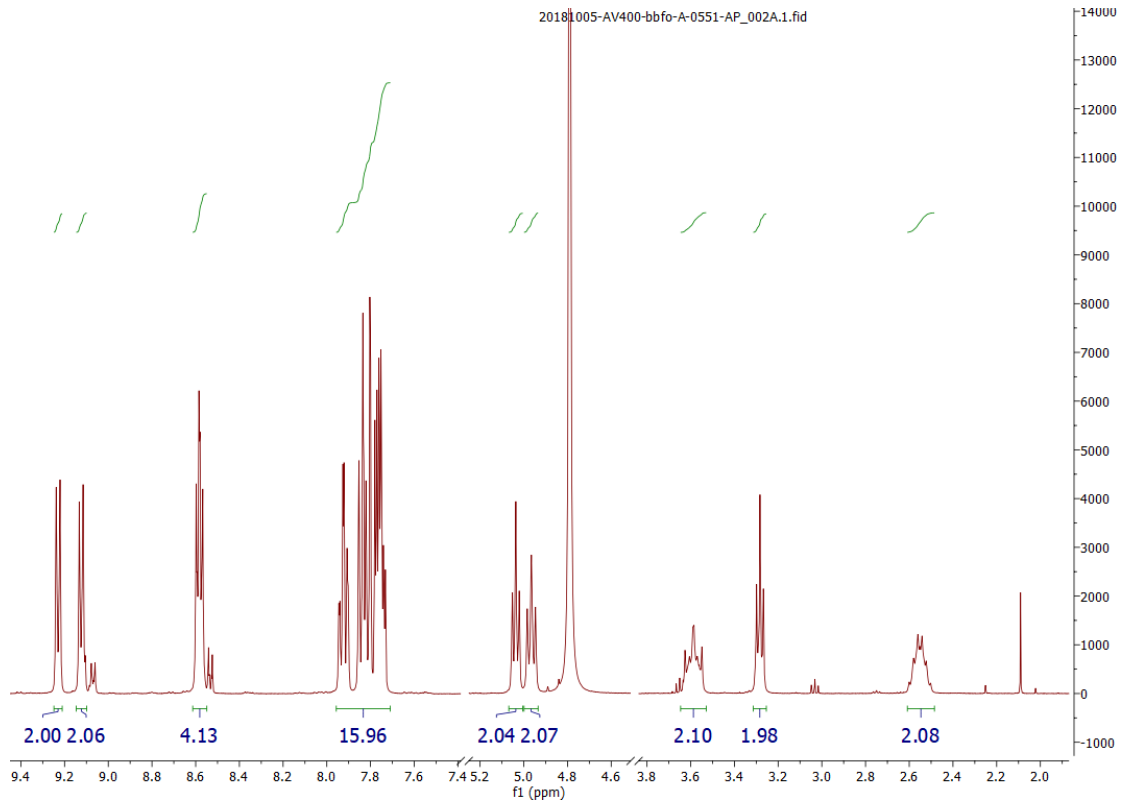
ESI-MS alta resolución

COMPOSTO 1·3Br

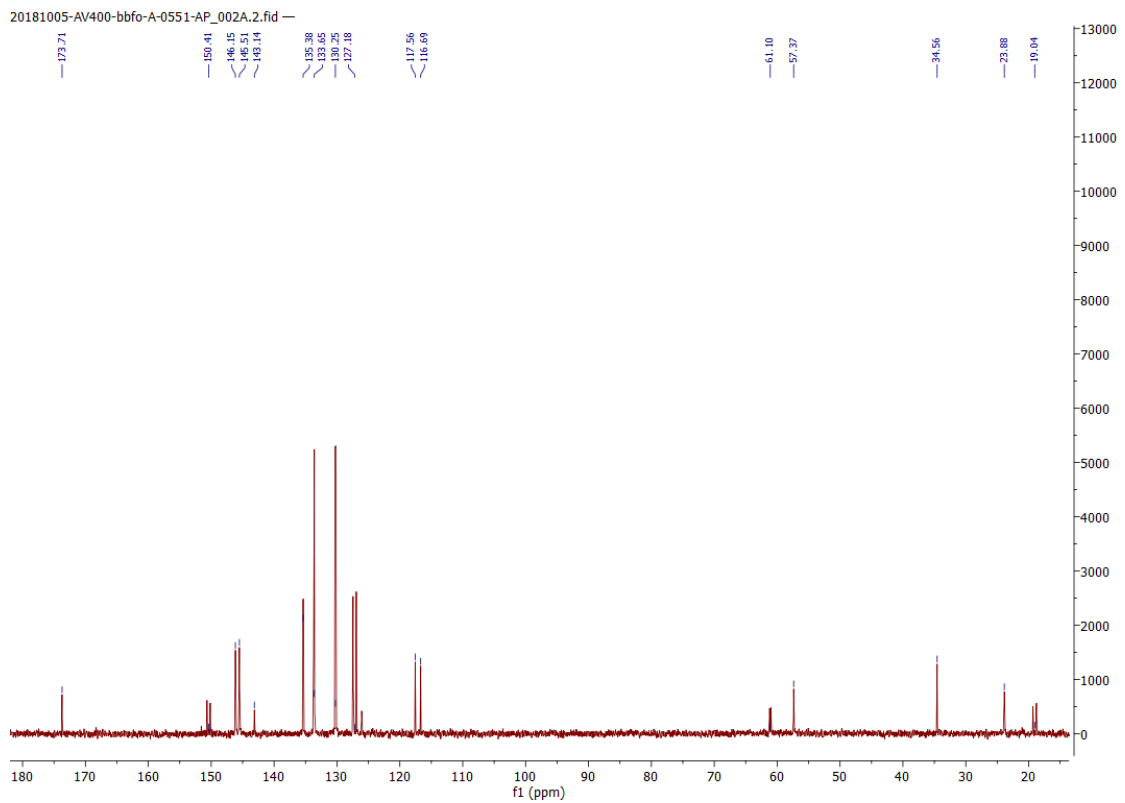
20181002-dca-quimolmat5-AP002A1.2.fid — Instrumento Espectrometro de RMN AV300 (N/I 36425), Laboratorio Unidade de Espectroscopia Molecular, SAI, UDC



³¹P-RMN (300 MHz, D₂O)

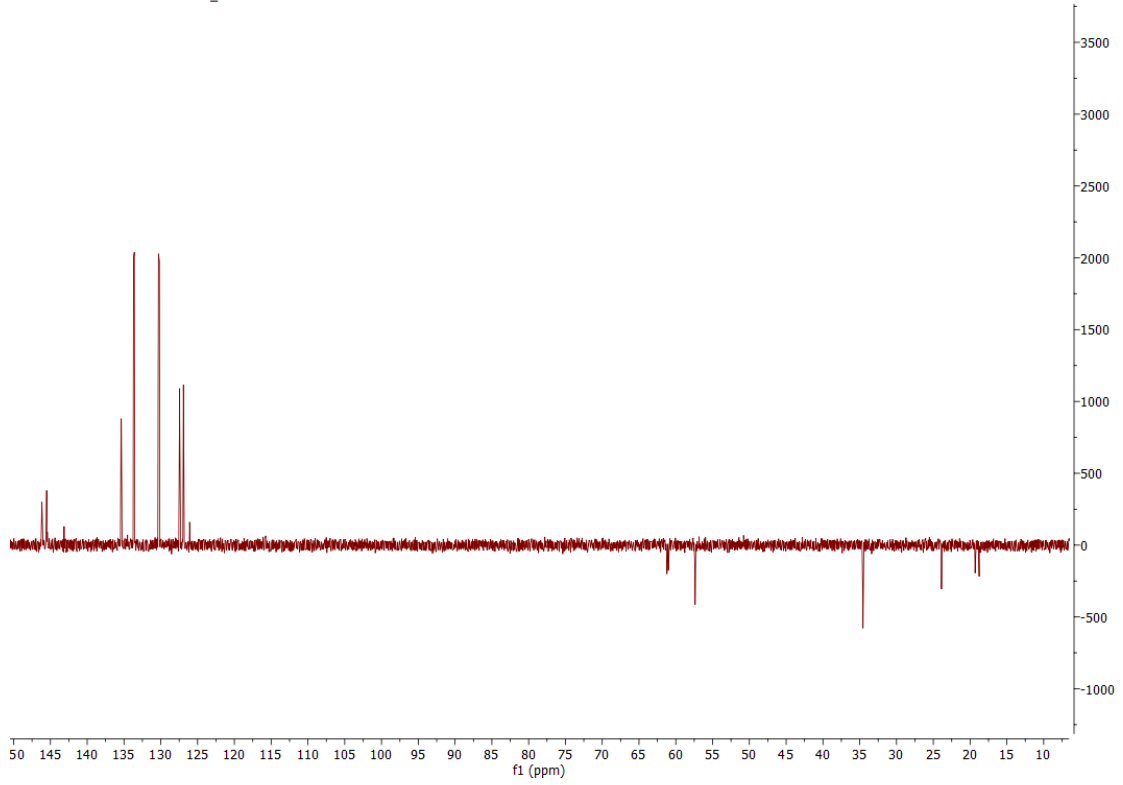


¹H-RMN (500 MHz, D₂O)



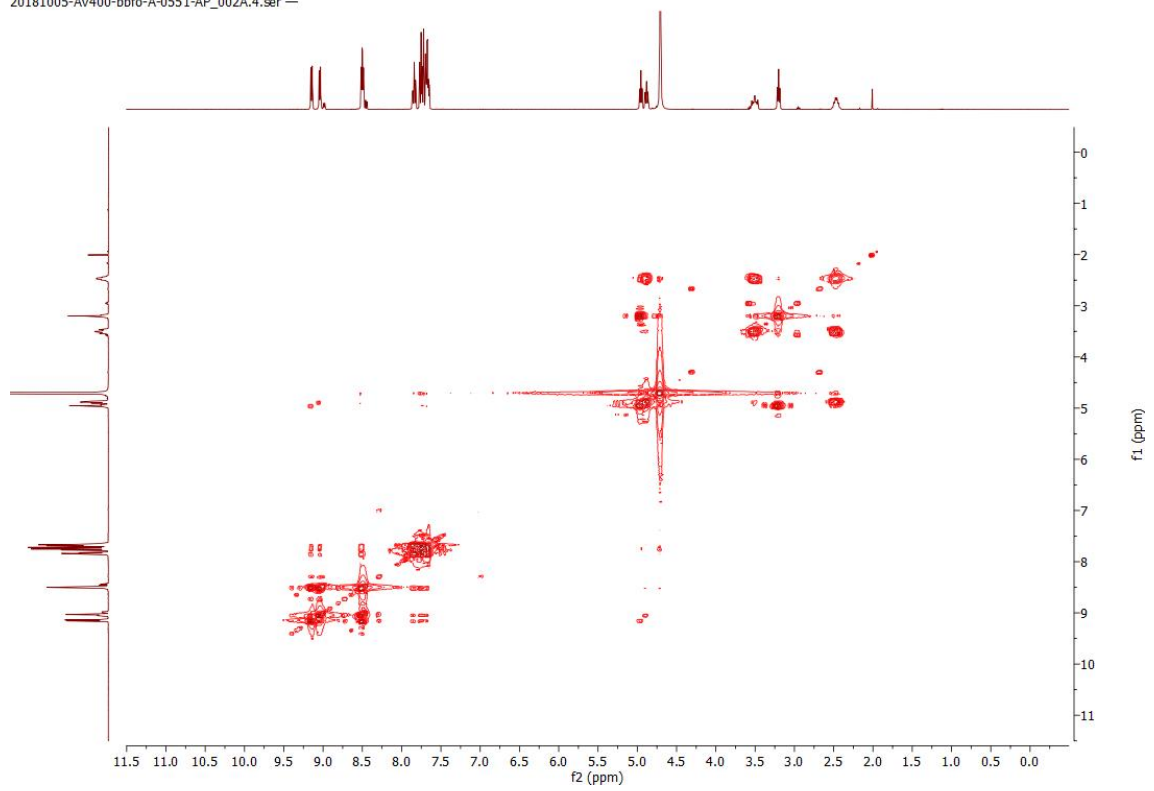
¹³C-RMN (500 MHz, D₂O)

20181005-AV400-bbfo-A-0551-AP_002A.3.fid —



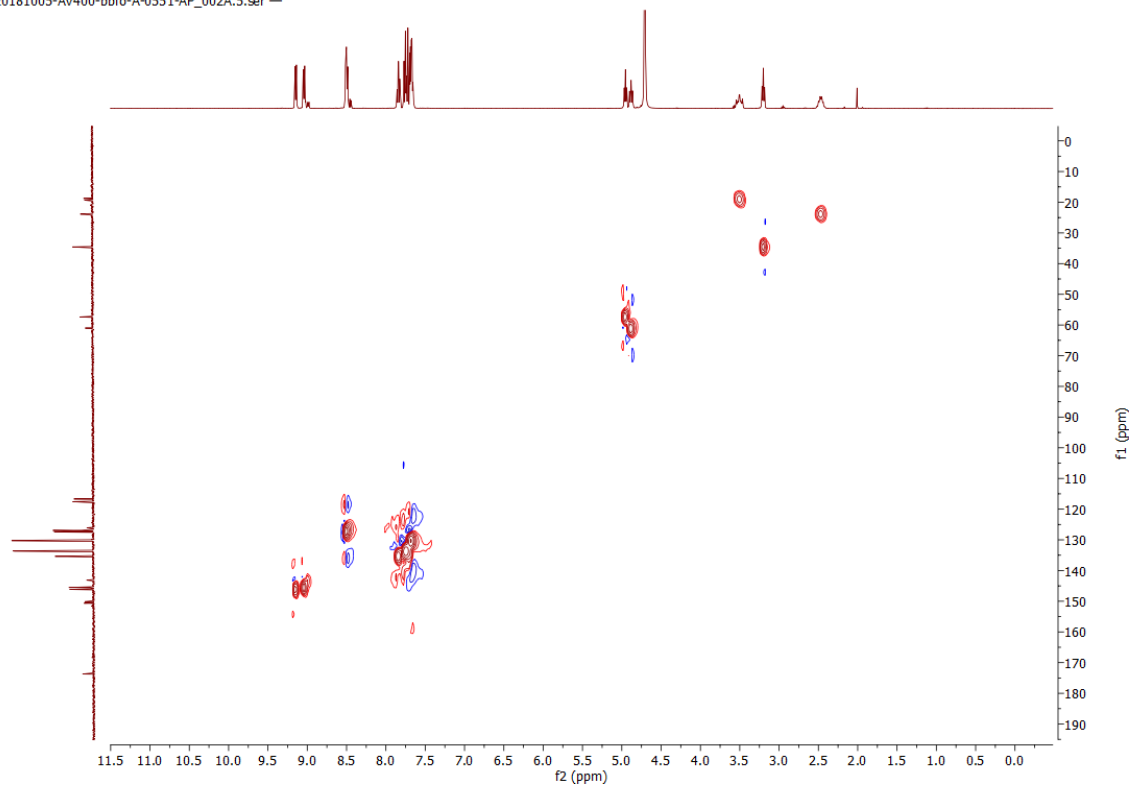
^{13}C -RMN, DEPT (500 MHz, D_2O)

20181005-AV400-bbfo-A-0551-AP_002A.4.ser —



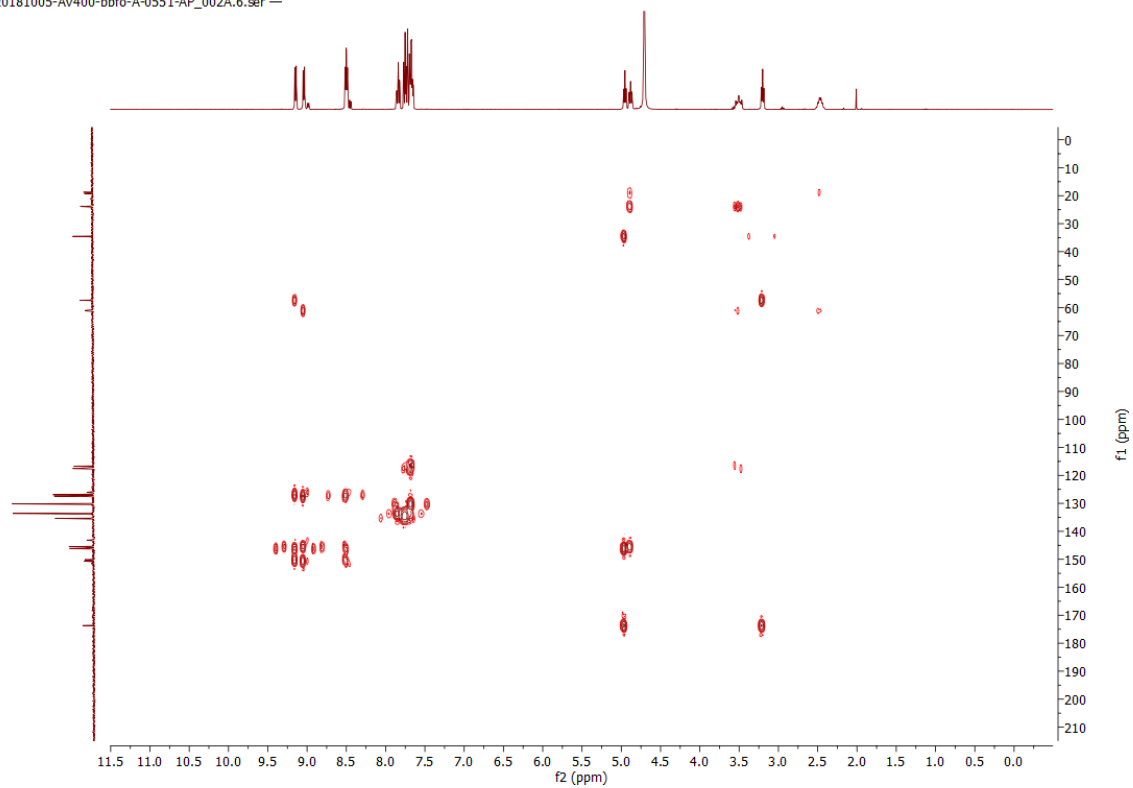
^1H -RMN, COSY (500 MHz, D_2O)

20181005-AV400-bbfo-A-0551-AP_002A.5.ser



^1H -RMN & ^{13}C -RMN, HSQC (500 MHz, D_2O)

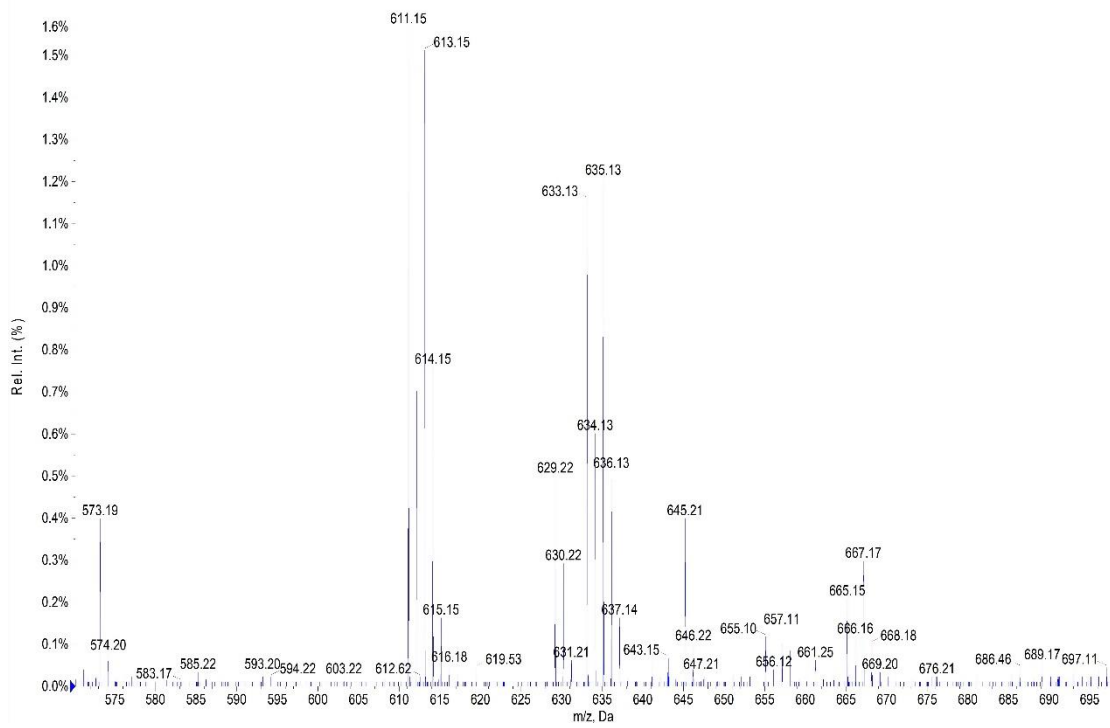
20181005-AV400-bbfo-A-0551-AP_002A.6.ser



^{13}C -RMN, HMBC (500 MHz, D_2O)

+TOF MS: 0.800 to 0.883 min from Sample 2 (AP-002A, MeOH) of 2018_37106_AP-002A_esitof_pos_01.wiff
a=3.60129586099519060e-004, t0=-1.70530086759566150e+001 R; (Turbo Spray)

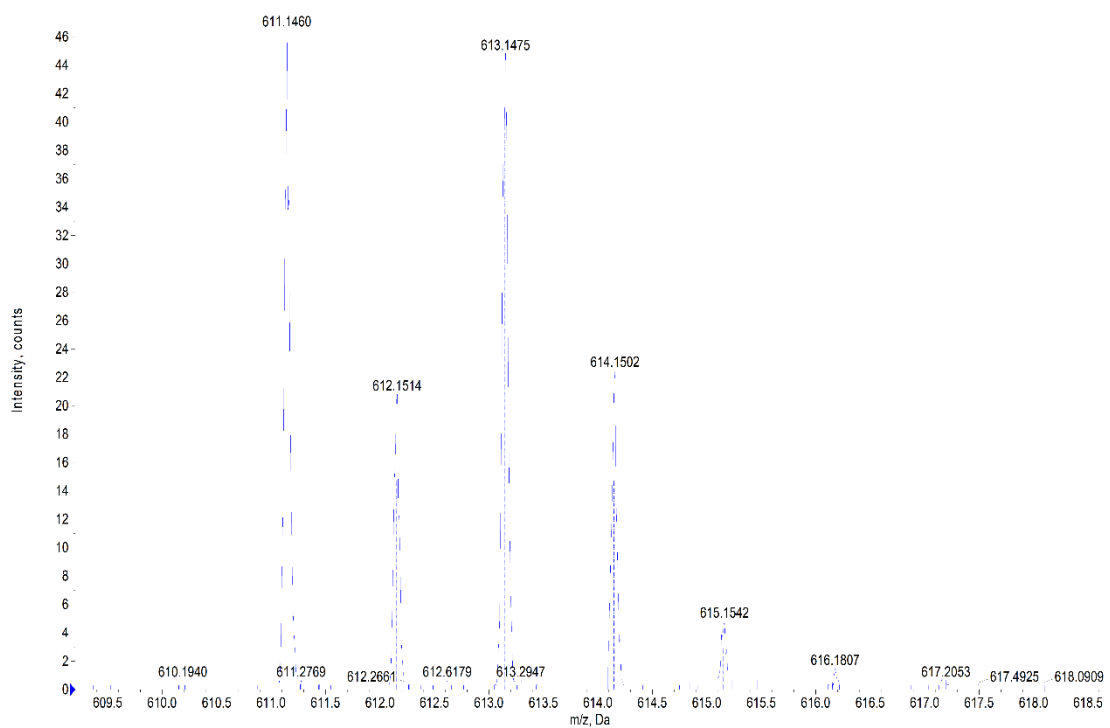
Max. 2965.3 counts



ESI-MS baixa resolución

+TOF MS: 0.800 to 0.883 min from Sample 2 (AP-002A, MeOH) of 2018_37106_AP-002A_esitof_pos_01.wiff
a=3.60129586099519060e-004, t0=-1.70530086759566150e+001 R; (Turbo Spray)

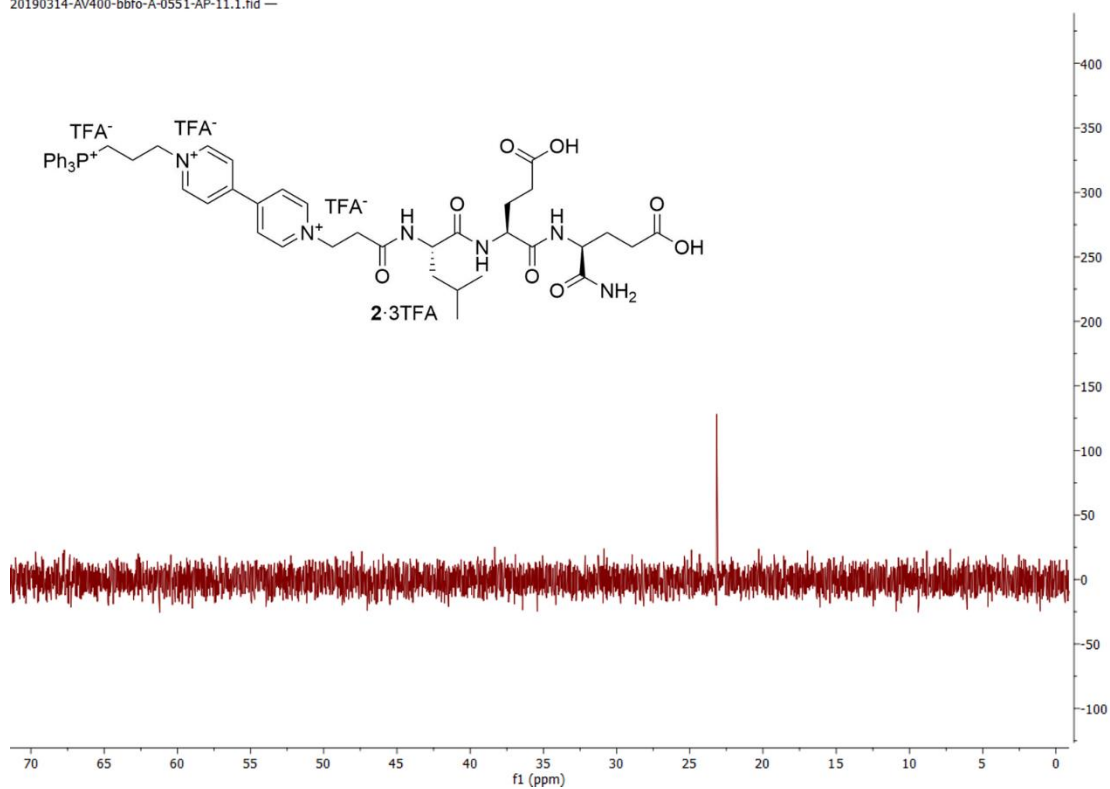
Max. 2965.3 counts



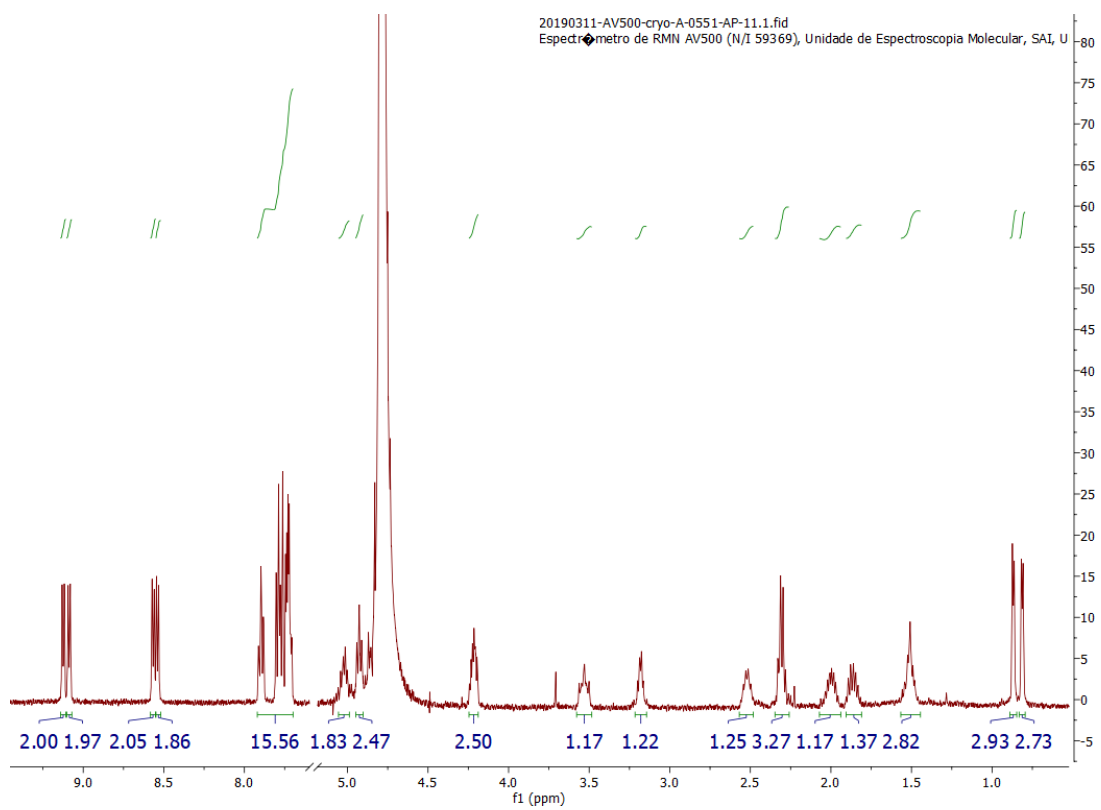
ESI-MS alta resolución

COMPOSTO 2·3TFA

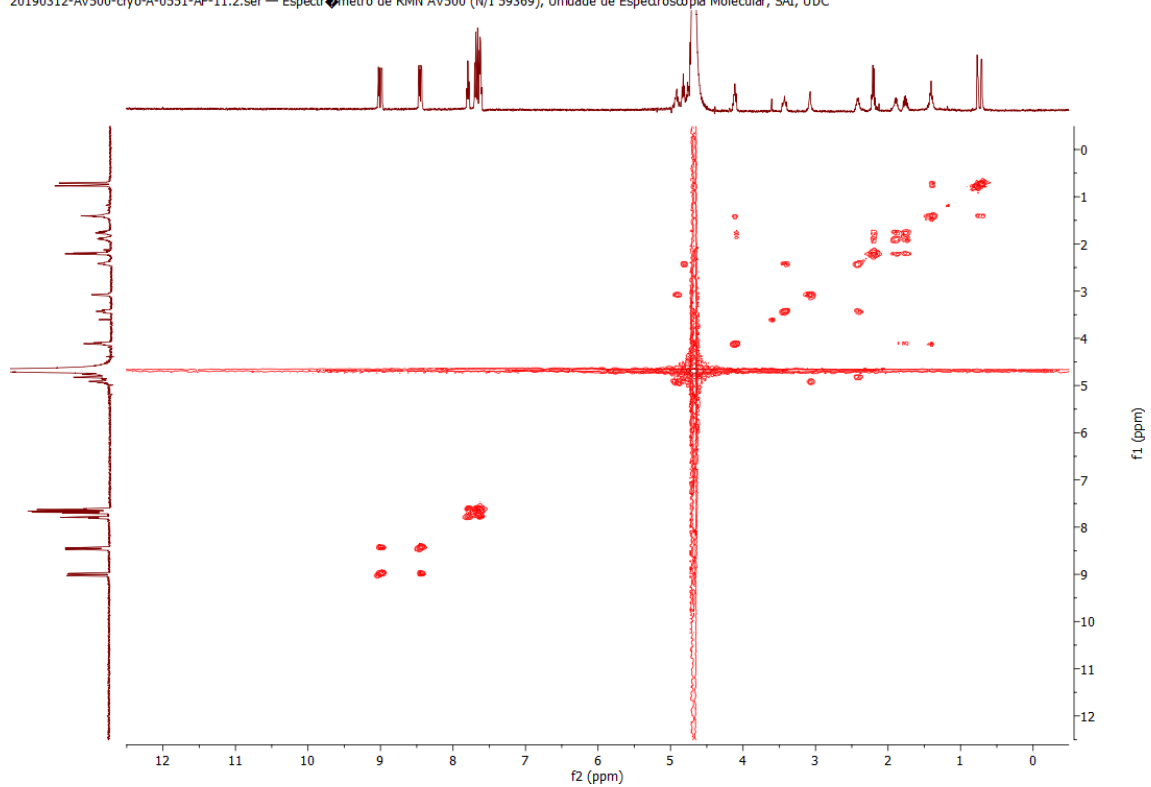
20190314-AV400-bbfo-A-0551-AP-11.1.fid



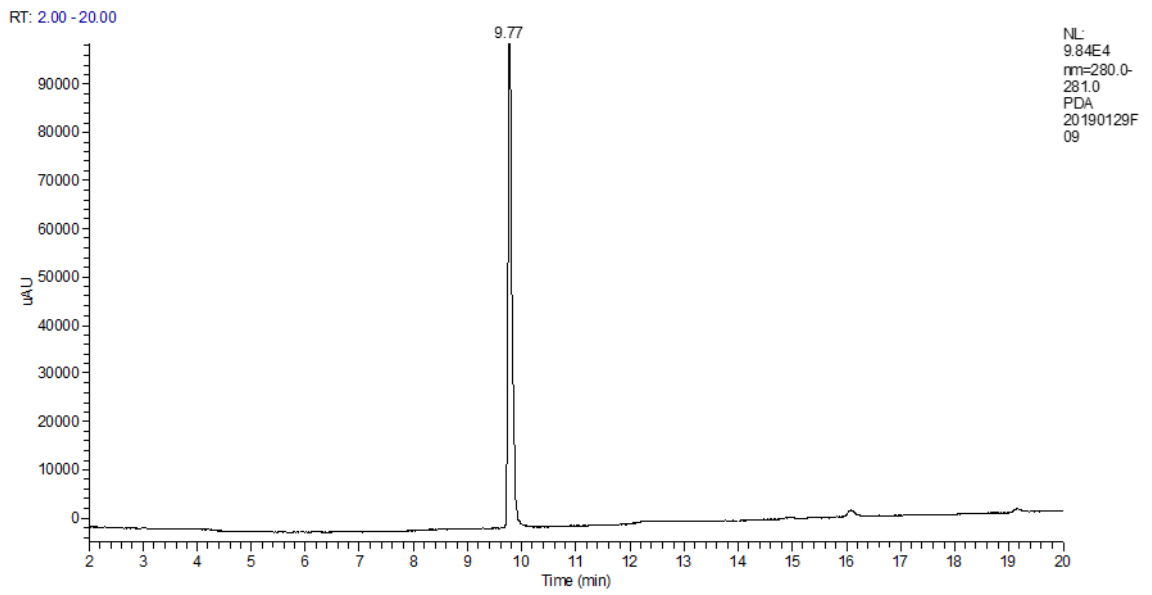
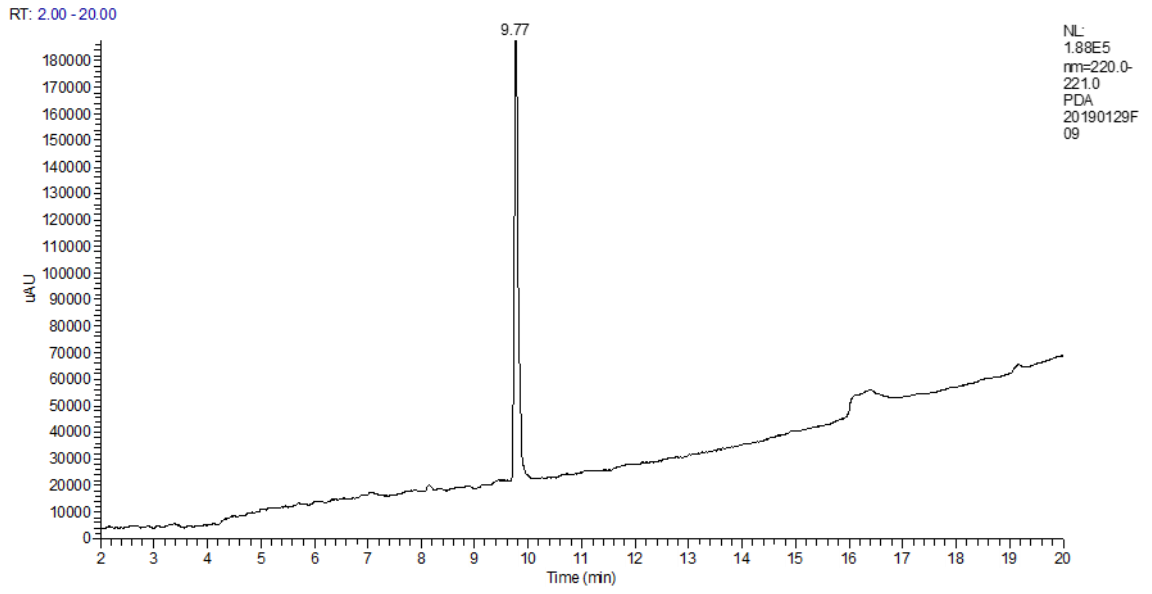
³¹P-RMN (300 MHz, D₂O)



¹H-RMN (500 MHz, D₂O)

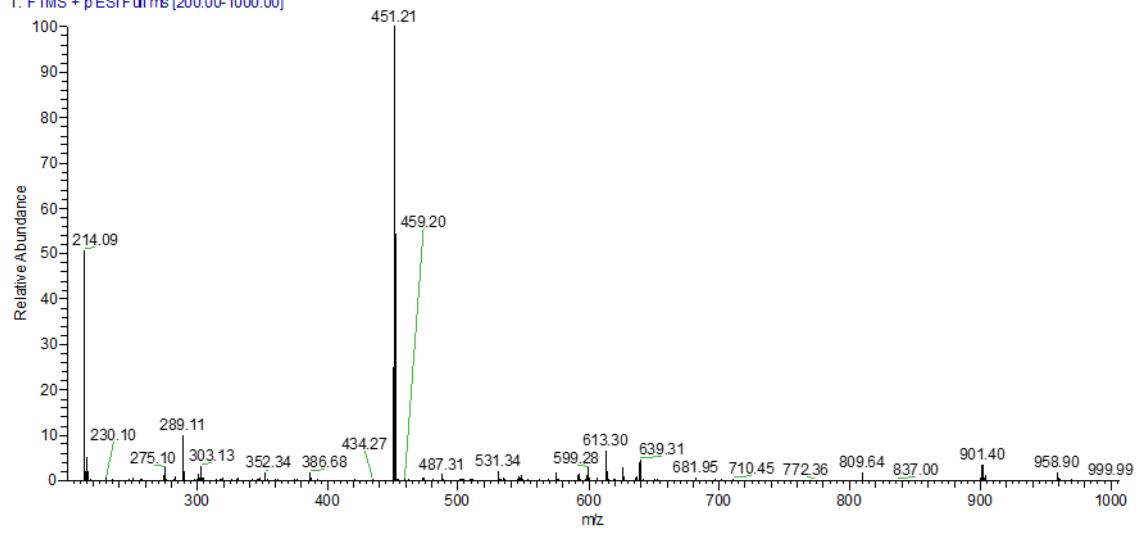


^1H -RMN, COSY (500 MHz, D_2O)



Cromatogramas de HPLC a 220 nm (arriba) e 280 nm (abaixo).

20190129F09 #611-643 RT: 9.69-10.20 AV: 33 NL: 6.22E6
T: FTMS + pESI Full ms [200.00-1000.00]



Espectro de ESI-MS correspondente ao pico com t_R 9.77 min.