

# Grado en Química

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**APLICACIÓN DE CONJUGADOS VIOLÓGENO-PÉPTIDO EN  
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR**

**APLICACIÓN DE CONXUGADOS VIOLÓXENO-PÉPTIDO EN  
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR**

**APPLICATION OF VIOLOGEN-PEPTIDE CONJUGATES IN  
SUPRAMOLECULAR CHEMISTRY**

**Laura Ferreiro Santos**

**Curso: 2020 - 2021.**

**Convocatoria: Enero**

*Director 1: Carlos Peinador Veira*  
*Director 2: Elena Pazos Chantrero*



## **Agradecimientos**

Quiero dar las gracias a mis tutores Dr. Carlos Peinador Veira y a Dra. Elena Pazos Chantrero por la ayuda prestada durante la realización de este TFG y a su grupo de investigación QUIMOLMAT 5.

En especial, me gustaría dar las gracias a Iago y a Liliana por todo lo que me han enseñado y por ser tan pacientes y amables conmigo.

También quiero agradecerles a mi familia y amigos su apoyo durante esta etapa.



# Índice

Abreviaturas .....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	11
Química supramolecular.....	12
Química receptor-sustrato.....	13
Síntesis de péptidos en fase sólida .....	16
Objetivos .....	21
Discusión de resultados.....	22
Síntesis del intermedio A .....	23
Síntesis del intermedio B.....	28
Síntesis del viológeno-aminoácido .....	31
Formación del complejo de inclusión viológeno-aminoácido:CB[7] .....	34
Valoración por <sup>1</sup> H-RMN .....	34
Valoración por UV .....	36
Síntesis del conjugado viológeno-péptido.....	37
Parte experimental .....	39
General .....	39
Síntesis de bromuro de 1-(2-aminoetil)-(4,4'-bipiridin)-1-io .....	40
Síntesis de cloruro de 1-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1-io. Protección de la amina con el grupo Alloc.....	41
Síntesis del cloruro de 1-(4-carboxibenzil)-1'-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1,1'-diio.....	42
Síntesis de péptidos en fase sólida. Síntesis del conjugado viológeno-péptido. ....	43
Preparación de la resina.....	43
Acoplamiento de los aminoácidos.....	44
Lavados .....	44
Test TNBS .....	44
Desprotección de la amina. Eliminación del grupo Fmoc .....	44
Acoplamiento del viológeno.....	44
Desprotección de la amina. Eliminación del grupo Alloc .....	45
Ruptura del enlace péptido-resina.....	45
Conclusiones .....	46
Bibliografía.....	50
Anexo .....	52



## Abreviaturas

**Å** Angström ( $10^{-10}$  m)

**Alloc** Formiato de alilo

**Bn** Bencil

**Boc** tert-butoxicarbonil

**°C** Grado centígrado

**CB[n]** Cucurbit[n]urilo

**COSY** Correlation spectroscopy

**d** Doblete

**dd** Doble doblete

**ESI** Electrospray ionization

**Fmoc** 9-fluorenilmetoxicarbonil

**g** Gramo

**HMBC** Heteronuclear Multiple Bond  
Correlation

**HRMS** High Resolution Mass  
Spectrometry

**HSQC** Heteronuclear single quantum  
correlation

**Hz** Hercio

**J** Constante de acoplamiento

**kJ** Kilojulio

**M** Molaridad

**m** Multiplete

**mL** Mililitro

**mmol** Milimol

**MS** Espectrometría de masas

**m/z** Relación de masa carga

**ppm** Partes por millón

**RMN** Resonancia magnética nuclear

**RMN-<sup>13</sup>C** Resonancia magnética de  
carbono

**RMN-<sup>1</sup>H** Resonancia magnética de  
protón

**s** Singulete

**SPPS** Síntesis de péptidos en fase sólida

**T** Temperatura

**t** Triplete

**t-Bu** *tert*-butil

**TFA** Ácido trifluoroacético

**1D** Unidimensional

**2D** Bidimensional

[ ] Concentración

**δ** Desplazamiento químico

**μL** Microlitro

## Resumen

En este trabajo de fin de grado se realiza la síntesis de conjugados viológeno-péptido y su interacción con el cucurbit[7]urilo, que actúa como receptor molecular.

Para la síntesis del conjugado viológeno-péptido, se utilizó la 4,4-bipiridina como precursor y utilizando un mecanismo de dialquilación sucesiva, se obtiene el viológeno de interés. La conexión del derivado viológeno al péptido se llevó a cabo mediante la metodología de la síntesis de péptidos en fase sólida siguiendo la estrategia sintética Fmoc, se siguieron rutas sintéticas bien conocidas, en las que la unión se produjo mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo amino del péptido y el grupo carboxilo del viológeno.

Por último, se estudió mediante  $^1\text{H}$ -RMN y UV la interacción de este tipo de compuestos viológeno-peptido con el cucurbit[7]urilo como receptor molecular.

La caracterización de todos los compuestos e intermedios de reacción se realizó mediante RMN mono y bidimensional y mediante espectrometría de masas.

**Palabras clave:** química supramolecular, química receptor-sustrato, viológenos, aminoácidos, síntesis de péptidos en fase sólida, conjugados viológeno-péptido.

## Resumo

Neste traballo de fin de grao realizouse a síntese de conxugados violóxeno-péptido e a súa interacción con o cucurbit[7]urilo, que actúa como receptor molecular.

Para a síntese do conxugado violóxeno-péptido, utilizouse a 4,4'-bipiridina como precursor e, empregando un mecanismo de dialquilación sucesiva, obteuse o violóxeno de interese. A conexión do derivado violóxeno ao péptido levouse a cabo mediante a metodoloxía de síntese de péptidos en fase sólida seguindo a estratexía sintética Fmoc, para a cal, seguíronse rutas ben coñecidas, nas que a unión produciuse mediante a formación dun enlace peptídico entre o grupo amino do péptido e o grupo carboxilo do violóxeno.

Por último, estudouse mediante  $^1\text{H}$ -RMN e UV a interacción deste tipo de compostos violóxeno-péptido con o cucurbit[7]urilo como receptor molecular.

A caracterización de todos os compostos e intermedios da reacción realizouse mediante RMN mono e bidimensionais e mediante espectrometría de masas.

**Palabras clave:** química supramolecular, química receptor-sustrato, violóxenos, aminoácidos, síntese de péptidos en fase sólida, conxugados violóxeno-péptido.

## Summary

In this end-of-grade work, the synthesis of viologen-peptide conjugates and their interaction with the cucurbit[7]uril, which acts as a molecular receptor, was carried out.

For the synthesis of the viologen-peptide conjugate, 4,4'-bipyridine was used as a precursor and, using a successive dialkylation mechanism, the viologen of interest was obtained. The synthesis of the viologen-peptide conjugate was carried out by solid phase peptides synthesis following standard Fmoc protocols, and the connection of both units was performed through a peptide bond between the amino group of the peptide and the carboxyl group of the viologen.

Finally, the interaction of this type of viologen-peptide conjugate with the cucurbit[7]uril as receptor was studied by  $^1\text{H-NMR}$  and UV.

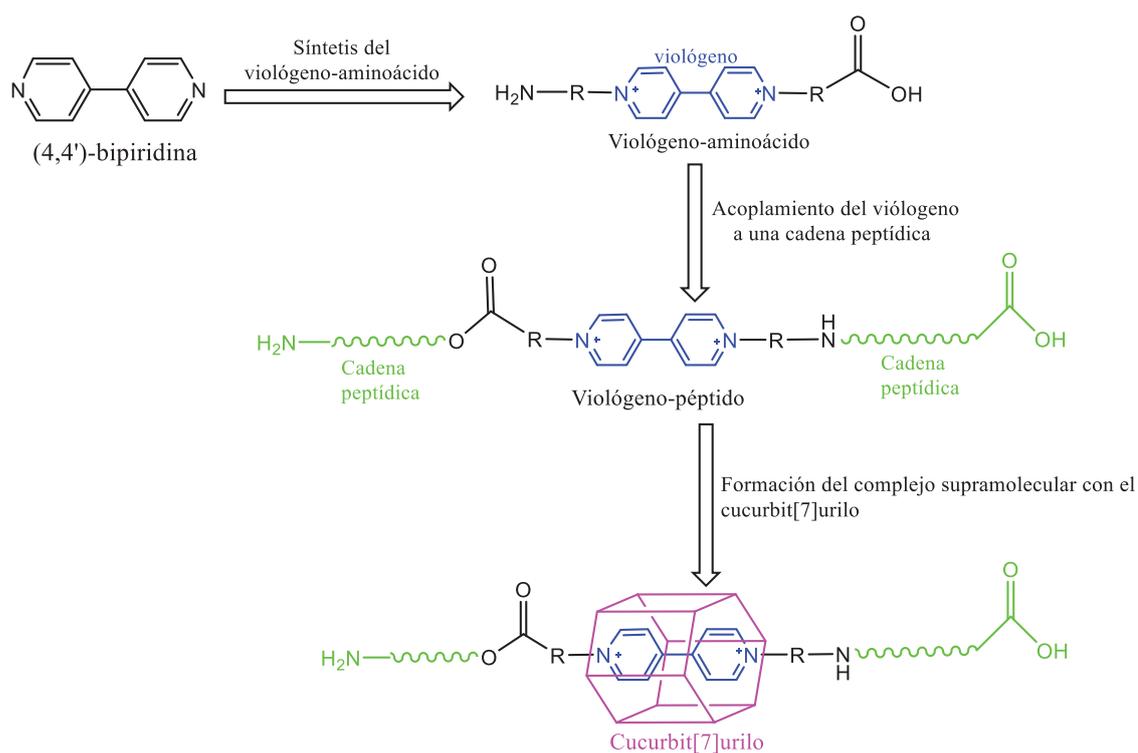
The characterization of all compounds and reaction intermediates was performed by mono and two-dimensional NMR and mass spectrometry.

**Keywords:** supramolecular chemistry, host-guest chemistry, viologens, amino acids, solid phase peptide synthesis, viologen-peptide conjugates.

## Introducción

Este trabajo de fin de grado se centra en la preparación de conjugados viológeno-peptido y su uso en el campo de la química supramolecular. Viológeno es el nombre vulgar por el que se conoce a las sales *N,N'*-dialquiladas de la 4,4'-bipiridina. Para ello, se realizará la síntesis de compuestos viológeno-aminoácido, tras la cual, se buscará la incorporación de estos aminoácidos sintéticos en cadenas peptídicas y también se estudiarán las propiedades de estos péptidos siguiendo el modelo receptor-sustrato, utilizando como receptor molecular el cucurbit[7]urilo. Este TFG se encuentra englobado dentro de un proyecto de investigación más amplio realizado por el grupo de investigación Quimolmat.

En la figura 1, se recogen de forma esquemática los procesos que han sido realizados para la preparación de este trabajo.



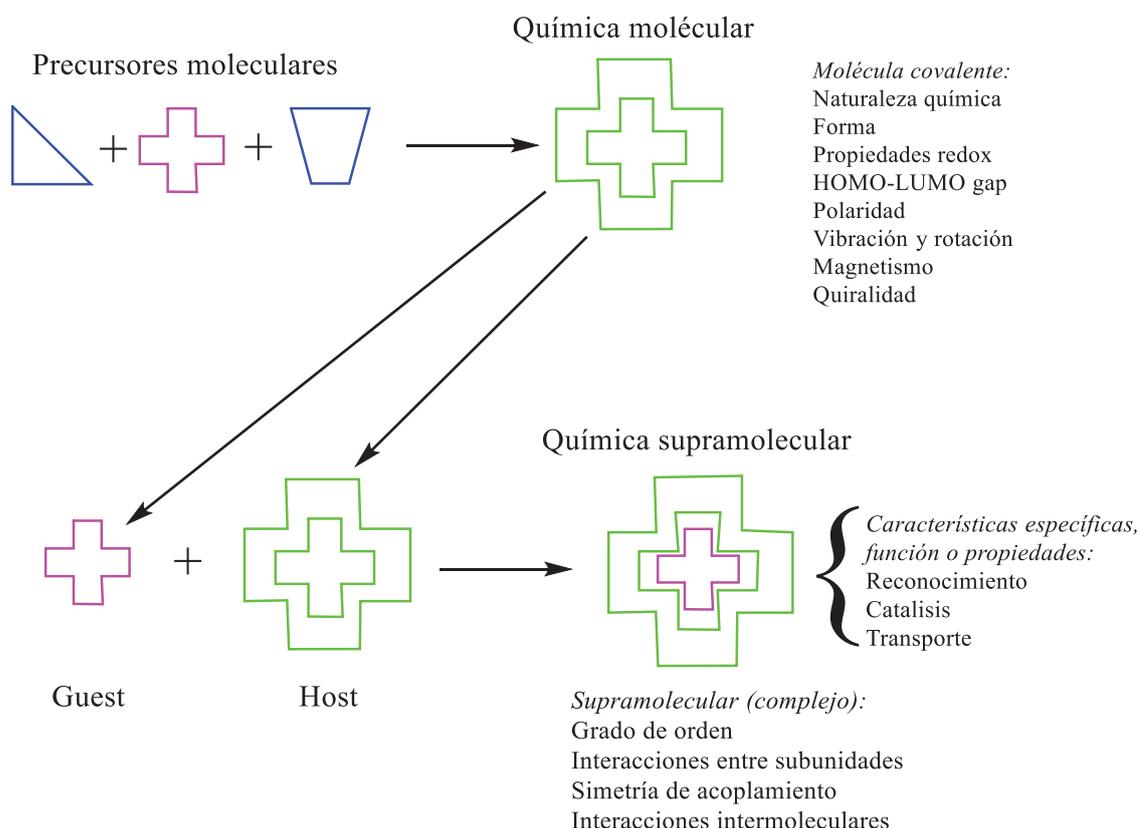
**Figura 1.** Esquema del trabajo de fin de grado

En esta introducción, se contextualizará lo que es la química supramolecular, se tratará en que consiste y como se realiza la síntesis conjugado del viológeno-peptido, haciendo un mayor hincapié en los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida y también se hablará brevemente, según el modelo de receptor-sustrato, de la función de los cucurbit[*n*]urilos como receptores moleculares.

## Química supramolecular

La química supramolecular se encuentra desde hace aproximadamente 25 años en un proceso de expansión muy amplio, debido a la gran variedad de sistemas químicos que esta engloba. Uno de los principales pioneros en el campo de la química supramolecular ha sido, Jean-Marie Lehn, quien ganó el premio Nobel en 1987, por publicaciones como “química de los ensamblajes moleculares y del enlace intermolecular” y, definió la química supramolecular como “la química más allá de la molécula”.<sup>1</sup>

Desde sus orígenes la química supramolecular, inspirada en la biología, se basa en el estudio de las interacciones no covalentes entre moléculas como, por ejemplo: enlaces de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas o interacciones electrostáticas. Mediante este tipo de interacciones, que se pueden producir entre dos o más moléculas, se obtienen nuevos sistemas más complejos (figura 2).



**Figura 2.** Comparación entre el enlace molecular y supramolecular de acuerdo con Lehn.

El caso conceptualmente más sencillo de proceso de autoensamblaje es el modelo de interacción de especies Host-Guest. Para definir como se produce la interacción entre ambas, se considera que una molécula que actúa como sustrato (guest) interacciona con otra que actúa como receptor (host), dando lugar a un complejo receptor-sustrato.<sup>2</sup>

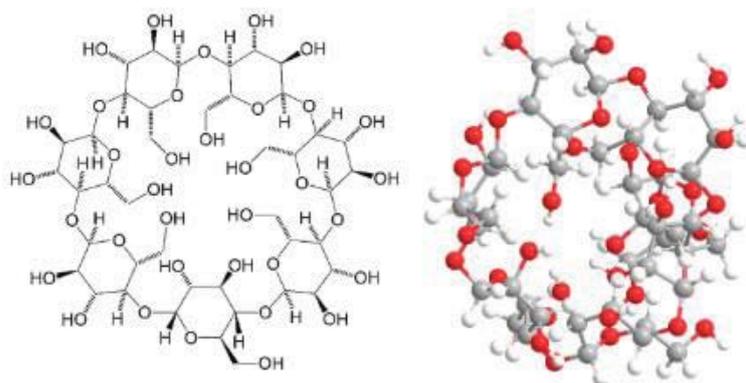
Normalmente, la molécula receptora se corresponde con una molécula de gran tamaño o con un agregado, por ejemplo, una enzima, mientras que el sustrato suele ser una especie inorgánica u otro tipo de moléculas orgánicas, como hormonas, neurotransmisores, feromonas, etc.

### Química receptor-sustrato

Como ya se mencionó en el apartado anterior, los mecanismos de unión entre un sustrato y su receptor ocurren mediante fenómenos de autoensamblaje, que se basan en la interacción de varias moléculas mediante enlaces no covalentes.

Desde que, en 1967, Charles Peterson sintetizó los ésteres corona, inspiró el desarrollo posterior de la química sustrato-receptor, lo cual generó una gran cantidad de compuestos que han presentado utilidad en este campo,<sup>3</sup> pero cabe destacar otras familias de receptores que han tomado un mayor protagonismo por su aplicación en otros campos de investigación, estas son: las ciclodextrinas, calixarenos, cucurbiturilos y pilarenos.

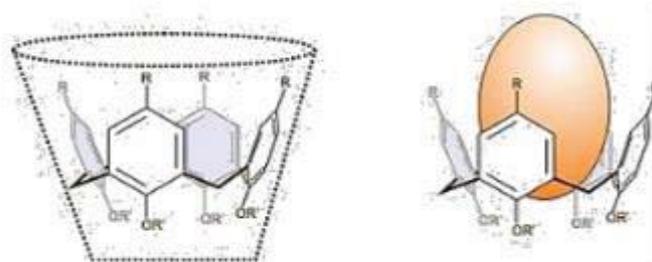
Las ciclodextrinas son compuestos que pertenecen a la primera generación de macrociclos. Estos están formados por la ciclación de seis o más unidades de glucosa como se puede observar en la figura 3, en las que la disposición de estas unidades provoca que las ciclodextrinas presenten una conformación en forma de tonel con un exterior hidrofílico y un interior hidrofóbico.<sup>4</sup> Estas características convierten a las ciclodextrinas en unos magníficos receptores de sustratos apolares en medio acuoso.



**Figura 3.** Estructura de una ciclodextrina

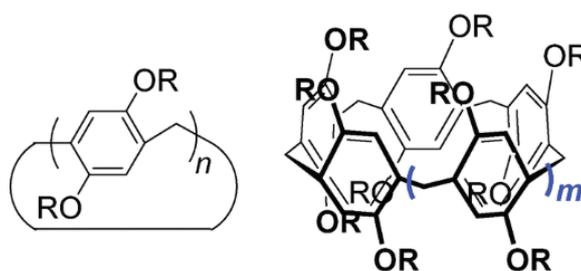
Los calixarenos son oligómeros cíclicos de fenol unidos por puentes de metileno en sus posiciones 2,6-(meta) (figura 4), que presentan una estructura con forma de cáliz. Estos macrociclos tienen un borde superior en forma de cono con propiedades hidrófobas debido a la presencia de los grupos metileno, y un borde inferior más estrecho hidrófilo

debido a los grupos hidroxilo del fenol <sup>5</sup>, con lo cual, la polaridad varía en los extremos de la estructura, es decir, uno de los bordes del cáliz es polar mientras que el otro es no polar. Esta polaridad es modulable y por tanto variaría a su vez las propiedades de la interacción sustrato-receptor, siendo posible formar complejos en medios orgánicos con especies catiónicas aromáticas debido a la capacidad donadora de las especies fenólicas <sup>6,7</sup>. Este motivo ha hecho que este receptor haya tenido una gran acogida dentro del ámbito químico para conseguir un mayor conocimiento de la química supramolecular.



**Figura 4.** Estructura de los calixarenos

Los pilarenos son un conjunto de receptores macrocíclicos formados por unidades de hidroquinona unidos por grupos metileno de las posiciones 2-5 como se ve en la figura 5. Han estado bajo investigación durante los últimos años, debido a sus estructuras únicas y a sus propiedades de interacción receptor-sustrato modificables, que permiten la interacción con una amplia gama de huéspedes orgánicos por interacciones ion-dipolo o enlaces de hidrógeno.<sup>8,9</sup>

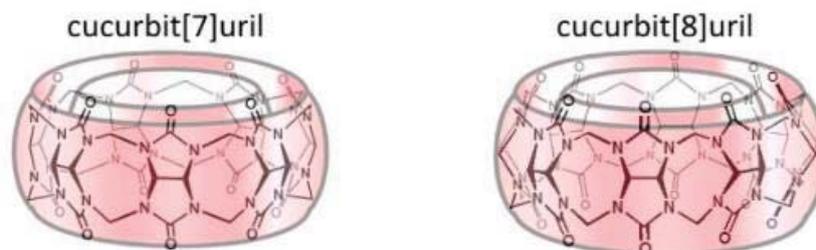


**Figura 5.** Estructura de los pilarenos

Dado que el cucurbiturilo es el receptor utilizado en este estudio se describirá a continuación en mayor profundidad esta familia de receptores moleculares.

Los cucurbit[*n*]urilos (CB[*n*]) son macrociclos sintéticos formados por monómeros de glicourilo unidos por puentes metileno que dan lugar a moléculas huecas que presentan forma de calabaza<sup>10</sup>. Estos receptores se caracterizan por presentar una cavidad

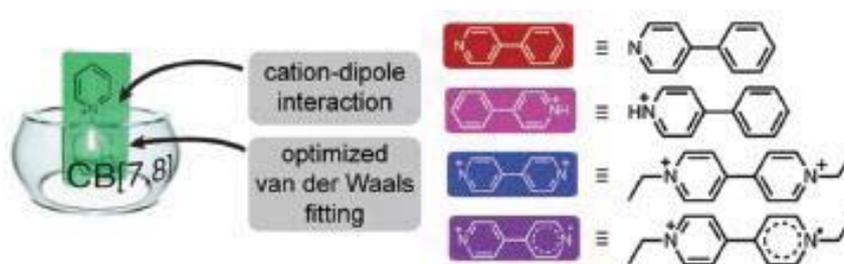
hidrofóbica con dos portales idénticos hidrofílicos y polares debido a la presencia de los grupos carbonilos en la estructura, lo que les proporciona también una buena solubilidad en agua. El tamaño de la cavidad está determinado por el número de monómeros que lo conforman. Por lo tanto, los cucurbit[ $n$ ]urilos se presentan en una variedad de tamaños que varía desde los cinco monómeros (CB[5]) hasta quince CB[15].



**Figura 6.** Estructuras del cucurbit[7]urilo y del cucurbit[8]urilo

La capacidad de los CB[ $n$ ] de actuar como receptores moleculares está determinada por su cavidad y sus portales. Como ya se ha mencionado, su cavidad está formada por grupos de carácter hidrofóbico y los portales o aberturas por grupos carbonilo. No es sorprendente, por tanto, que sean las fuerzas hidrofóbicas y las interacciones ion-dipolo o dipolo-dipolo las que dominen la formación de complejos de inclusión de los CB[ $n$ ].<sup>11,12</sup> Esta propiedad les permite mostrar una rica química receptor-sustrato.<sup>4</sup>

Por consiguiente, cationes orgánicos que presentan una parte apolar son sustratos ideales para los CB[ $n$ ]. Este es el caso de los viológenos que interactúan fuertemente con CB[7]. Los nitrógenos con carga positiva se sitúan en los portales del CB[7] estableciendo interacciones ion-dipolo con los carbonilos mientras que el sistema aromático se coloca en la cavidad del CB[7].

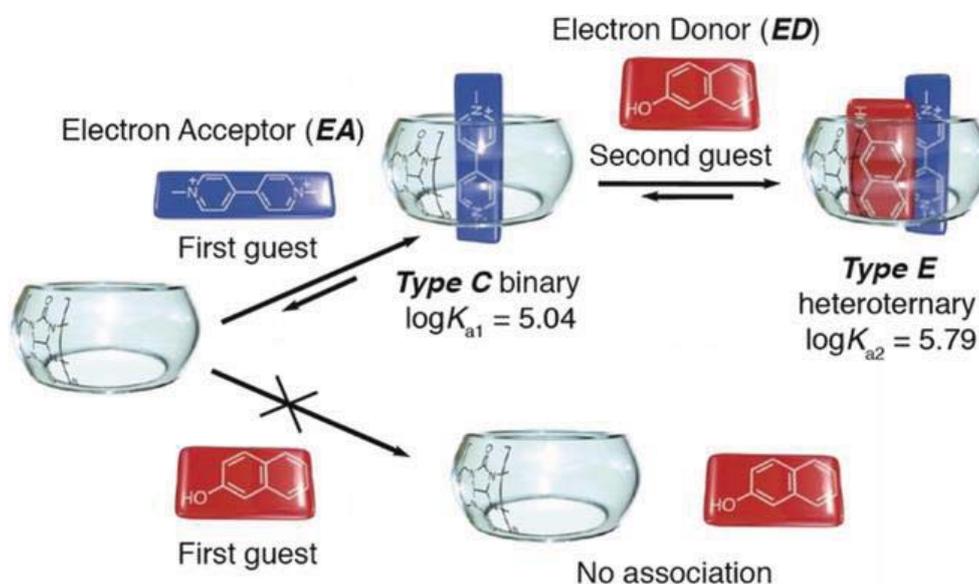


**Figura 7.** Representación de complejos receptor-sustrato con CB[7].<sup>4</sup>

La característica más distintiva del cucurbit[8]urilo como receptor químico es que esta molécula presenta una cavidad mayor que las del CB[6] y CB[7], el volumen de su

cavidad es de  $479 \text{ \AA}^3$  y presenta un diámetro de  $6.9 \text{ \AA}$ , 1.7 veces más grande que la del cucurbit[7]urilo.

Sus propiedades son similares a las de sus homólogos CB[6] y CB[7] a la hora de interactuar con numerosos sustratos, como pueden ser sales de amonio voluminosas o sustratos cargados positivamente, por ejemplo, ferrocenos y la amantadina. Pero el interés particular de estos receptores reside en el mayor tamaño de su cavidad, puesto que, permite que dos moléculas de sustrato se introduzcan en su interior, maximizando su coeficiente de empaquetamiento (figura 8). Esta característica es poco usual entre las familias de receptores y permite el desarrollo de múltiples aplicaciones, como puede ser la dimerización de las proteínas.<sup>13</sup>

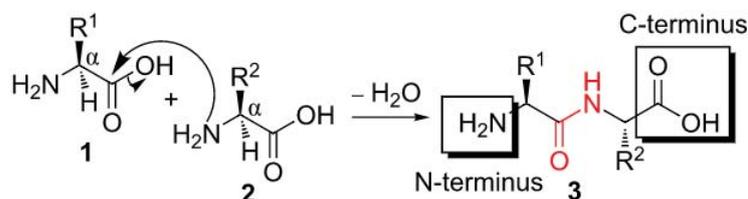


**Figura 8.** Formación de un complejo de inclusión heteroternario entre el CB[8], un viológeno y un segundo sustrato adecuado.<sup>14</sup>

## Síntesis de péptidos en fase sólida

A comienzos de siglo XX, Emil Fisher sintetizó el primer dipéptido, al que llamó glicilglicina, esta síntesis permitió acuñar el término “péptido”. En el año 1953, Vigneaud desarrolló un método para sintetizar un polipéptido, dicha síntesis se basaba en el bloqueo del grupo carboxilo del aminoácido C-terminal y del amino del N-terminal, en una disolución homogénea. Este proceso requería de etapas de aislamiento y purificación para que los compuestos intermedios puedan usarse en etapas posteriores, además de la activación del grupo carboxílico del aminoácido N-terminal.<sup>15</sup> Esto provocaba que este

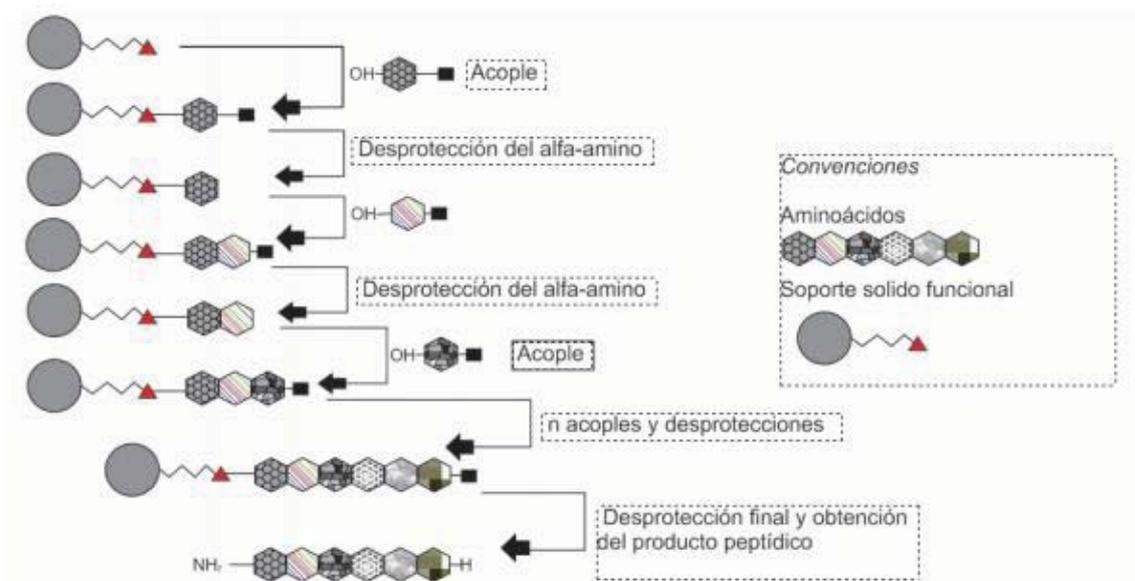
procedimiento fuese muy complicado y requiriese de mucho tiempo y esfuerzo, lo cual, suponía un gran inconveniente a la hora de ponerlo en práctica.



**Figura 9.** Formación de un dipéptido

En 1963, Bruce Merrifield desarrolló la síntesis de un tetrapéptido, sintetizado en una resina sólida desde el extremo *C*-terminal al *N*-terminal.<sup>16</sup> Este método de síntesis fue posteriormente llamado “síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)” y se basa en la construcción de péptidos en dos fases, una fase sólida, la resina, que actúa como soporte sólido para la síntesis y una fase líquida, que es la que contiene los reactivos necesarios solubilizados en un medio adecuado para la síntesis del péptido.<sup>17</sup>

El método consta de varias etapas que se repiten de forma sucesiva. En primer lugar, se acopla el primer aminoácido del extremo *C*-terminal del péptido a la resina, formada por partículas de polímero, con su grupo amino protegido con el fin de evitar posibles reacciones secundarias.<sup>18</sup> Para la introducción del siguiente aminoácido, se procede a la desprotección del grupo amino del aminoácido unido a la resina y la posterior activación del este ácido carboxílico del aminoácido que se va a incorporar, para aumentar su electrofilia, permitiendo así la reacción entre ellos y la síntesis del péptido. Estas etapas de acoplamiento y desprotección se repiten las veces necesarias hasta obtener la cadena polipeptídica de interés.

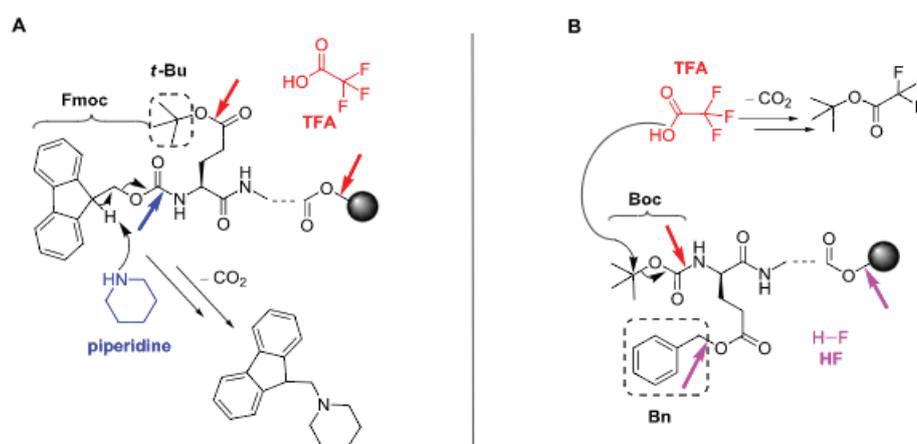


**Figura 10.** Mecanismo general de la síntesis de péptidos en fase sólida

Además de la protección del extremo N-terminal de los aminoácidos también deben protegerse los grupos reactivos presentes en las cadenas laterales, la diferencia entre estos dos tipos de protecciones es que el grupo protector amino es temporal, se puede eliminar con facilidad y de forma específica para garantizar el correcto acoplamiento entre los aminoácidos, mientras que los grupos protectores de cadena lateral generan una protección más permanente para evitar que se produzcan reacciones secundarias no deseadas.

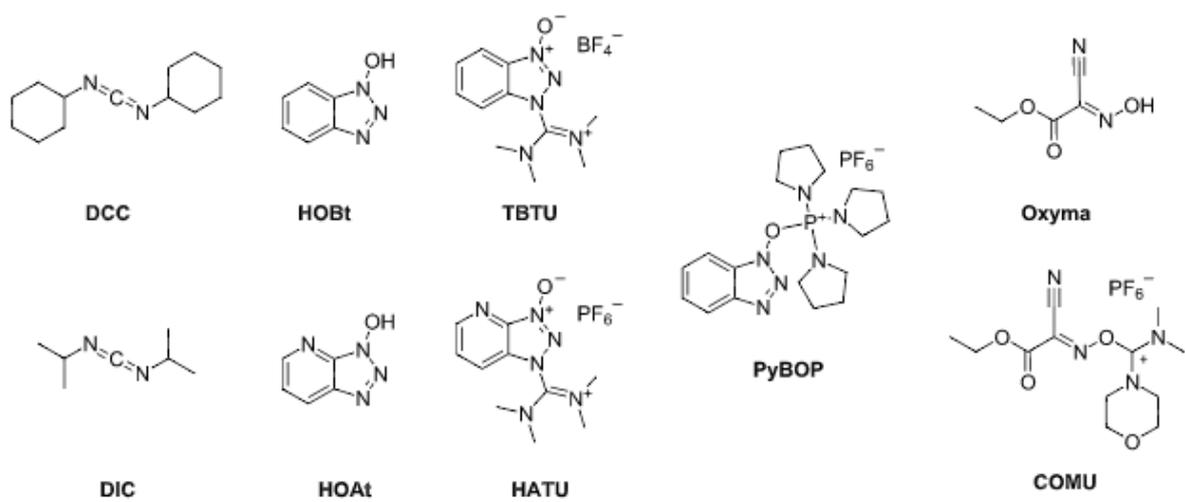
Para la elección de los grupos protectores de deben tener en cuenta varios factores, estos grupos deben presentar una alta estabilidad ante determinadas condiciones de reacción, además deben ser fáciles de eliminar y seguros. Inicialmente se utilizaba el grupo Boc como protector del grupo amino y el grupo Bn, o grupos similares a este, para la protección de las cadenas laterales. El grupo Boc se puede eliminar utilizando TFA mientras que para la eliminación del grupo Bn, que se hace de forma simultánea con la ruptura del péptido de la resina, hacen falta ácidos fuertes, como el HF. Ambos grupos se desprotegen en medio ácido, lo cual provoca que esta molécula sea lábil en dicho medio. Posteriormente, se introdujo la estrategia Fmoc/t-Bu, que utiliza el grupo Fmoc, para realizar la protección temporal de los grupos amino terminales, y que se elimina fácilmente en condiciones básicas, y como grupo protector de las cadenas laterales, el grupo *t*-Bu,<sup>19</sup> que se elimina en medio ácido. Esto introdujo la ventaja de la ortogonalidad, ya que permite la desprotección de los grupos en condiciones químicas opuestas.

La ortogonalidad de la estrategia de Fmoc/*t*-Bu es su principal ventaja, ya que permite el desarrollo de moléculas complejas debido a la mayor flexibilidad en su síntesis. Además, la desprotección progresiva genera medios menos agresivos, mientras que el TFA y HF utilizados en las etapas de desprotección de la estrategia Boc/Bn puede provocar daños en los enlaces peptídicos sensibles y favorecer reacciones secundarias catalizadas en medio ácido.<sup>20</sup> Por otra parte, la estrategia Boc/Bn no presenta ortogonalidad, por lo tanto, la desprotección del grupo Bn siempre afecta al grupo Boc y este método requiere de la utilización de recipientes especiales resistentes a la corrosión debido a las propiedades ácidas de los reactivos.



**Figura 11.** Estrategia Fmoc/*t*-Bu (A) y Boc/Bn (B) en la SPPS

Para la formación de los enlaces peptídicos se necesita la presencia de un agente de acoplamiento en el medio de reacción. Estos compuestos reaccionan con el ácido carboxílico del aminoácido que se va a acoplar al péptido convirtiéndolo en un éster activo más electrófilo que el ácido carboxílico. Para ello, se pueden emplear distintos reactivos basados en carbodiimidas (DCC y DIC), nucleófilos auxiliares (HOBt y HOAt) y sus sales de uronio (HATU y TBTU) y fosfonio (PyBOP). En 2009, se introdujeron dos nuevos aditivos, el Oxyma, este se utiliza como alternativa al HOBt, puesto que este es un compuesto peligroso debido a su gran potencial explosivo y el COMU, que es una sal de uronio segura.<sup>21</sup> En base a las condiciones de reacción, estabilidad, solubilidad, etc. se escogerá cuál de estos agentes de acoplamiento es más adecuado para utilizar en la síntesis del péptido.

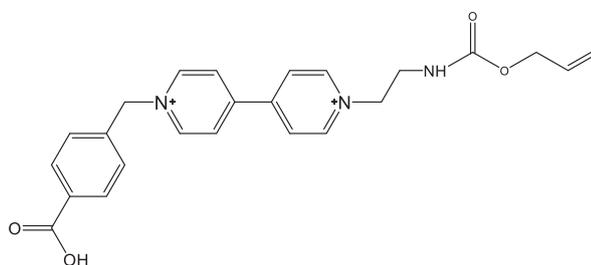


**Figura 12.** Agentes de acoplamiento comunes en la SPPS

## Objetivos

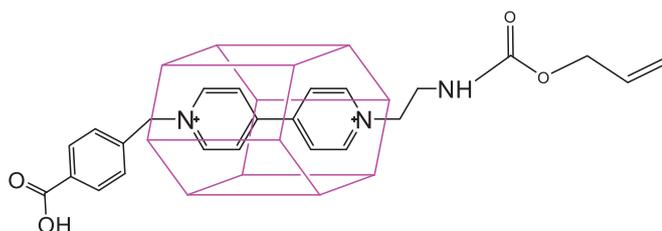
Basándose en lo expuesto en la introducción de este TFG, la síntesis de conjugados viológeno-péptido, así como su interacción con receptores moleculares son temas de especial interés en la actualidad dentro del campo de la química supramolecular. Teniendo esto en cuenta, este TFG tiene como objetivos la síntesis de conjugados viológeno-péptido y la formación de especies supramoleculares utilizando como receptor molecular el cucurbit[7]urilo.

1. Síntesis del viológeno-aminoácido, a partir de la dialquilación de la 4,4-bipiridina y caracterización del compuesto, así como de sus intermedios sintéticos mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , mono- y bidimensional.



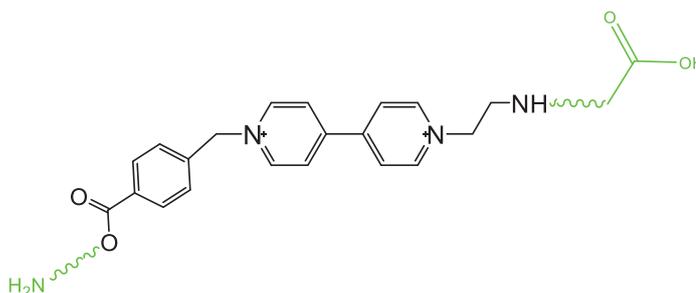
**Figura 13.** Estructura del viológeno-aminoácido

2. Estudio de la interacción del viológeno con el cucurbit[7]urilo y su caracterización mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 14.** Interacción del viológeno con el cucurbit[7]urilo

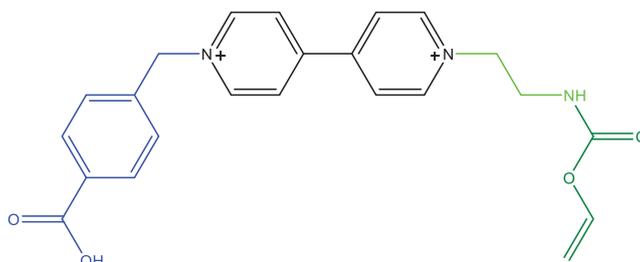
3. Síntesis del conjugado viológeno-péptido mediante SPPS.



**Figura 15.** Estructura del viológeno-péptido

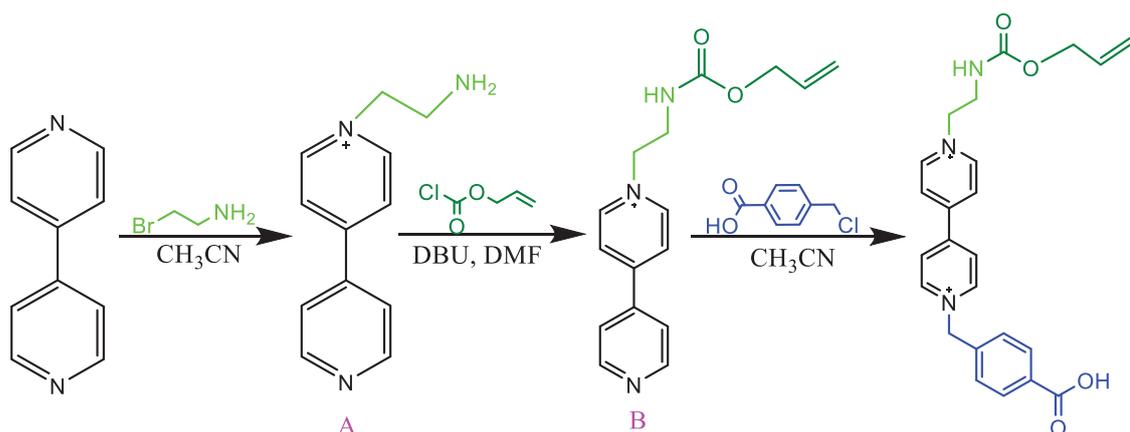
## Discusión de resultados

En este apartado se recoge la estrategia sintética y la posterior caracterización del aminoácido de viológeno protegido en el grupo amino, así como de los intermedios necesarios para llegar a dicho compuesto.



**Figura 16.** Estructura del viológeno-aminoácido

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo mediante la dialquilación sucesiva de la 4,4'-bipiridina (figura 17).

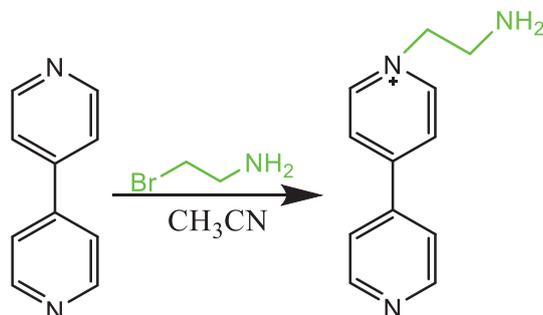


**Figura 17.** Esquema de la síntesis del viológeno-aminoácido

En este apartado también se describirá la caracterización del complejo supramolecular del viológeno con el receptor cucurbit[7]urilo. Con este experimento se busca la introducción del viológeno en el interior del receptor. Para ello, se realizó la caracterización mediante  $^1\text{H}$ -RMN, llevando a cabo cuatro experimentos diferentes, en los cuales se varía la concentración de CB[7] con respecto al viológeno.

## Síntesis del intermedio A

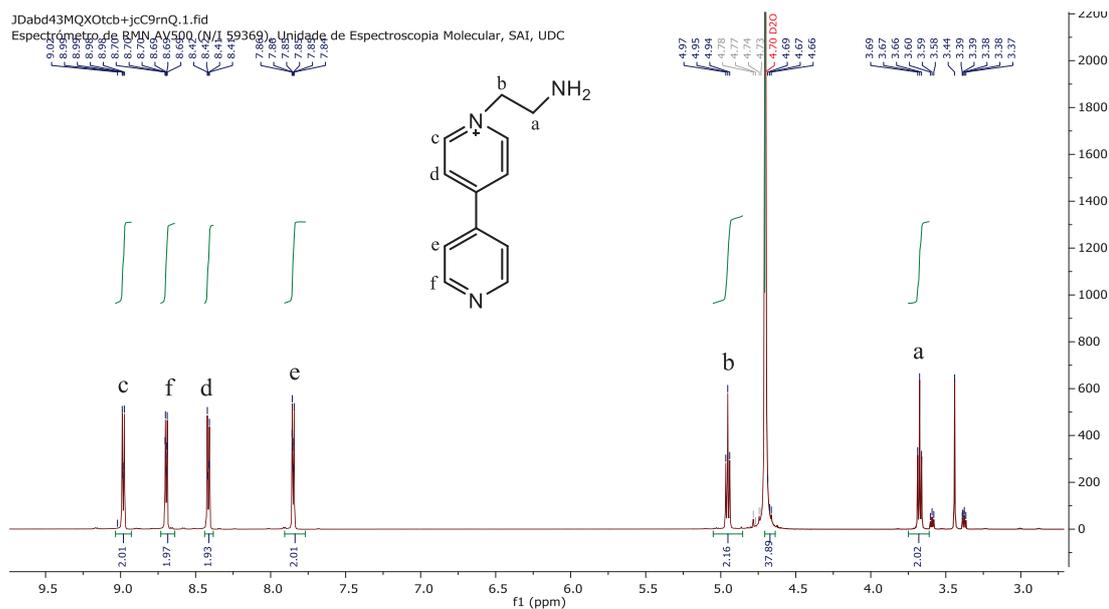
Para la obtención del viológeno de interés, en primer lugar, se sintetizó en intermedio A monoalquilado, cuyo sustituyente contiene el grupo amino.



**Figura 18.** Síntesis del intermedio A

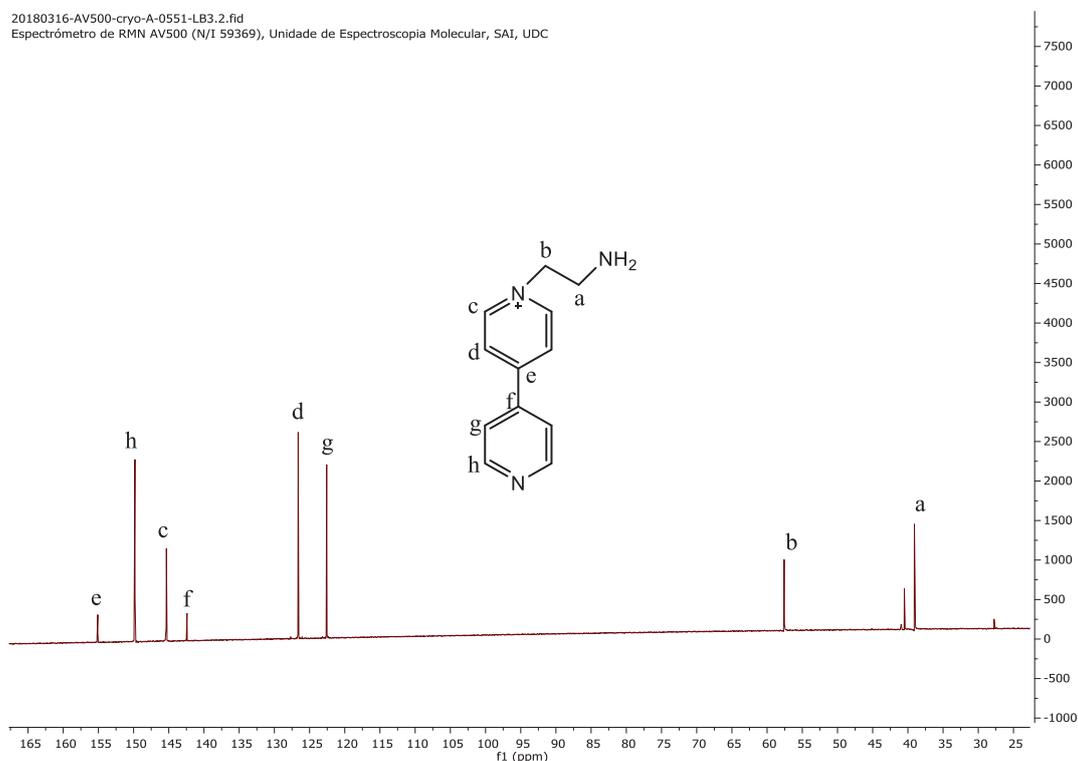
Esta reacción tiene lugar mediante un mecanismo S<sub>N</sub>2, en el cual la 4,4'-bipiridina actúa como nucleófilo y la bromoetilamina como electrófilo. Ambos son compuestos comerciales, por lo que no es necesario su síntesis previa. La 4,4'-bipiridina se disolvió en acetonitrilo y la mezcla se tuvo a reflujo durante 24 horas, observándose la aparición de un precipitado blanquecino, el cual se correspondió con el producto de reacción. El rendimiento de esta reacción fue del 77 %. La caracterización de este compuesto se realizó mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas.

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (figura 19), se observan cuatro dobletes a un desplazamiento entre 7.6 ppm a 9 ppm que se corresponden con los hidrógenos de la bipiridina. Los que presentan un mayor desplazamiento son los hidrógenos más próximos al nitrógeno con carga positiva, es decir, en la posición α a este, mientras que los de menor desplazamiento son aquellos que se encuentran en las posiciones β. Además, aparecen dos tripletes que se corresponden con los hidrógenos de los carbonos del grupo etilénico del sustituyente.



**Figura 19.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del intermedio A

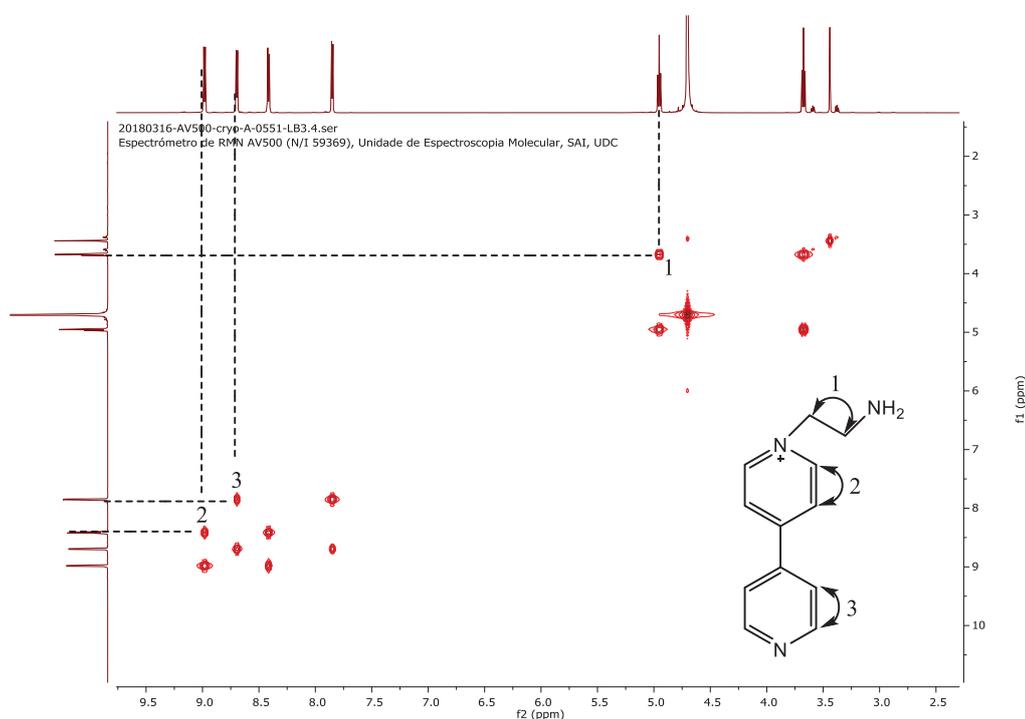
El  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta 8 señales que siguen una distribución similar a las del  $^1\text{H}$ -RMN. Aparecen 6 picos con un desplazamiento de entre 120 ppm a 158 ppm que se corresponden con los carbonos de la 4,4'-bipiridina, de los cuales dos se corresponden con los carbonos cuaternarios. Los picos a 40 ppm y 57 ppm se asignaron a los carbonos del grupo aminoetil (figura 20).



**Figura 20.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz, 298 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del intermedio A

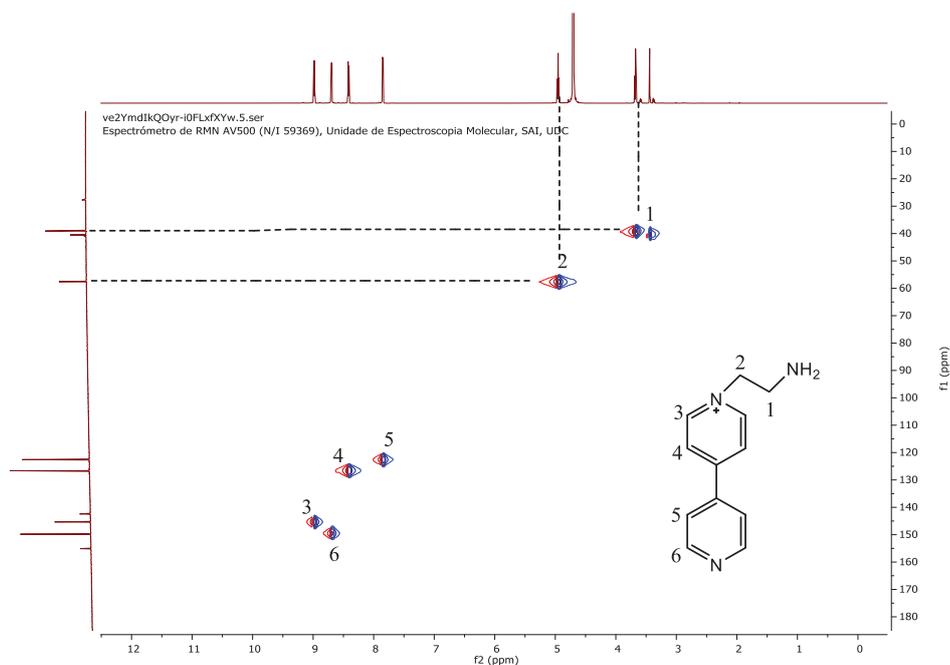
Para comprobar que la asignación de las señales es correcta se completó la caracterización mediante experimentos de RMN bidimensional.

El COSY permite correlacionar protones acoplados entre sí, es decir, aquellos que están separados por tres enlaces. Las señales que se encuentren dentro de una misma diagonal se corresponden con el mismo hidrógeno y las que se encuentran fuera de esta se corresponden con hidrógenos diferentes. En el COSY (figura 21) para el intermedio A se puede comprobar que la asignación de las señales propuesta con los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN es correcta. Además, la presencia de la señal 1 indica que la alquilación de la biperidina tuvo lugar correctamente.



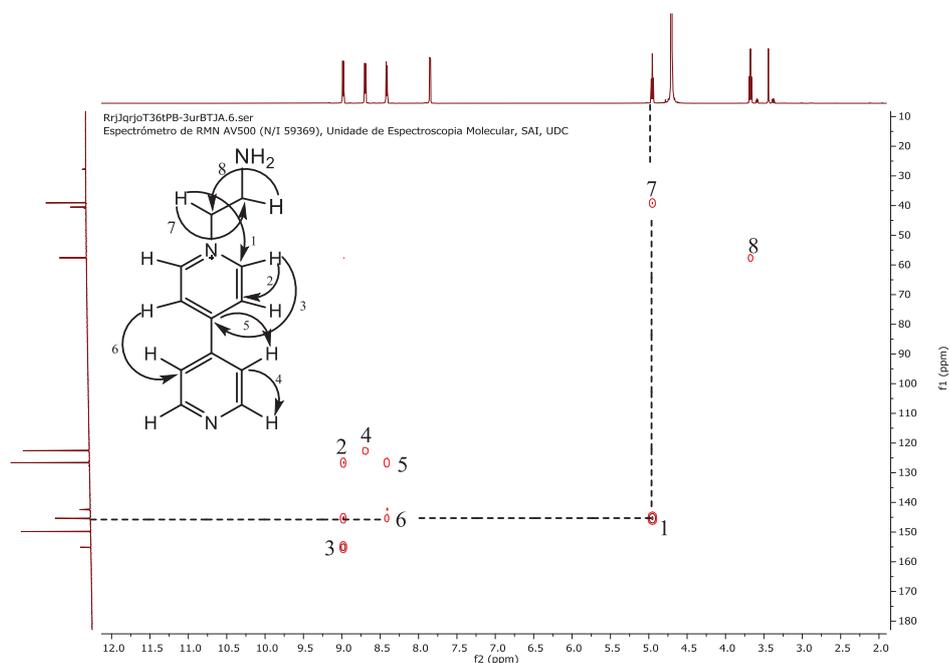
**Figura 21.** Espectro COSY del intermedio A

El HSQC correlaciona los carbonos y los hidrógenos unidos entre sí. A la vista del espectro HSQC (figura 22) bidimensional del intermedio A se puede considerar que la estructura propuesta anteriormente es correcta. Por ejemplo, puede observarse una clara correlación entre los hidrógenos de las posiciones 1 y 2 con sus correspondientes carbonos.



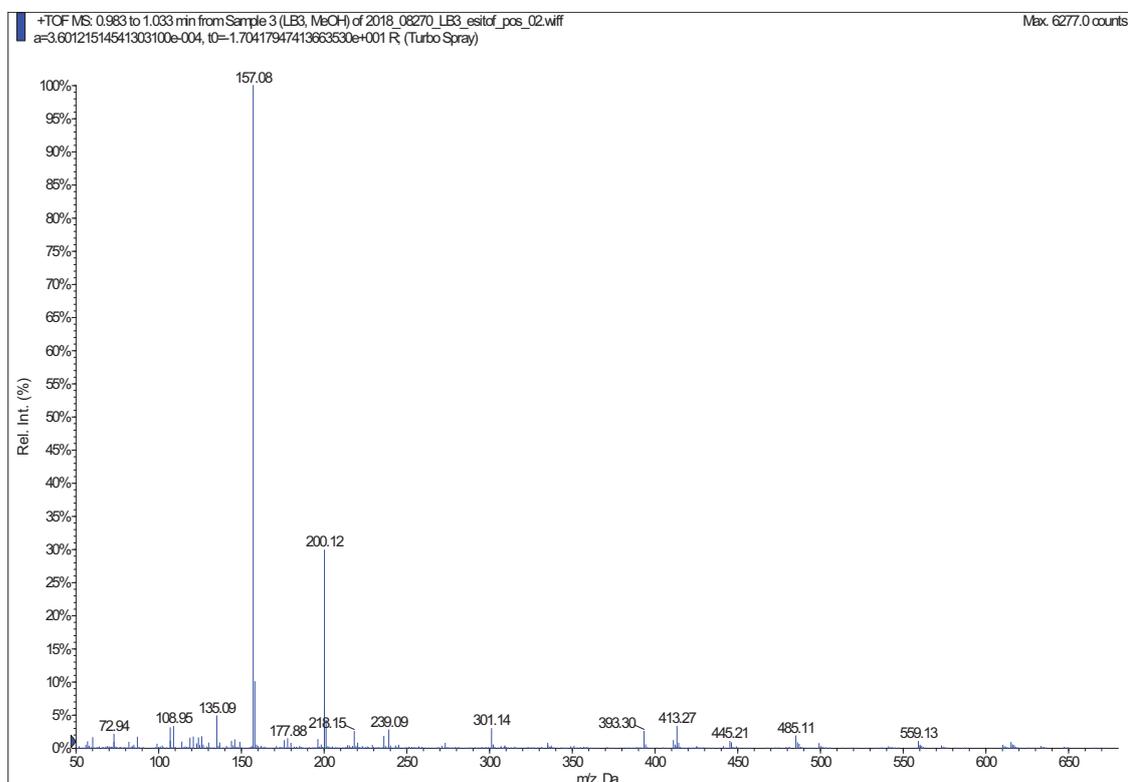
**Figura 22.** Espectro HSQC del intermedio A

El HMBC permite ver las correlaciones entre los protones y los carbonos situados a dos o más enlaces de distancia. Este espectro para el intermedio A también coincide con las asignaciones propuestas inicialmente. Así, por ejemplo, la señal 1 presente en la figura 23, representa la correlación (1) entre los hidrógenos del grupo aminoetil y uno de los C en posición  $\alpha$  al nitrógeno en la biperidina, lo cual es un indicativo de que se produjo la alquilación de la biperidina.



**Figura 23.** Espectro HMBC del intermedio A

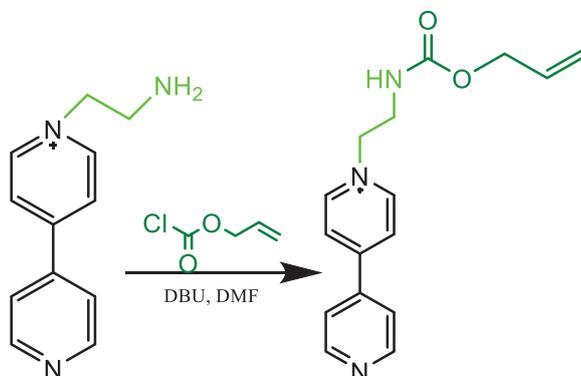
En la figura 24 se representa el espectro de masas (ESI) del intermedio A. En él, se puede apreciar el ion molecular correspondiente a la pérdida del anión bromuro a  $m/z = 200.12$ . El espectro de masas de alta resolución permitió confirmar la fórmula molecular del intermedio A:  $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3]^+$  calculado 200.1188; encontrado 200.1190.



**Figura 24.** Espectro de masas (ESI) del intermedio A

## Síntesis del intermedio B

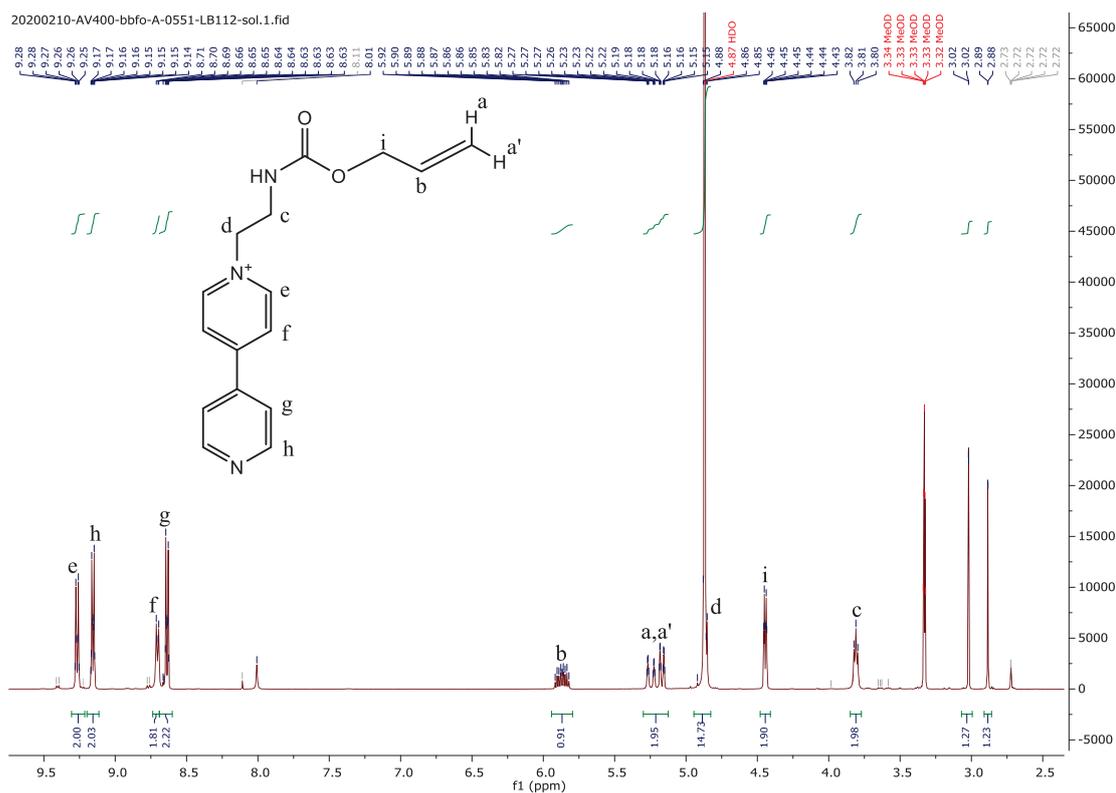
A continuación, se llevó a cabo la protección de la amina libre con el grupo protector Alloc, para impedir la reacción de esta en etapas posteriores de la síntesis (figura 25).



**Figura 25.** Protección de la amina con Alloc

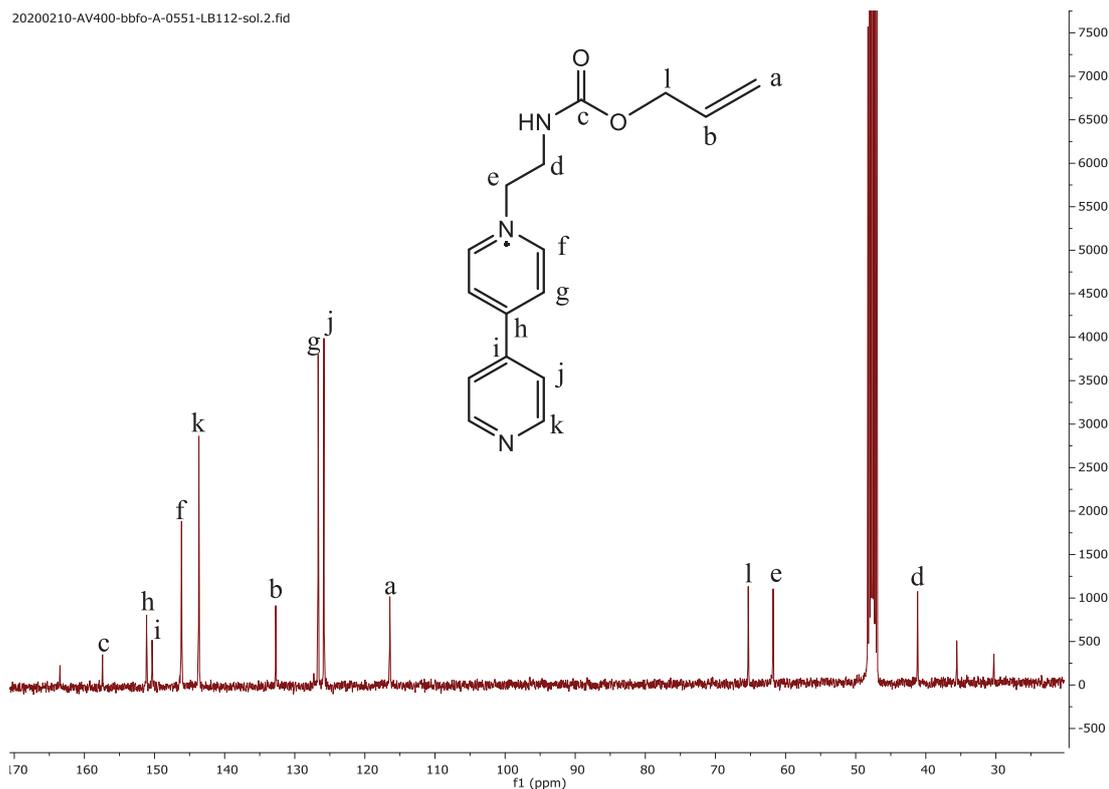
Para la reacción de protección de la amina se hizo reaccionar el intermedio A con el cloroformiato de alilo con DBU en DMF. Tras 24 horas se observó la formación de un precipitado marrón, obteniéndose el intermedio B con un rendimiento del 30 %. La caracterización del intermedio B se realizó mediante <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y bidimensionales (COSY y HSQC).

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN (figura 26), se observan cuatro dobletes con un desplazamiento entre 8.5 ppm y 9.5 ppm que se corresponden con los hidrógenos de la biperidina. Al igual que para el intermedio A, los que presentan un desplazamiento mayor son los hidrógenos en la posición α al nitrógeno, mientras que los de menor desplazamiento son aquellos que se encuentran en la posición β al mismo. Se mantienen los dos picos que se corresponden con los hidrógenos de los carbonos del grupo etileno del sustituyente a 4.87 ppm y a 3.82 ppm. Se observa también, la aparición dos multipletes a 5.86 ppm y a 5.19 ppm y un doblete a 4.43 ppm que se corresponden con los hidrógenos del grupo Alloc.



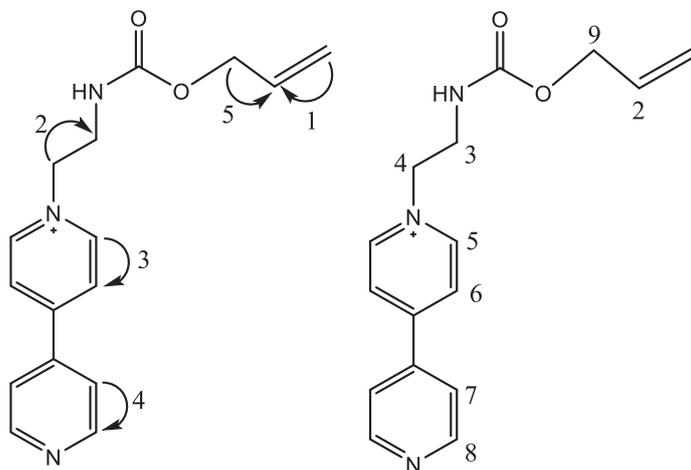
**Figura 26.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, 298K,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del intermedio B

El  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 27) presenta 12 picos, los cuales siguen una distribución similar a los del  $^1\text{H}$ -RMN, hay 6 picos con un desplazamiento de entre 120 ppm a 155 ppm que se corresponden con los carbonos de la 4,4'-bipiridina, apareciendo dentro de estas dos señales que se corresponden con los carbonos cuaternarios. A 40 ppm y a 62 ppm se encuentran los dos picos debidos a los carbonos del sustituyente. Se pueden ver cuatro picos a 157 ppm ( $\text{C}=\text{O}$ ), 132 ppm ( $\text{CH}$ ), 116 ppm ( $\text{CH}_2$ ) y a 65 ppm ( $\text{OCH}_2$ ) que se corresponden con el grupo protector Alloc.



**Figura 27.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, 298K,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del intermedio B

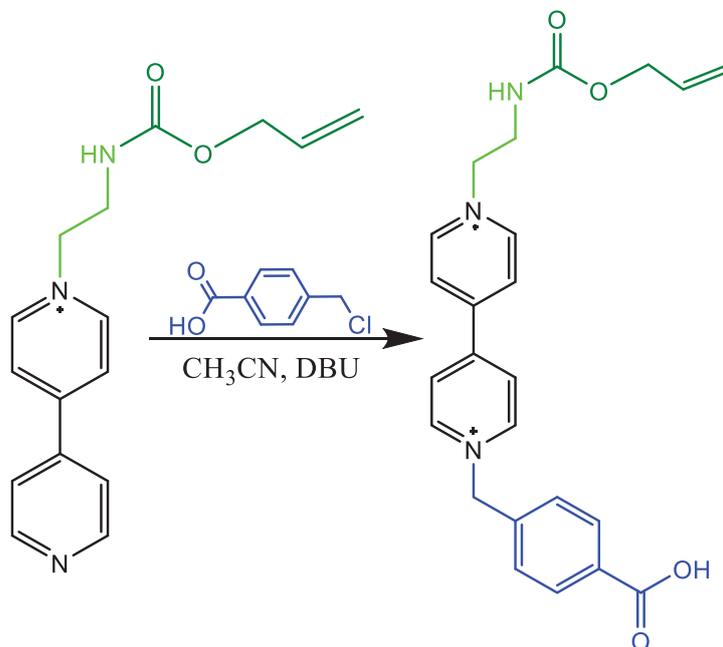
También se caracterizó el intermedio B mediante RMN bidimensionales (COSY y HSQC) (véase el anexo). El análisis de estos espectros concuerda con la asignación propuesta inicialmente. En el caso del COSY las correlaciones 1 y 5 entre los hidrógenos del grupo protector Alloc son un indicativo de que la protección de la amina sucedió correctamente. De la misma forma las señales 1, 2 y 9 en el espectro HSQC, que indican correlación entre los hidrógenos y los carbonos del grupo protector Alloc, también son evidencia de la protección de la amina.



**Figura 28.** Asignación para los espectros COSY y HSQC respectivamente

## Síntesis del viológeno-aminoácido

Para completar la síntesis del aminoácido deseado, se realizó la segunda alquilación de la 4,4'-bipiridina. Este último sustituyente contiene el grupo carboxilo.

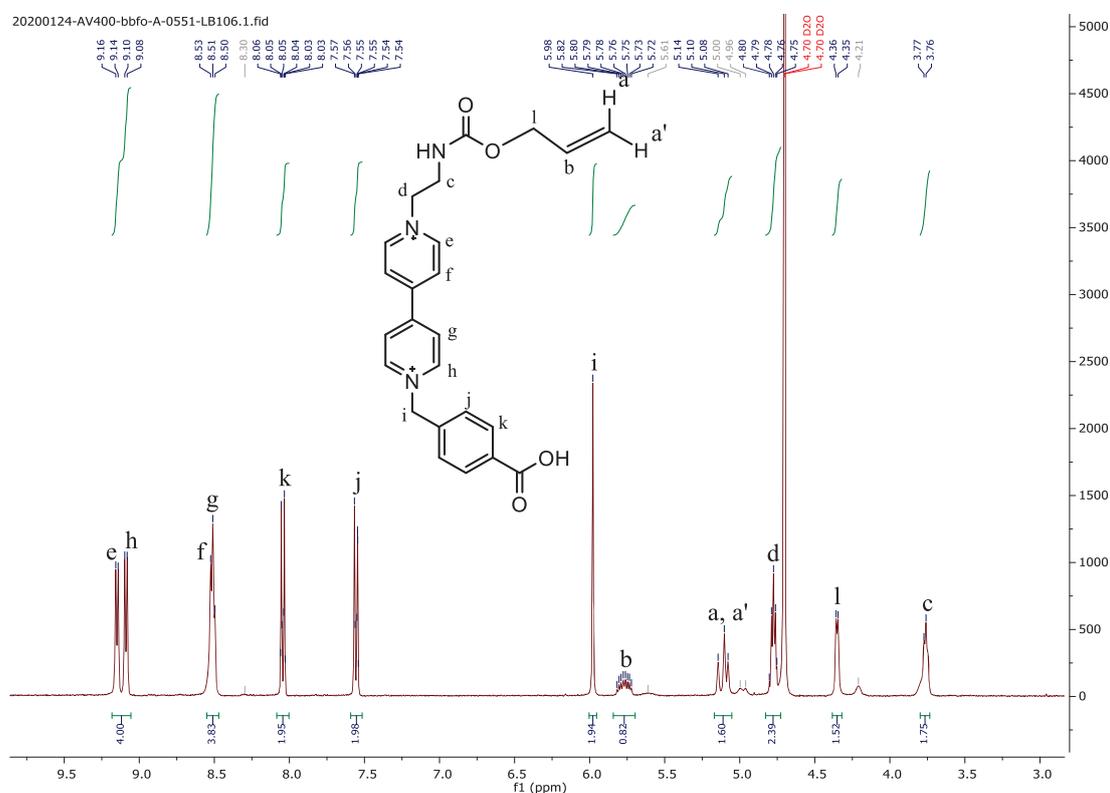


**Figura 29.** Síntesis del viológeno-aminoácido

La reacción tiene lugar mediante un mecanismo S<sub>N</sub>2, en el cual el intermedio B actúa como nucleófilo, mientras que el ácido 4-clorometilbenzoico actúa como electrófilo. Este último es un compuesto comercial, por lo que no hace falta sintetizarlo previamente. Para ello, sobre la mezcla del intermedio B y el ácido 4-clorometilbenzoico en acetonitrilo se añadió DBU y la mezcla resultante se calentó a reflujo. Tras 72h se observó la formación un sólido marrón, que se corresponde con el compuesto deseado, obteniéndose con un rendimiento del 70 %. El producto se caracterizó por <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC).

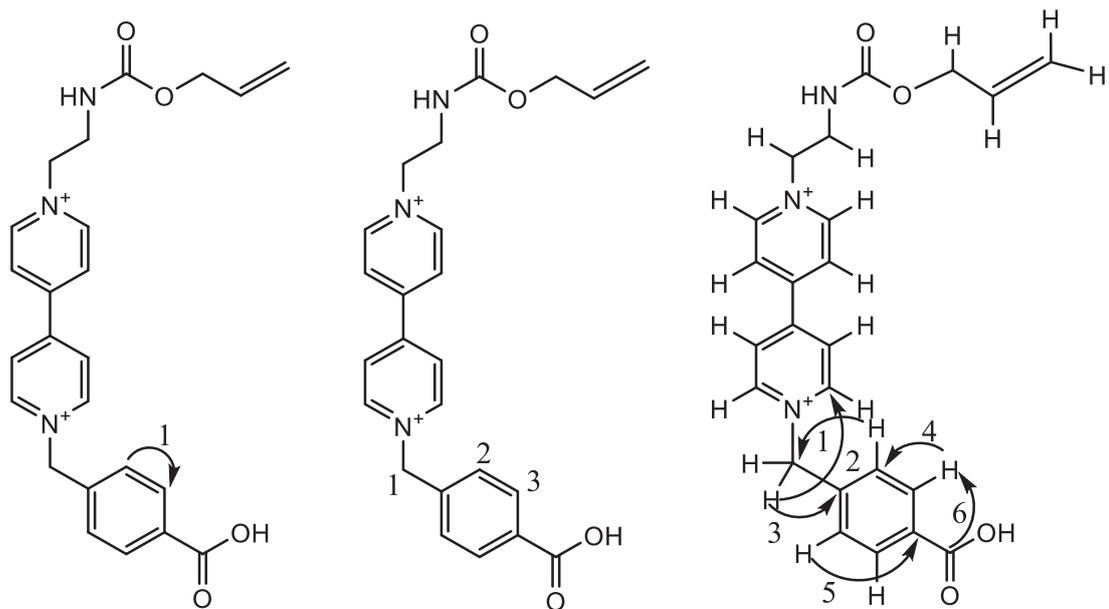
En el <sup>1</sup>H-RMN (figura 30) aparecen señales entre 8.2 ppm y 9.5 ppm que se corresponden con los hidrógenos de la bipyridina. También se observan dos señales a 7.55 ppm y 8.04 ppm que son las correspondientes al fenilo del sustituyente. Debido también a este sustituyente se observa una señal a 5.98 ppm que corresponde al hidrógeno i. También las señales correspondientes al sustituyente que contiene el grupo amino protegido, dos tripletes a 3.77 ppm y 4.78 ppm, y al grupo protector Alloc, una señal a 5.77 ppm, a 5.11 ppm y otra a 4.35 ppm.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta una distribución similar a la del  $^1\text{H}$ -RMN, por lo tanto, coincide con la asignación de señales propuesta inicialmente. Así, por ejemplo, se detectan dos resonancias en la zona aromática correspondiente a los dos C-H del grupo fenileno y un nuevo  $\text{CH}_2$  en la zona alifática debido al carbono bencílico.



**Figura 30.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, 298K,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del viológeno-aminoácido

Para llevar a cabo una asignación de señales más minuciosa, se realizó la caracterización mediante experimentos de RMN bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) (véase el anexo). Los datos aportados por estos coinciden con los asignados inicialmente. Cabe destacar la señal 1 del COSY que se corresponde con la correlación entre los hidrógenos del fenilo del sustituyente que contiene el grupo carboxilo, lo cual es indicativo de que la segunda alquilación tuvo lugar satisfactoriamente. En las señales 1, 2 y 3 del HSQC se observa la relación entre los hidrógenos del fragmento bencílico con sus correspondientes carbonos, lo que también evidencia que la alquilación se produjo con éxito. Otras evidencias de esto son las señales 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del HMBC, sobre todo la señal 2, puesto que esta indica la correlación entre la biperidina di sustituida con el conector que contiene el ácido carboxilo, lo cual es una evidencia de que la síntesis del viológeno-aminoácido deseado ha tenido lugar (figura 31).

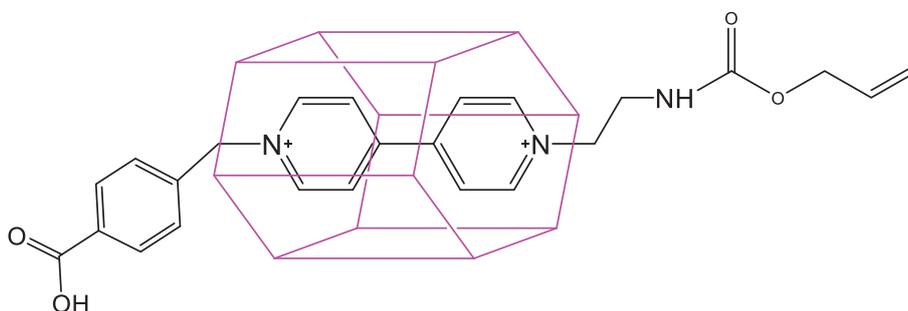


**Figura 31.** Asignación para los espectros COSY, HSQC y HMBC respectivamente

## Formación del complejo de inclusión viológeno-aminoácido:CB[7]

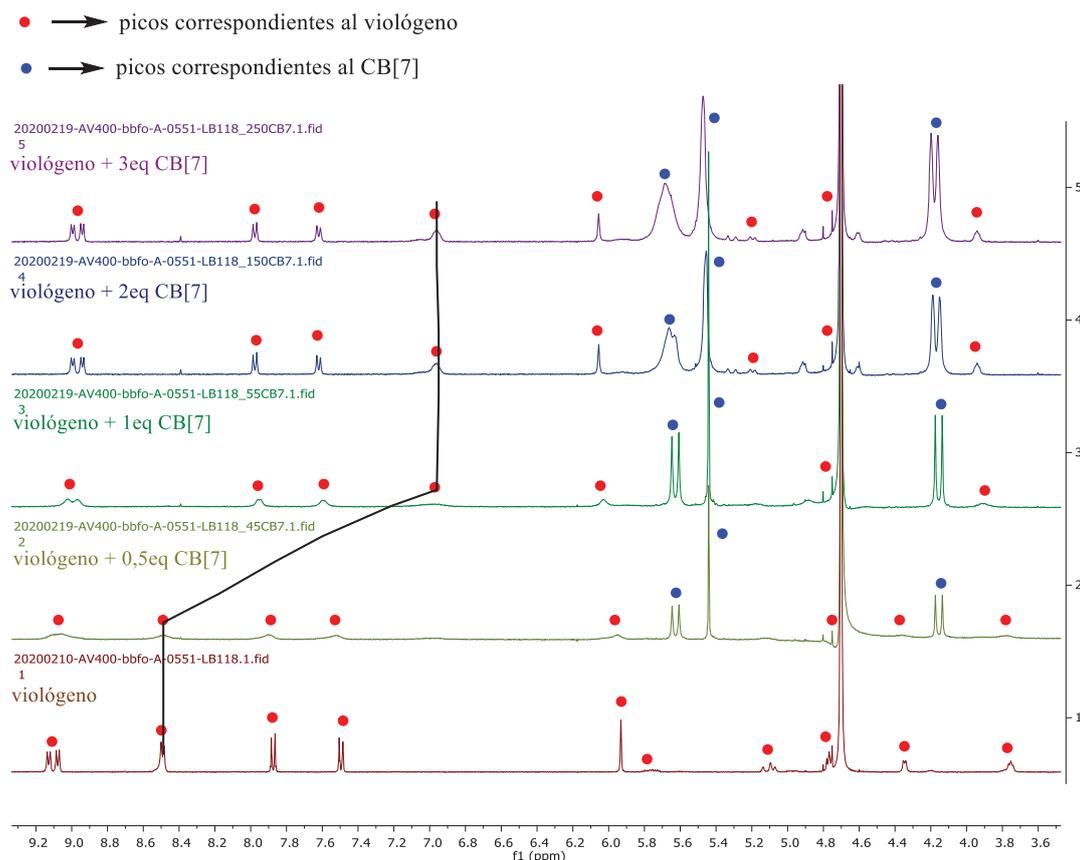
### Valoración por $^1\text{H}$ -RMN

En la introducción de este TFG menciona las propiedades que presentan moléculas como el cucurbit[7]urilo como receptor molecular. El segundo objetivo de este trabajo propone el estudio de la interacción entre el viológeno-aminoácido sintetizado con el cucurbit[7]urilo, actuando este último como receptor. Es de esperar, teniendo en cuenta la bibliografía y la experiencia del grupo de investigación, que la unidad de biperidinio se sitúe en el interior del receptor maximizando así las interacciones ion-dipolo entre los nitrógenos cargados positivamente y los portales del CB[7].



**Figura 32.** Esquema de unión entre el viológeno y el CB[7]

Esta interacción se estudió mediante  $^1\text{H}$ -RMN, para el cual se llevaron a cabo cuatro experimentos, en los cuales se añadieron 0,5 eq, 1 eq, 2 eq y 3 eq de CB[7]. Todos estos experimentos se realizaron en  $\text{D}_2\text{O}$  a temperatura ambiente.



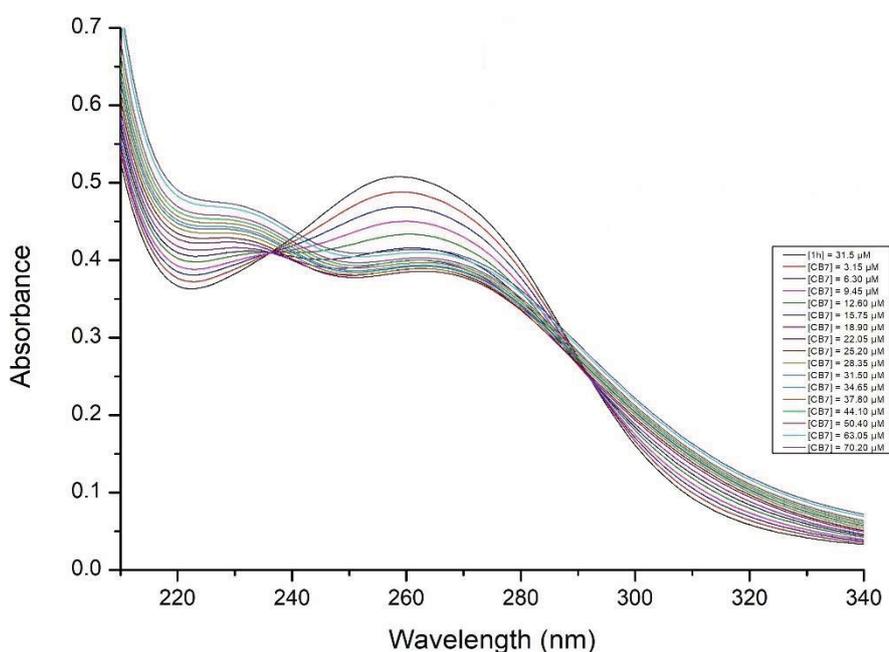
**Figura 33.** Valoración por  $^1\text{H}$ -RMN de la interacción del viológeno-aminoácido y CB[7]

Tras la adición de 0.5 eq de CB[7] sobre una disolución del viológeno-aminoácido el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra señales anchas características de la existencia de un proceso dinámico próximo a una situación de coalescencia. Sin embargo, tras la adición de 2 y 3 eq de CB[7] las señales se definen y es posible realizar un análisis del espectro. El CB[7] presenta sus tres señales características: dos dobletes y un singlete (marcados en azul en la figura 33).

Respecto a las resonancias correspondientes al viológeno-aminoácido, el cambio más significativo del espectro es el intenso apantallamiento de los hidrógenos en posiciones  $\beta$  a los nitrógenos de la bipyridina ( $\Delta\delta = -1.5$  ppm). Este apantallamiento puede justificarse por la inserción de la bipyridina en el interior del CB[7]. Es de destacar que los protones del fenilo apenas se ven afectados por la presencia de CB[7] lo que permite descartar ese lugar de interacción.

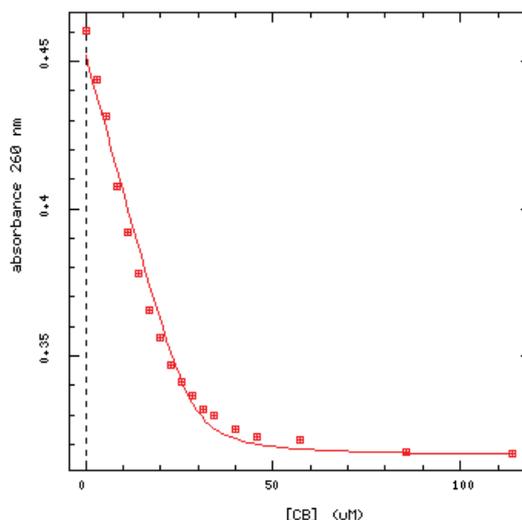
### Valoración por UV

También se realizó la valoración por UV para calcular la constante de asociación entre el receptor molecular CB[7] y el viológeno-aminoácido. Para ello, se añadieron cantidades crecientes de CB[7] sobre una disolución del **28.51  $\mu\text{M}$**  del viológeno-aminoácido en una disolución tampón de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4^-$  y se registró el espectro UV tras cada adición. Como se observa en la figura siguiente, al incrementar la concentración de CB[7] se produce una disminución de la intensidad de la banda a 260nm, característica de la unidad del viológeno, y un desplazamiento batocrómico de la misma, que indica la interacción entre el viológeno y el CB[7].



**Figura 34.** Valoración por UV del viológeno-aminoácido con el CB[7]

Los datos de la valoración pudieron ajustarse a un modelo de interacción 1:1, lo que permitió calcular una constante de asociación estimada  $K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  para el complejo de inclusión. En base a este valor, se puede considerar que la interacción entre el viológeno y el CB[7] está favorecida, por lo tanto, este es otro indicativo de la formación de un complejo de inclusión entre el viológeno y el cucurbit[7]urilo.



**Figura 35.** Gráfica del ajuste de la valoración UV entre el viológeno-aminoácido y el CB[7]

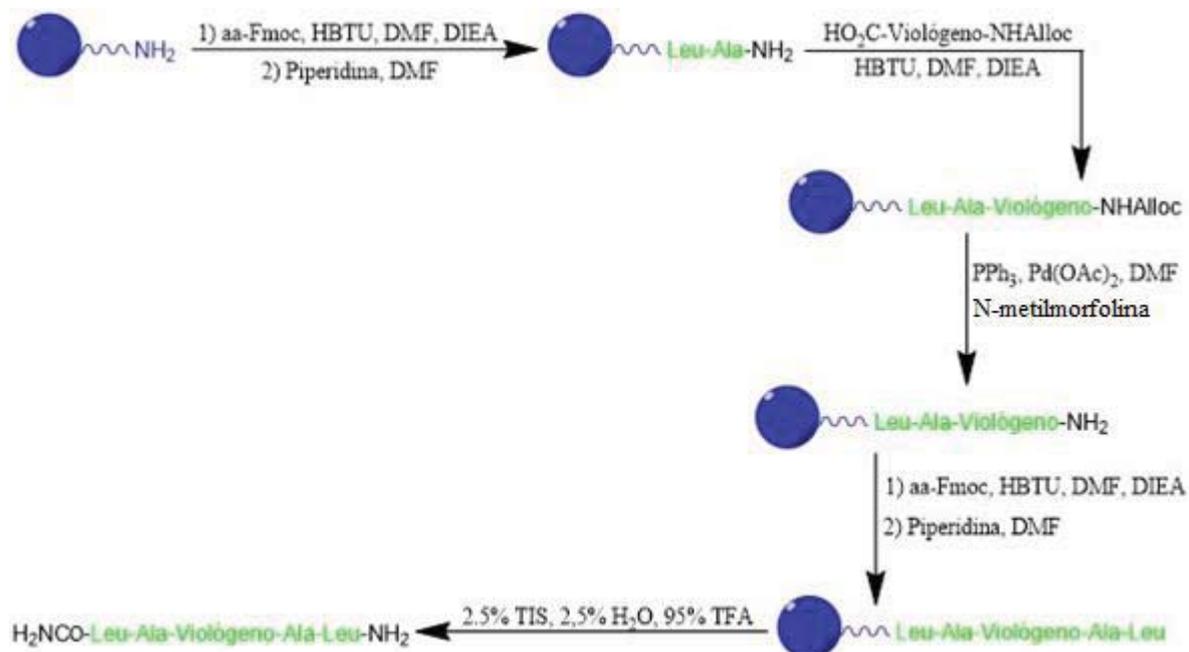
### Síntesis del conjugado viológeno-péptido

Una vez obtenido el derivado de viológeno-aminoácido convenientemente protegido en el grupo amino, se abordó la síntesis de un péptido conteniendo dicho aminoácido: el conjugado viológeno-péptido. Se optó por un péptido sencillo con cinco aminoácidos Leu-Ala-Viológeno-Ala-Leu. La estrategia sintética se describe en la figura 36.

Tras la preparación de la resina se realizó el acoplamiento con la Fmoc-Leu-OH. Tras eliminar el grupo Fmoc se realizó el acoplamiento del siguiente aminoácido Fmoc-Ala-OH. Tras una nueva desprotección del grupo amino del dipéptido, se llevó a cabo el acoplamiento de Viológeno-aminoácido. La desprotección del grupo amino se realizó con  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  generado *in situ* y a continuación se realizaron los dos acoplamientos restantes, Alanina y Leucina, para completar la síntesis del péptido. Finalmente se llevó a cabo la ruptura de la resina del conjugado péptido-viológeno con TFA y el crudo obtenido se inyectó en HPLC-MS.

En el cromatograma de HPLC no se observaron picos claros que se pudieran identificar como el producto deseado mediante espectrometría de masas. Por lo tanto, para tratar de identificar el conjugado péptido-viológeno en el cromatograma a 280 nm, se intentaron añadir dos triptófanos, residuos que absorben a esa longitud de onda, pero debido a la entrada del estado de alarma provocado por el COVID-19 no se pudo realizar la

caracterización mediante HPLC-MS de este conjugado viológeno-péptido, no pudiéndose confirmar la identidad del producto obtenido.



**Figura 36.** Esquema de la SPPS del conjugado viológeno-péptido

## Parte experimental

### General

Se emplearon reactivos comerciales sin purificación adicional. El agua empleada, de calidad Milli-Q, fue obtenida mediante un aparato Millipore Gradient A1.

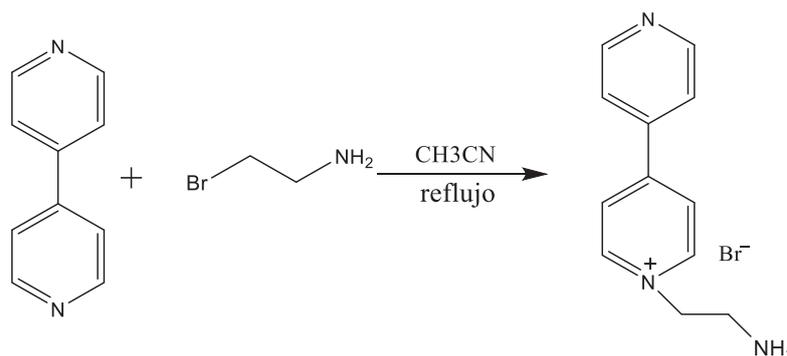
El seguimiento de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina, haciendo uso de cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y radiación ultravioleta (254 y 360 nm) como revelador. En la cromatografía en columna se empleó gel de sílice Merck 60(230-400 mesh) y como eluyente se empleó la disolución formada por CH<sub>3</sub>CN/MeOH/NaCl<sub>aq</sub> (4/1/1 v/v).

La caracterización mediante RMN se realizó con los espectrómetros Bruker Avance 500 (500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C con criosonda dual para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en experimentos de alta sensibilidad y sonda inversa BBI en experimentos a baja temperatura), y Bruker Avance 300 (400 y 500 MHz para <sup>1</sup>H y 125 y 100 MHz para <sup>13</sup>C). Para la preparación de las muestras a analizar, se utilizó agua deuterada (D<sub>2</sub>O), se empleó como señal de referencia la del disolvente residual. Los análisis por espectrometría de masas se realizaron en el SAI (Servicios de Apoyo á Investigación) de la Universidad da Coruña, empleando el espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para los experimentos de alta y baja resolución y los espectros de UV fueron registrados en un espectrofotómetro monohaz Jasco V-650.

El acoplamiento de los péptidos se realizó empleando reactivos y resina de las casas Iris Biotech GmbH y Merck.

Para el análisis de los péptidos por HPLC en fase reversa, se empleó un HPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 con detector PDA (Photo-Diode Array), acoplado a un espectrómetro de cuadrupolo simple Thermo Scientific MSQ Plus. Para las inyecciones se utilizó una columna Aeris 3.6 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 x 2.1 mm) de Phenomenex, la detección se llevó a cabo a 220 y 280 nm simultáneamente.

### Síntesis de bromuro de 1-(2-aminoetil)-(4,4'-bipiridin)-1-io



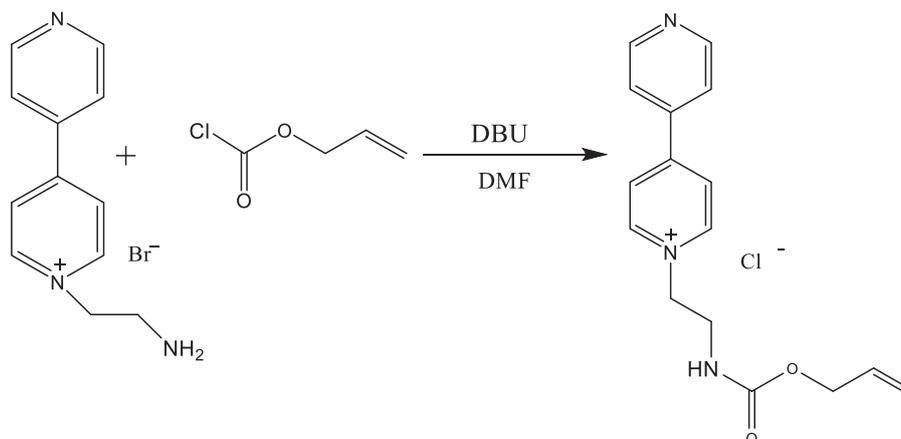
La 4,4'-bipiridina (457 mg, 2.786 mmol) y la 2-bromoetilamina (854 mg, 4.179 mmol) se disolvieron en 30 mL de acetonitrilo y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante aproximadamente 24 horas. Transcurrido este tiempo, se filtró el sólido obtenido a vacío y se realizaron varios lavados con acetonitrilo, aislándose el bromuro de 1-(2-aminoetil)-(4,4'-pipiridin)-1-io como un sólido de color blanquecino (771.4 mg, rendimiento = 77.14%). Este se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.70 (dd, *J* = 5.8, 1.2 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.92 – 7.74 (m, 1H), 4.95 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H)

<sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 155.10 (C), 149.82 (CH), 145.35 (CH), 142.42 (C), 126.63 (CH), 122.57 (CH), 57.58 (CH), 39.08 (CH)

HR-ESI-MS (*m/z*) calculado para [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = 200.1188, encontrada 200.1190

## Síntesis de cloruro de 1-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1-io. Protección de la amina con el grupo Alloc.

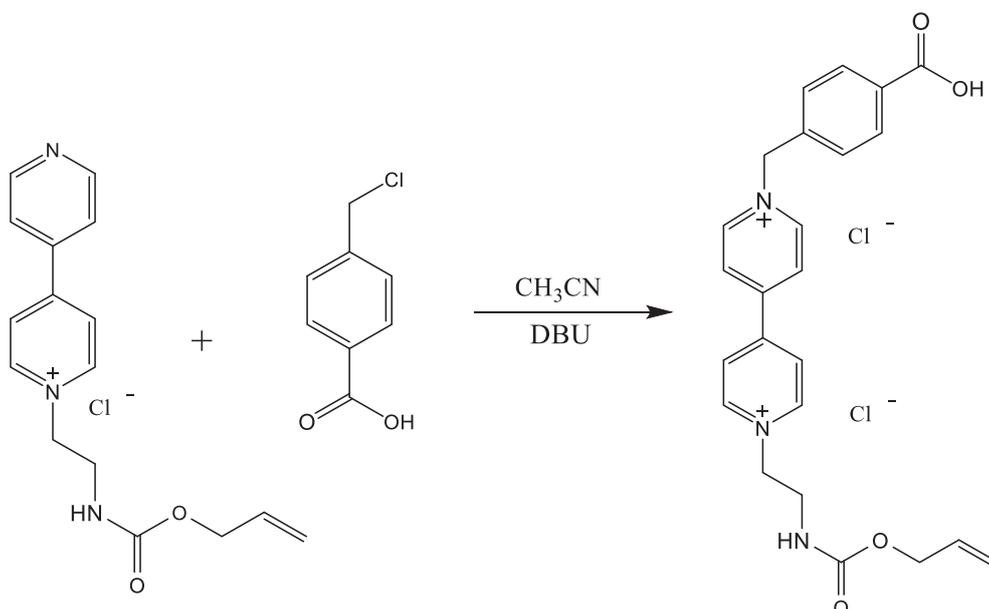


El bromuro de 1-(2-aminoetil)-(4,4'-pipiridin)-1-io sintetizado previamente (279 mg, 0.797 mmol), se resuspendió en DMF bajo atmósfera inerte (10 mL), y sobre esta suspensión se añadieron DBU (0.4 mL, 2.391 mmol) y cloroformiato de alilo (0.4 mL, 1.992 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 24 horas, obteniéndose un sólido marrón claro que se filtró a vacío y se lavó con DMF. El sólido se purificó mediante cromatografía en columna y el producto obtenido se redisolvió en EtOH. La disolución se filtró a vacío para eliminar las sales (NaCl), tras lo cual se pudo aislar el producto 1-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1-io como un sólido marrón (76.5 mg, rendimiento = 30 %).

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 9.31 – 9.21 (m, 2H), 9.20 – 9.11 (m, 2H), 8.74 – 8.69 (m, 2H), 8.69 – 8.60 (m, 2H), 5.87 (ddt, *J* = 17.2, 10.7, 5.4 Hz, 1H), 5.30 – 5.13 (m, 2H), 4.87 (d, *J* = 10.9 Hz, 15H), 4.44 (dt, *J* = 5.5, 1.5 Hz, 2H), 3.81 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 151.13 (C), 150.35 (C), 146.15 (CH), 143.67 (CH), 132.71 (C), 126.66 (CH), 125.83 (CH), 116.44 (CH), 65.32 (CH<sub>2</sub>), 61.77 (CH), 41.17 (CH)

## Síntesis del cloruro de 1-(4-carboxibenzil)-1'-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1,1'-diio



El ácido 4-clorometilbenzoico (82 mg, 0.478 mmol) se disolvió en acetonitrilo (30 ml) y sobre esta mezcla se añadió cloruro de 1-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridin]-1-io (76.5 mg, 0.239 mmol) y DBU (100  $\mu$ L), obteniéndose una disolución con una tonalidad verde. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 72 horas observándose la formación de un precipitado de color marrón. La mezcla se filtró a vacío y en caliente y el sólido se lavó con acetonitrilo, aislándose el cloruro de 1-(4-carboxibenzil)-1'-(2-(((aliloxi)carbonil)amino)etil)-[4,4'-bipiridine]-1,1'-diio como un sólido de color marrón (82.4 mg, rendimiento = 70 %).

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  9.12 (dd,  $J$  = 24.0, 6.4 Hz, 1H), 8.51 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 0H), 7.70 – 7.39 (m, 0H), 5.98 (s, 0H), 5.77 (ddt,  $J$  = 16.1, 10.4, 5.2 Hz, 0H), 5.25 – 4.97 (m, 0H), 4.78 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 0H), 4.35 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 0H), 3.77 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 0H)

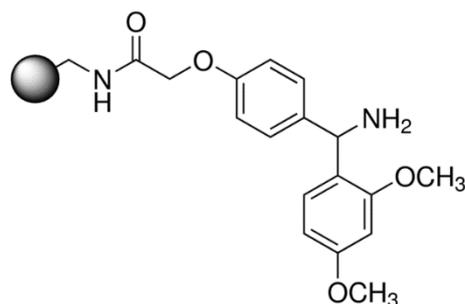
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  146.01 (C), 145.81 (C), 137.02 (C), 130.59 (C), 129.18 (CH), 127.21 (CH), 126.95 (CH), 65.92 (CH), 64.24 (CH)

## Síntesis de péptidos en fase sólida. Síntesis del conjugado viológeno-péptido.

El conjugado viológeno-péptido se preparó siguiendo el método de síntesis en fase sólida, para el cual se siguieron los siguientes pasos.

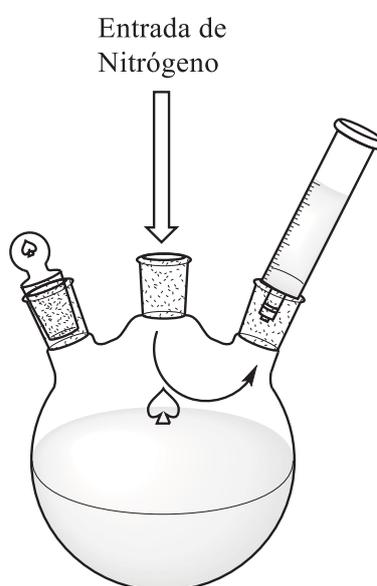
### Preparación de la resina

A la resina H-Rink Amide ChemMatrix (223 mg, 0.1 mmol) se resuspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3/4 partes de la columna) y la mezcla se burbujó con una corriente de  $\text{N}_2$  durante 15 min.



**Figura 37.** Estructura del conector H-Rink Amide unido a la resina ChemMatrix <sup>22</sup>

Tras el lavado de la resina, esta se filtró y a continuación se procedió a realizar el acoplamiento de los aminoácidos.



**Figura 38.** Esquema del montaje para la síntesis en fase sólida

### **Acoplamiento de los aminoácidos**

4 equivalentes del aminoácido correspondiente y 4 equivalentes de HBTU se disolvieron en DMF (2 mL). A continuación, se añadió DIEA (3 mL, 0.195 M) sobre esta mezcla y se dejó reaccionar durante 2 min. Esta mezcla se adicionó sobre la resina y la mezcla resultante se dejó reaccionar durante 30 min haciendo burbujear sobre ella una corriente de N<sub>2</sub>.

Los aminoácidos empleados fueron los siguientes:

- Leucina (141.3 mg) con HBTU (153 mg)
- Alanina (131.1 mg) con HBTU (158.6 mg)
- Viológeno-aminoácido (13.6 mg) con HBTU (15 mg)
- Alanina (8.7 mg) con HBTU (11.7 mg)
- Leucina (10.1 mg) con HBTU (11.1 mg)

### **Lavados**

Una vez realizado cada acoplamiento, se filtró la resina y esta se lavó con DMF (2 × 10 mL × 2 min).

### **Test TNBS**

Tras cada acoplamiento se realizó un test colorimétrico que permite detectar si la amina de la resina se encuentra libre (si no reaccionó con el aminoácido) o no (si el acoplamiento es satisfactorio). Para ello se mezcló una gota de TNBS (1% en DMF) con una gota de DIEA (10% en DMF), y sobre esta mezcla se añadió una pequeña cantidad de partículas de resina. Si la resina se vuelve roja significa que la amina sigue libre, lo cual es un indicativo de que el acoplamiento no tuvo lugar y habría que repetirlo, en cambio, si la resina se mantiene incolora indica que el acoplamiento fue satisfactorio.

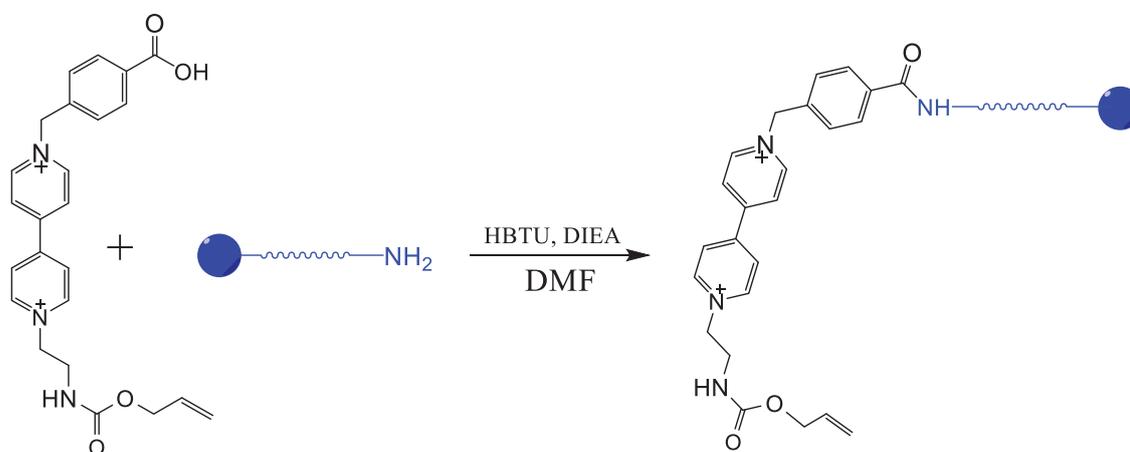
### **Desprotección de la amina. Eliminación del grupo Fmoc**

La resina se resuspendió en 4-metilpiperidina al 20 % en DMF (10 mL) y la mezcla se agitó durante 15 min, burbujando con una corriente de N<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, la resina se filtró y se lavó con DMF (3 × 10 mL × 2 min).

### **Acoplamiento del viológeno**

El viológeno-aminoácido (13.6 mg, 0.027 mmol) y el HBTU (15 mg) se disolvieron en una mezcla de DMF (200 µL) y DIEA (400 µL, 0.195 M) y la mezcla resultante se agitó durante dos minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla se añadió sobre la resina

(16.4 mg,  $6.767 \cdot 10^{-3}$  mmol) y la suspensión se dejó en agitación bajo una corriente de  $N_2$  durante 30 minutos. A continuación, se filtró la resina, se lavó con DMF ( $3 \times 0.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$ ) y se realizó un test TNBS con el que se determinó que el acoplamiento fue satisfactorio.



### Desprotección de la amina. Eliminación del grupo Alloc

Se preparó una disolución de  $PPh_3$  (4.6 mg,  $10,15 \cdot 10^{-3}$  mmol) en DMF (1.5 mL) y sobre esta se añadió *N*-metilmorfolina (7.43  $\mu\text{L}$ ,  $67,67 \cdot 10^{-3}$  mmol) y fenilsilano (8.3  $\mu\text{L}$ ,  $67,67 \cdot 10^{-3}$  mmol). Esta disolución se agregó sobre la resina y a continuación se adicionó  $Pd(OAc)_2$  (0.7 mg,  $2,03 \cdot 10^{-3}$  mmol). La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación durante 16 h. Transcurrido este tiempo, la resina se lavó con DMF ( $2 \times 1.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$ ),  $CH_2Cl_2$  ( $2 \times 1.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$ ), dietilditiocarbamato (7.1 mg en 1 mL de DMF  $\times 10 \text{ min}$ ), DMF ( $2 \times 1.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$ ) y  $CH_2Cl_2$  ( $2 \times 1.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$ ) y se secó bajo una corriente de  $N_2$ .

### Ruptura del enlace péptido-resina

Para desanclar el péptido de la resina se preparó una disolución de  $H_2O$  (25  $\mu\text{L}$ ), triisopropilsilano (25  $\mu\text{L}$ ) y TFA (950  $\mu\text{L}$ ), y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de esta disolución sobre una alícuota de la resina (8.1 mg). La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación durante 1.5 h y a continuación se filtró la resina, añadiéndose el filtrado sobre 1.5 mL de éter. Transcurridos 10 min, el precipitado formado se centrifugó y el sobrenadante se eliminó por decantación. El sólido obtenido se redisolvió en una mezcla de  $H_2O:MeCN$  (1:1) y se analizó mediante HPLC-MS.

## Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, se puede decir que en este trabajo se alcanzaron los siguientes objetivos.

1. Se preparó el viológeno-aminoácido derivado de la 4,4'-bipiridina a través de un mecanismo de dialquilación. Tanto los intermedios de reacción como el viológeno final pudieron obtenerse correctamente siguiendo la estrategia sintética planteada.
2. Se realizó la caracterización por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, RMN bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) y por HR-ESI-MS tanto del viológeno final como de los productos intermedios, estos espectros permitieron la elucidación estructural de los compuestos sintetizados.
3. La formación del complejo de inclusión del derivado de viológeno y el CB[7] se estudió mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN y UV. Los resultados indican la inclusión de la unidad de bipyridinio en la cavidad del CB[7]. Se calculó una constante de asociación estimada para complejo 1:1 de  $K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .
4. Se llevó a cabo la síntesis del conjugado viológeno-péptido siguiendo el método de síntesis de péptidos en fase sólida, aunque debido al estado de alarma no se pudo caracterizar el producto sintetizado.

## Conclusións

Baseándose nos resultados obtidos, pódese dicir que neste traballo alcanzáronse os seguintes obxetivos.

1. Preparouse o violóxeno-aminoácido derivado da 4,4'-bipiridina a través dun mecanismo de dialquilación. Tanto os intermedios da reacción como o violóxeno final puideronse obter correctamente seguindo a estratexía sintética plantexada.
2. Realizouse a caracterización por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, RMN bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e por HR-ESI-MS tanto do violóxeno final como dos produtos intermedios, estes espectros permitiron a elucidación estrutural dos compostos sintetizados.
3. A formación do complexo de inclusión do derivado do violóxeno e o CB[7] estudouse mediante espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN e UV. Os resultados indican a inclusión da unidade de biperidinio na cavidade do CB[7]. Calculouse unha constante de asociación estimada para o complexo 1:1 de  $K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .
4. Levouse a cabo a síntese do conxugado violóxeno-péptido seguindo o método de síntese de péptidos en fase sólida, aunque debido ao estado de alarma non se puido caracterizar o produto sintetizado.

## Conclusions

Based on the obtained results, it can be stated that the following objectives were achieved in this work.

1. The viologen-amino acid derivative from 4,4'-bipyridine was prepared through a dialkylation mechanism. Both the reaction intermediates and the final product were successfully obtained following the proposed synthetic strategy.
2. The characterization of both the final viologen and intermediate products was performed by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , two-dimensional NMR (COSY, HSQC and HMBC) and HR-ESI-MS. These spectra allowed to perform the structural elucidation of the synthesized compounds.
3. The formation of the inclusion complex between the viologen-amino acid and CB[7] was studied by  $^1\text{H-NMR}$  and UV spectroscopy. The results indicate the inclusion of the bipyridinium moiety in the CB[7] cavity. The association constant for the 1:1 complex could be estimated  $K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .
4. The synthesis of the viologen-peptide conjugate was carried out following standard protocols of solid phase peptide synthesis. However, due to the COVID-19 pandemic, the synthesized product could not be characterized.



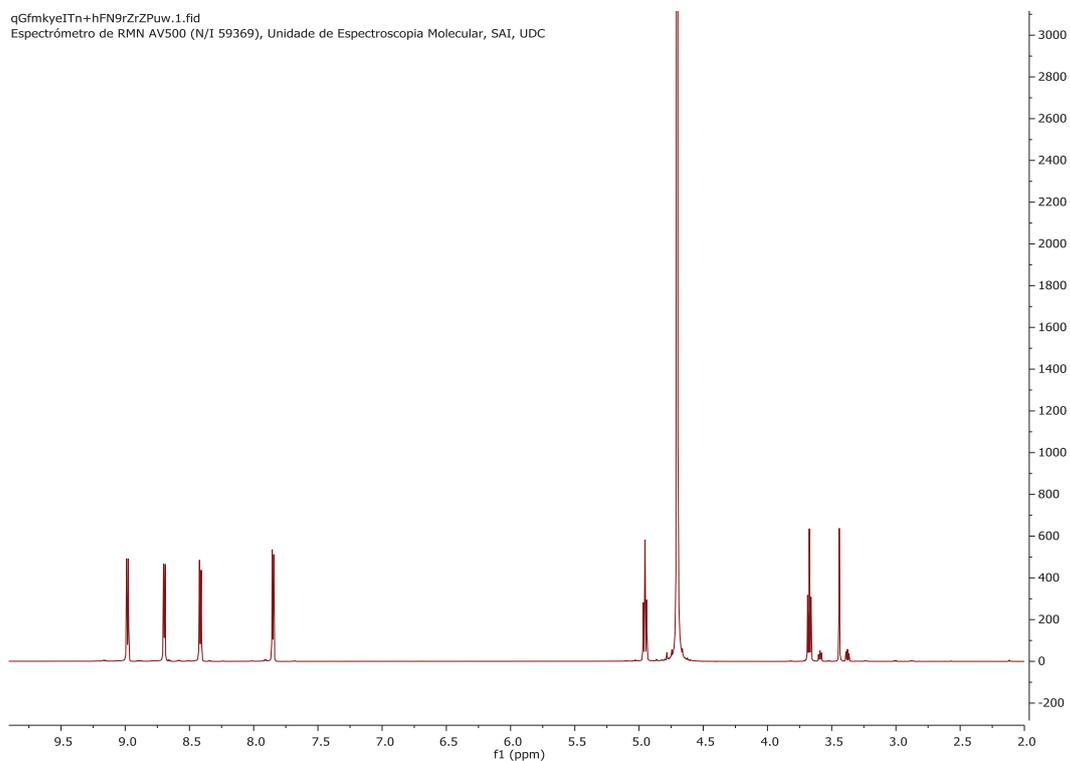
## Bibliografía

1. L. Atwood, G.W. Gokel, L.J. Barbour. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II.*, Ed. Elsevier. UK, **2017**.
2. J.W. Steed, J.L. Atwood. *Supramolecular Chemistry.*, Ed. Wiley: Chichester. UK, **2009**.
3. X.-Y. Lou, N. Song, Y.-W. Yang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer Systems in Supramolecular Macrocyclic Chemistry*. *Molecules*. **2017**, *22*, 1640.
4. A. Blanco-Gómez, P. Cortón, L. Barravecchia, I. Neira, E. Pazos, C. Peinador, M.D. García. *Controlled binding of organic guests by stimuli-responsive macrocycles*. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 3834.
5. S. Shinkai, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 8933–8968.
6. D.-S. Guo and Y. Liu, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 1925–1934.
7. V. Böhmer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 713–745.
8. T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5022–5023.
9. N. L. Strutt, H. Zhang, S. T. Schneebeli and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 2631–2642.
10. a) J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.-J. Kim, K. Kim, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621–630; b) J. Lagona, P.; Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844 – 4870; Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844–4870; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4922 – 4949; c) L. Isaacs, *Chem. Commun.* **2009**, 619 –629; d) E. Masson, X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah, X. Lu, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1213–1247; e) S. J. Barrow, S. Kasera, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320–1240.
11. W. L. Mock, N.-Y. Shih, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440–4446.
12. F. Biedermann, V. D. Uzunova, O. A. Scherman, W. M. Nau, A. De Simone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318–15323.
13. Dr. H.D. Nguyen, D.T. Dang, J.L.J. Van Dongen, Dr. L. Brunsveld. *Protein Dimerization Induced by Supramolecular Interactions with Cucurbit[8]uril*. *Angewandte Chemie*. **2010**, *5*, 122.
14. E. Pazos, P. Novo, C. Peinador, A.E. Kaifer, M.D. García. *Cucurbit[8]uril (CB[8])-Based Supramolecular Switches*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 403.

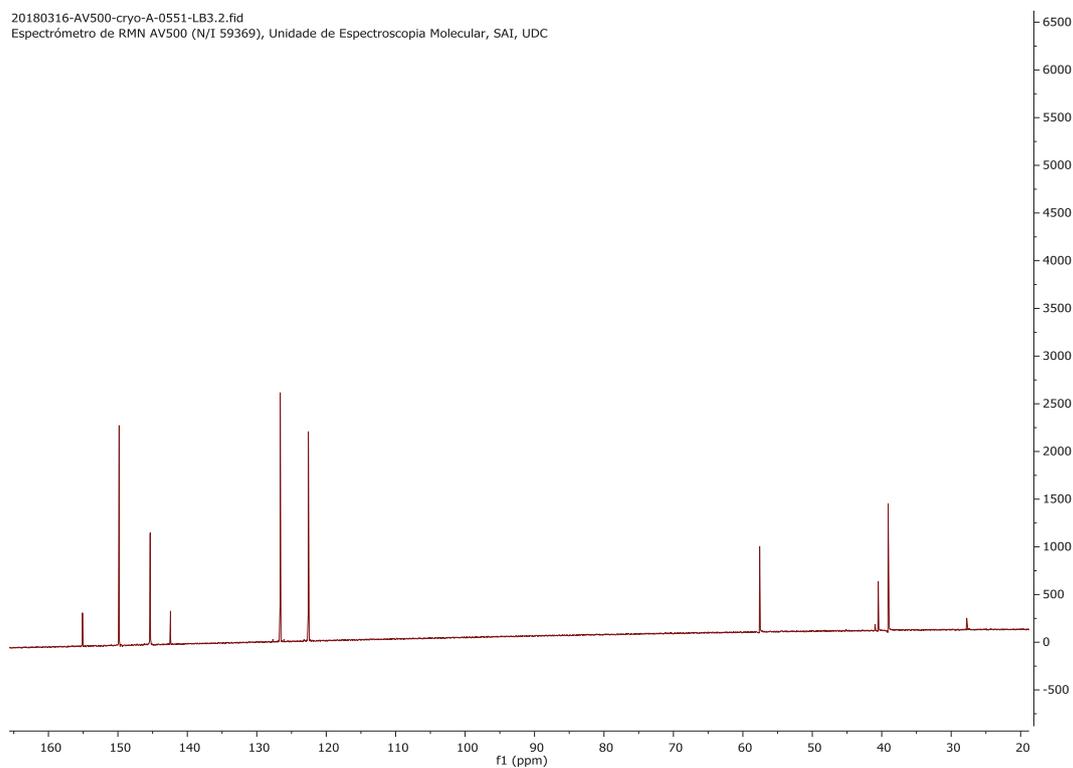
15. V. Mäde, S. Els-Heindl, A.G. Beck-Sickinger. *Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides*. Beilstein J. Org. Chem. **2014**, 10, 1197–1212.
16. R.B. Merrifield. *Automated Synthesis of Peptides*. Science. **1965**, 150 (3693), 178–185.
17. R.B. Merrifield. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 799–810.
18. R. B. Merrifield, “*Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptides.*” J. Am. Chem. Soc. **1963**, 85, 14, 2149.
19. Abdelmoty, F. Albericio, L.A. Carpino, B.M. Foxman, and S. A. K. Lett. *Lett. Pep. Sci.* **1994**, 1 (57), 1–55.
20. G.B. Fields, R. L. NobleSolid. *Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids*. *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, 35 (3), 161–214.
21. F. Albericio, J.M. Bofill, A. El-Faham, S.A. Kates. *Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis*. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678–9683.
22. M. Junkers. *ChemMatrix® Resin – A major advance in solid phase peptide synthesis*. *ChemFiles.* **2020**, 11, 1.

# Anexo

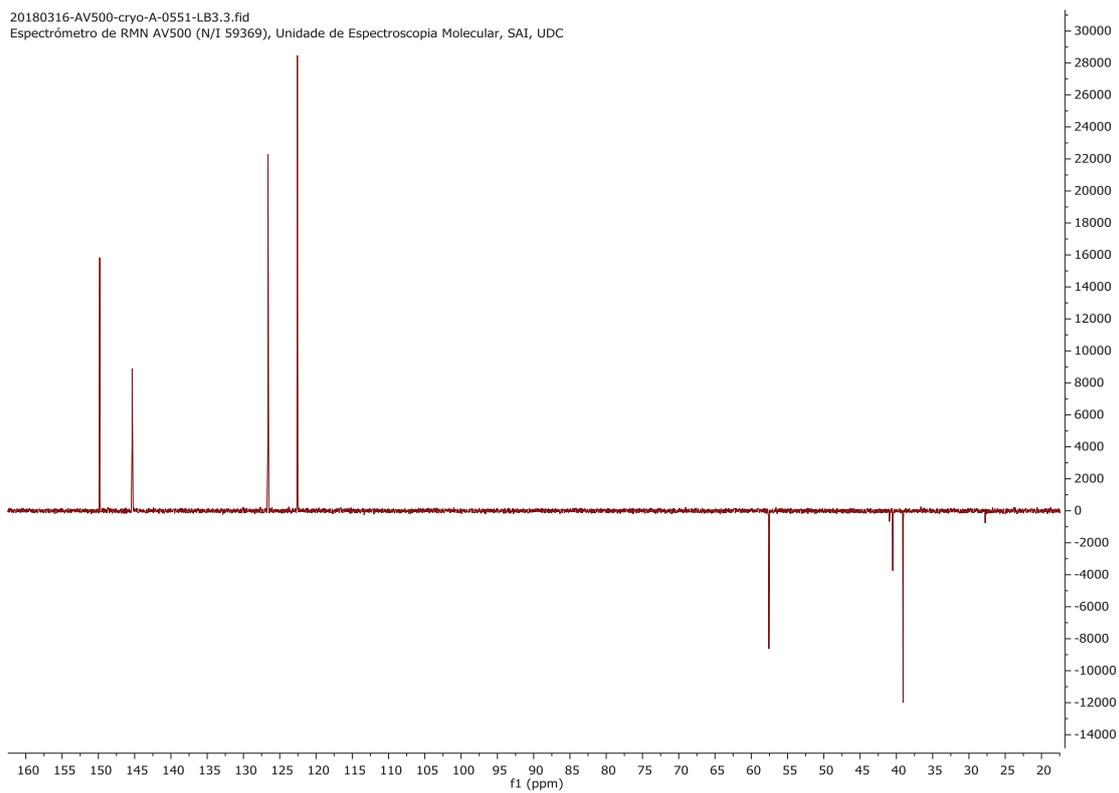
## Intermedio A



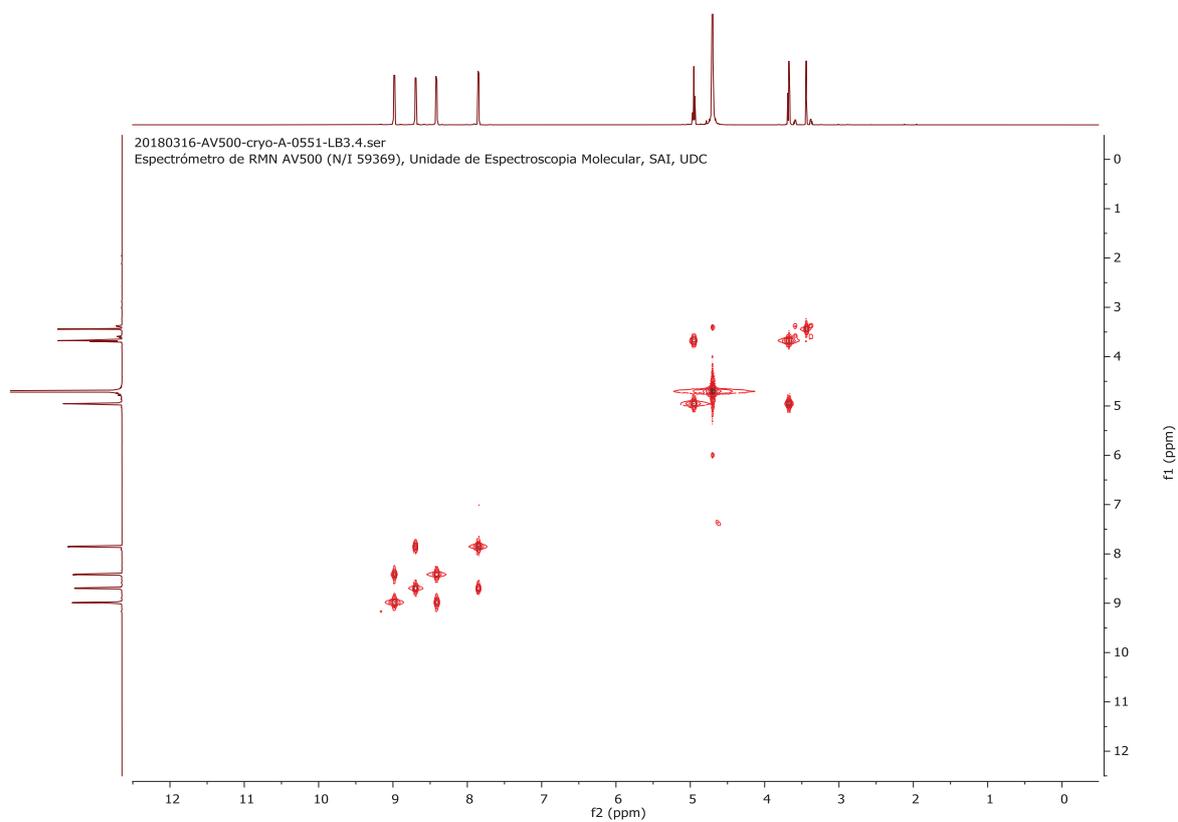
**Figura 39.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del intermedio A



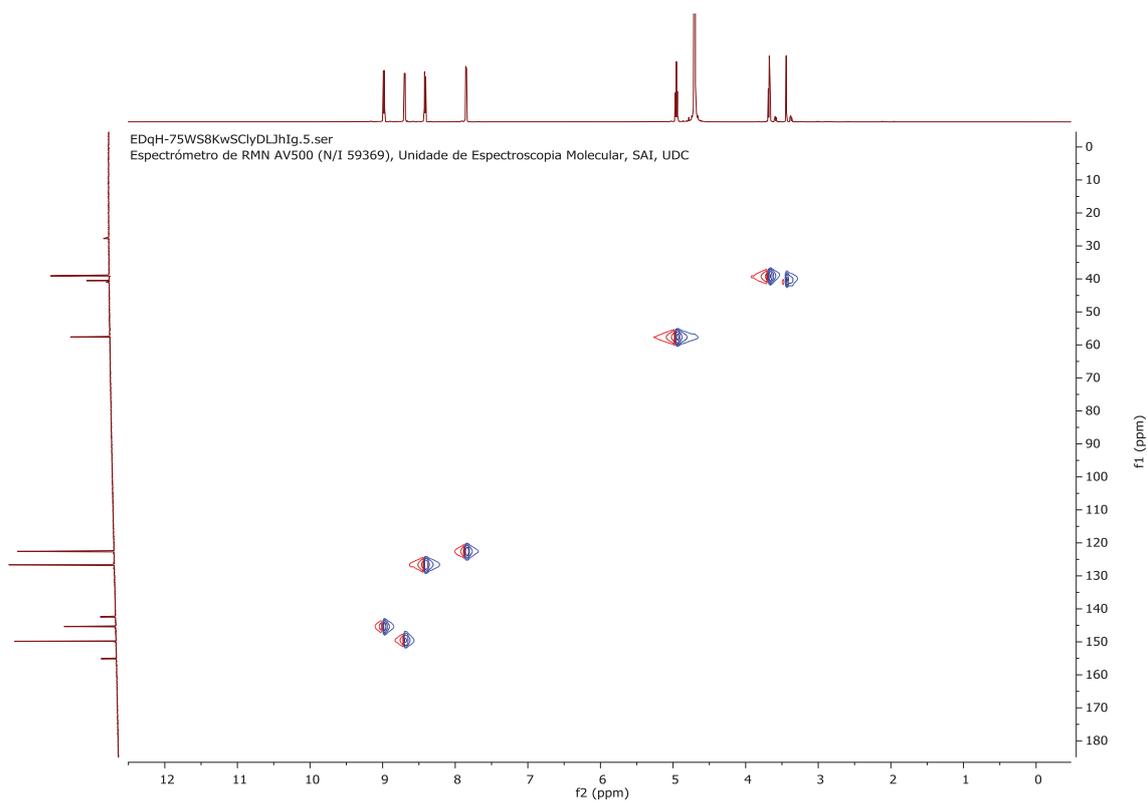
**Figura 40.** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del intermedio A



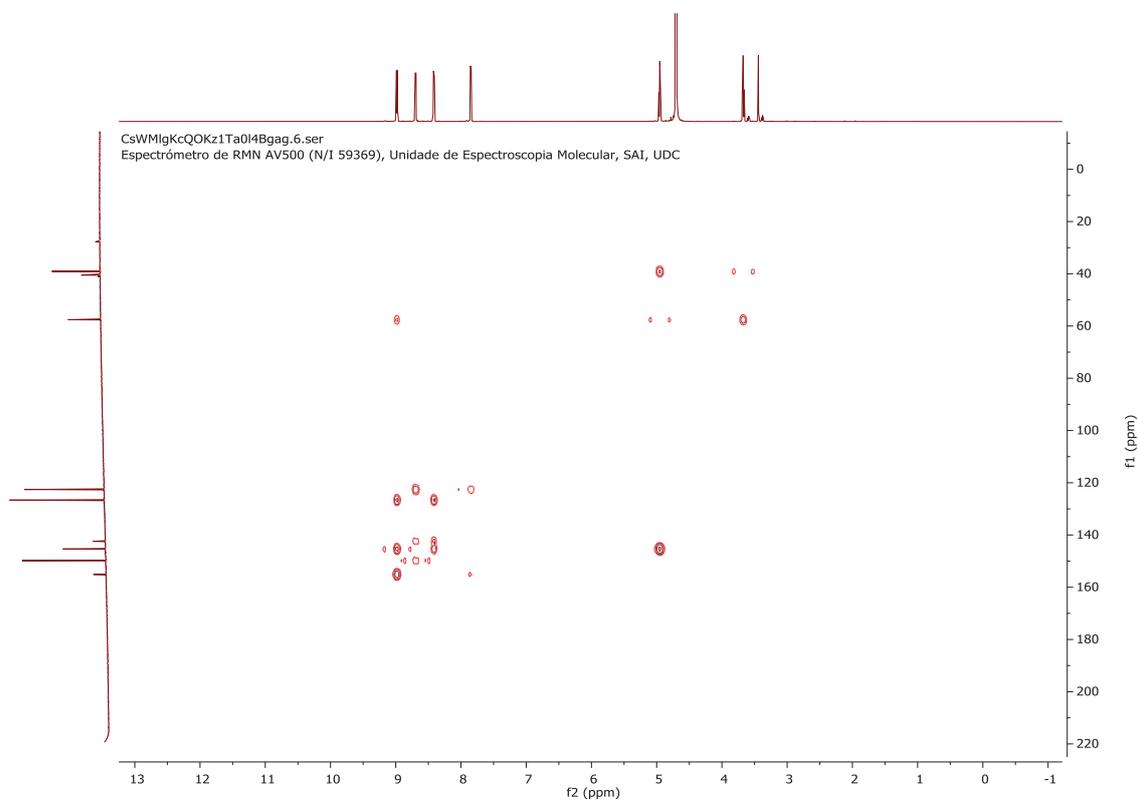
**Figura 41.** Espectro DEPT del intermedio A



**Figura 42.** Espectro COSY del intermedio A



**Figura 43.** Espectro HSQC del intermedio A



**Figura 44.** Espectro HMBC del intermedio A

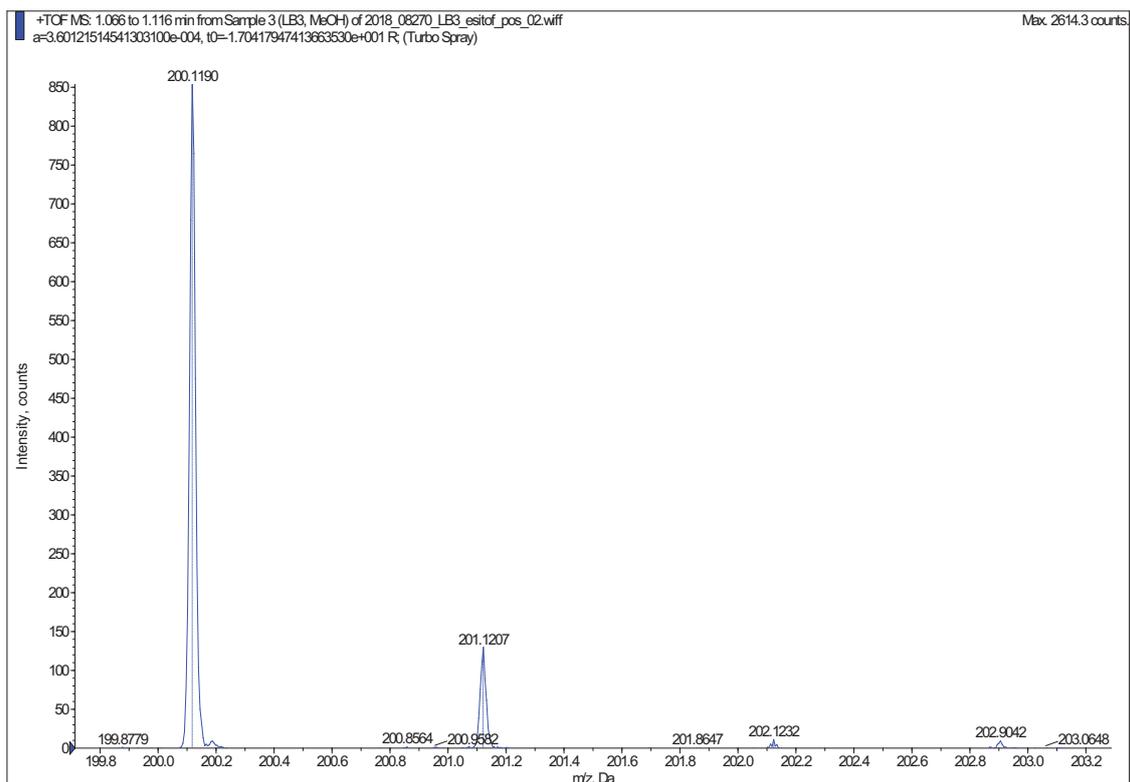
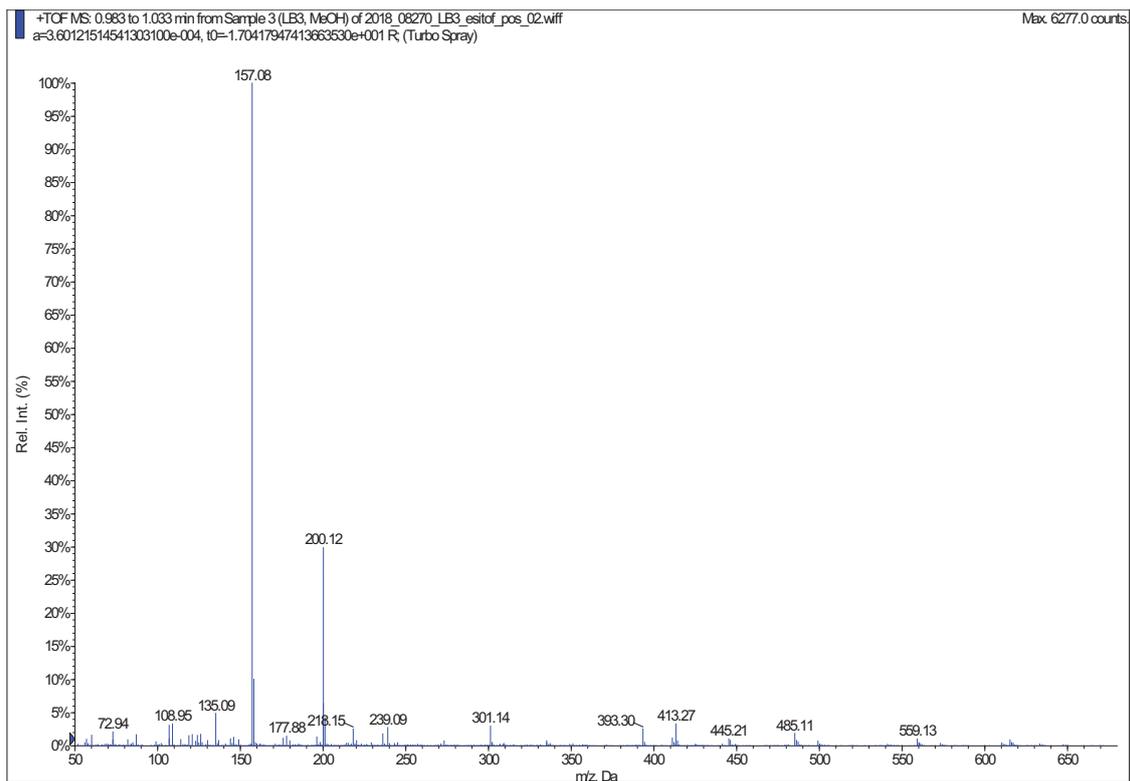
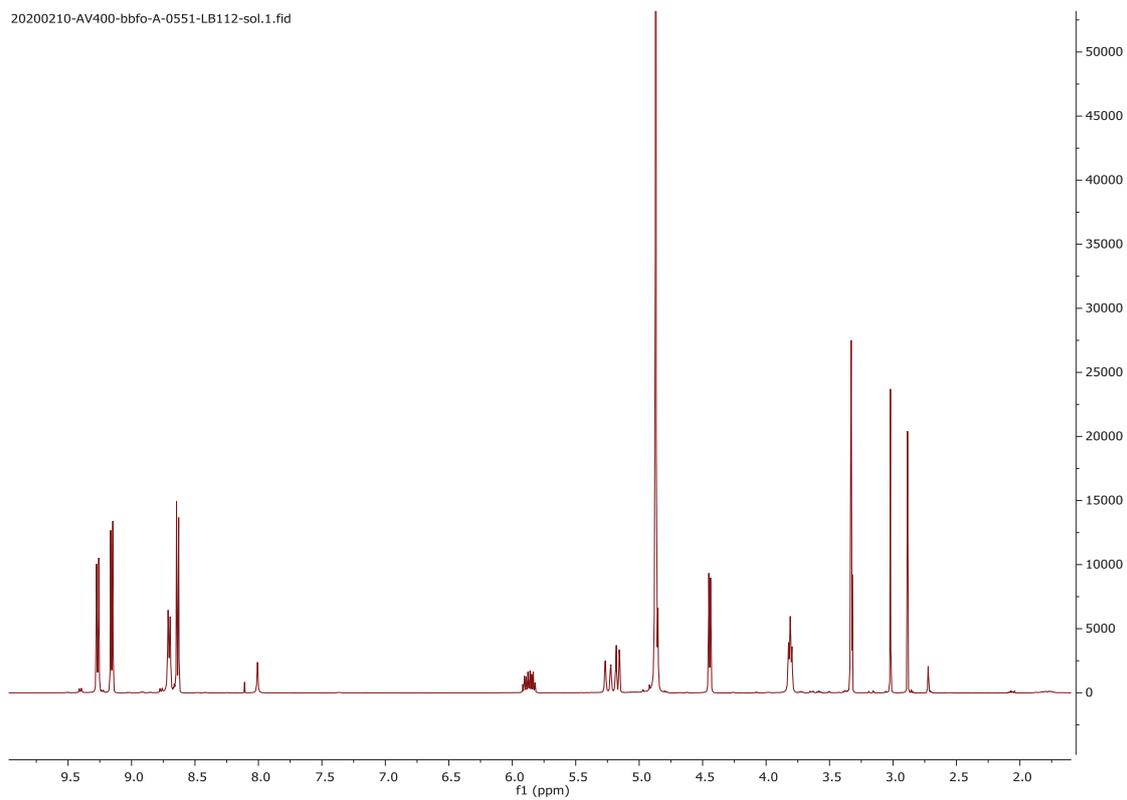
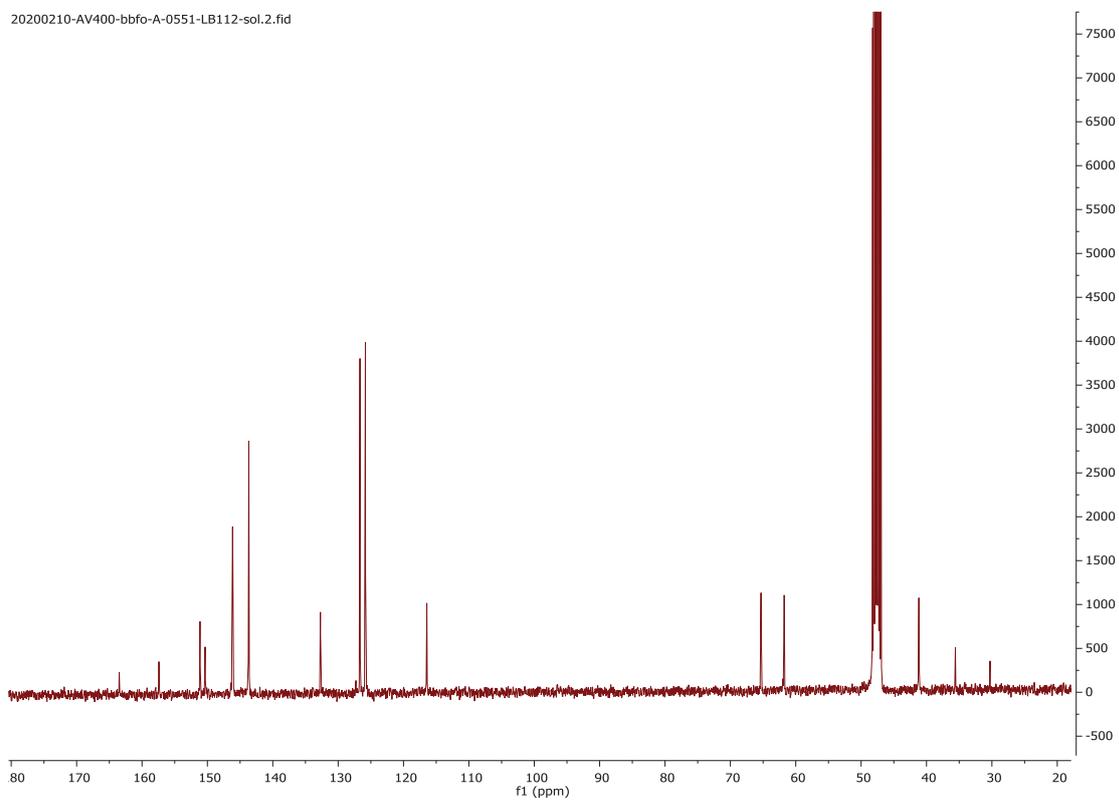


Figura 45. Espectros de masas de baja y alta resolución del intermedio A

## Intermedio B



**Figura 46.** Espectro <sup>1</sup>H-RMN del intermedio B



**Figura 47.** Espectro <sup>13</sup>C-RMN del intermedio B

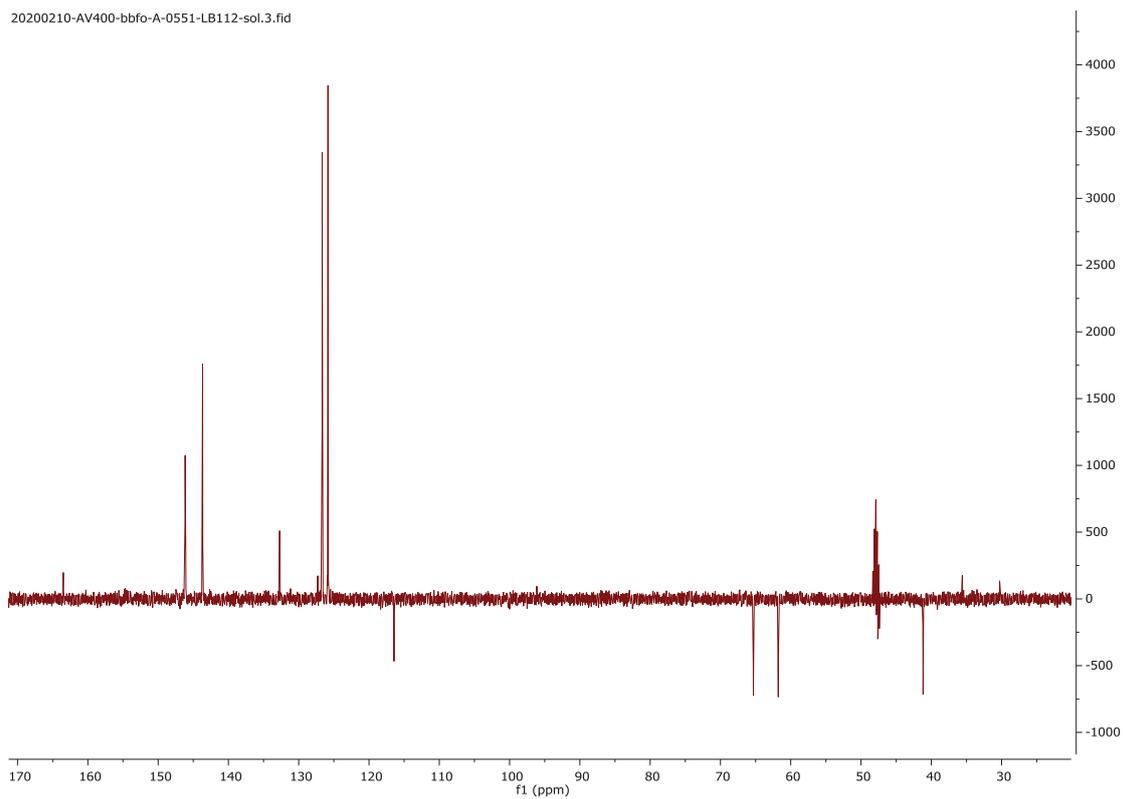


Figura 48. Espectro DEPT del intermedio B

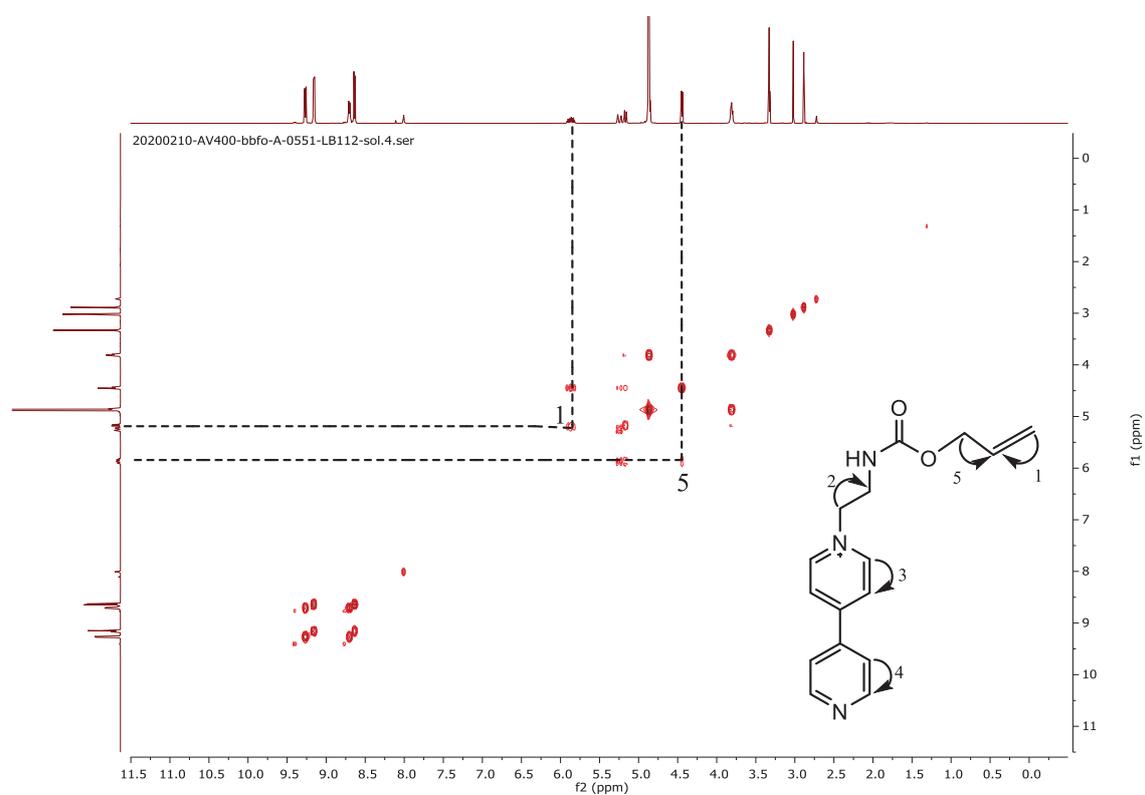


Figura 49. Espectro COSY del intermedio B

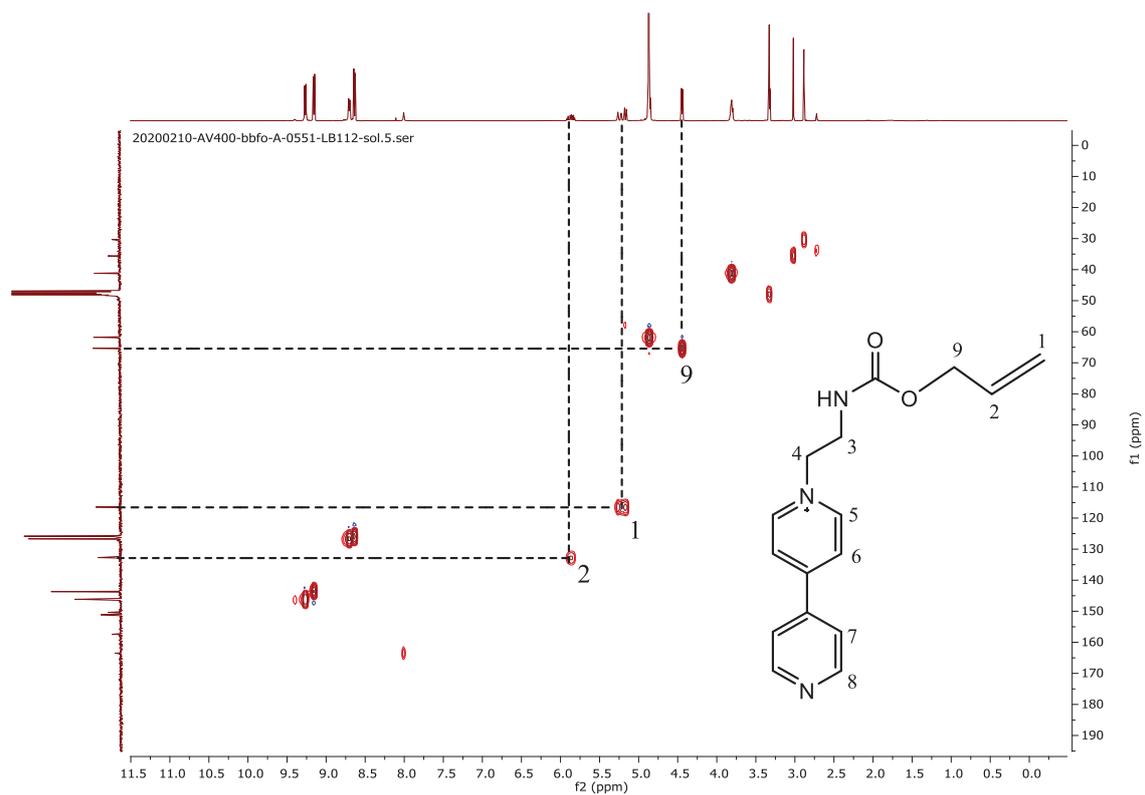


Figura 50. Espectro HSQC del intermedio B

## Viológeno

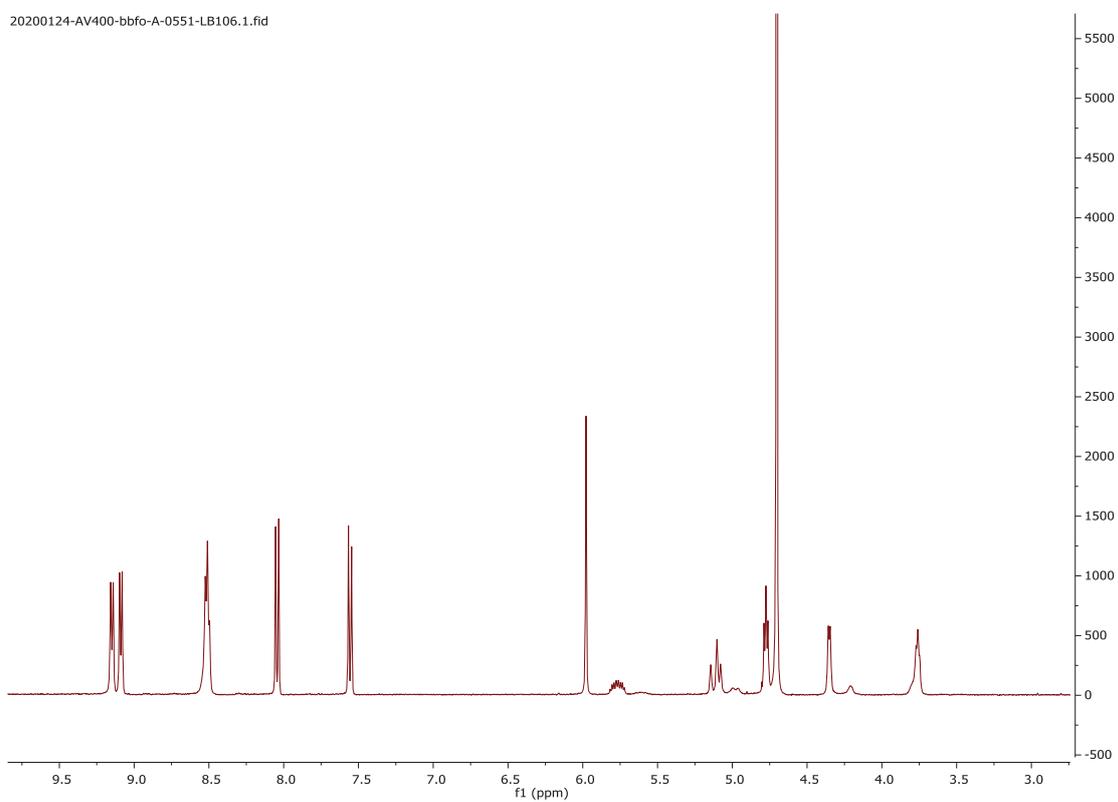
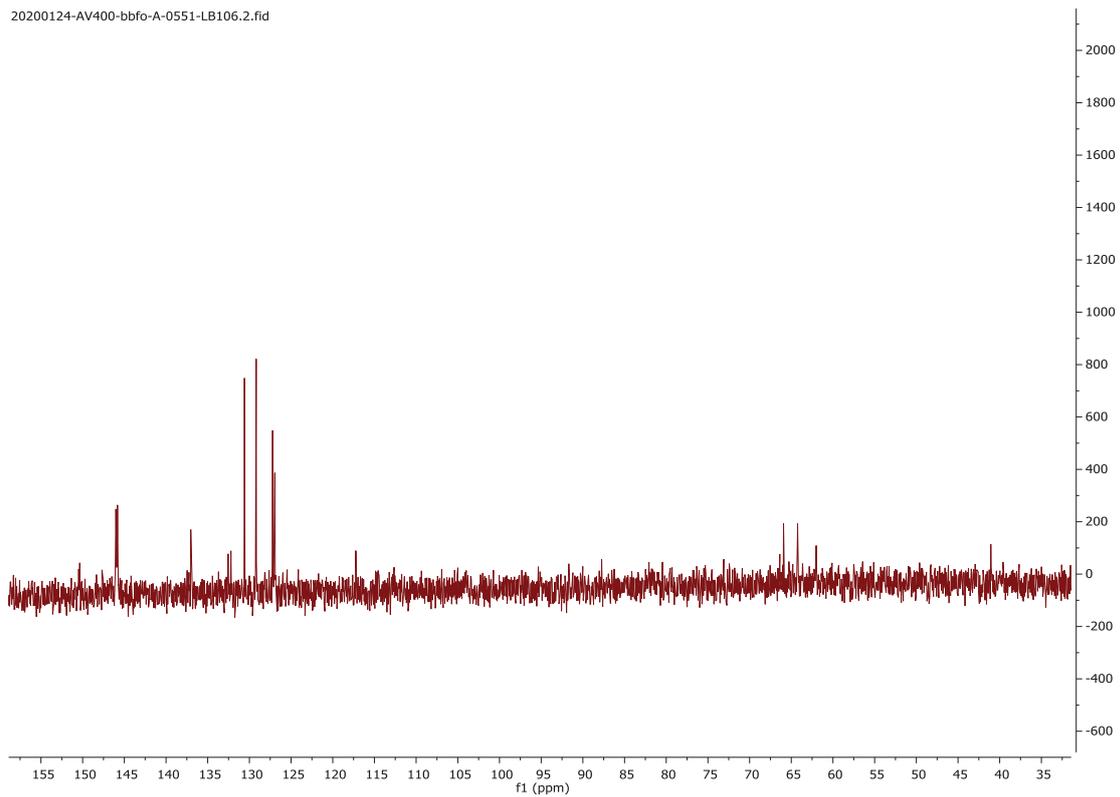
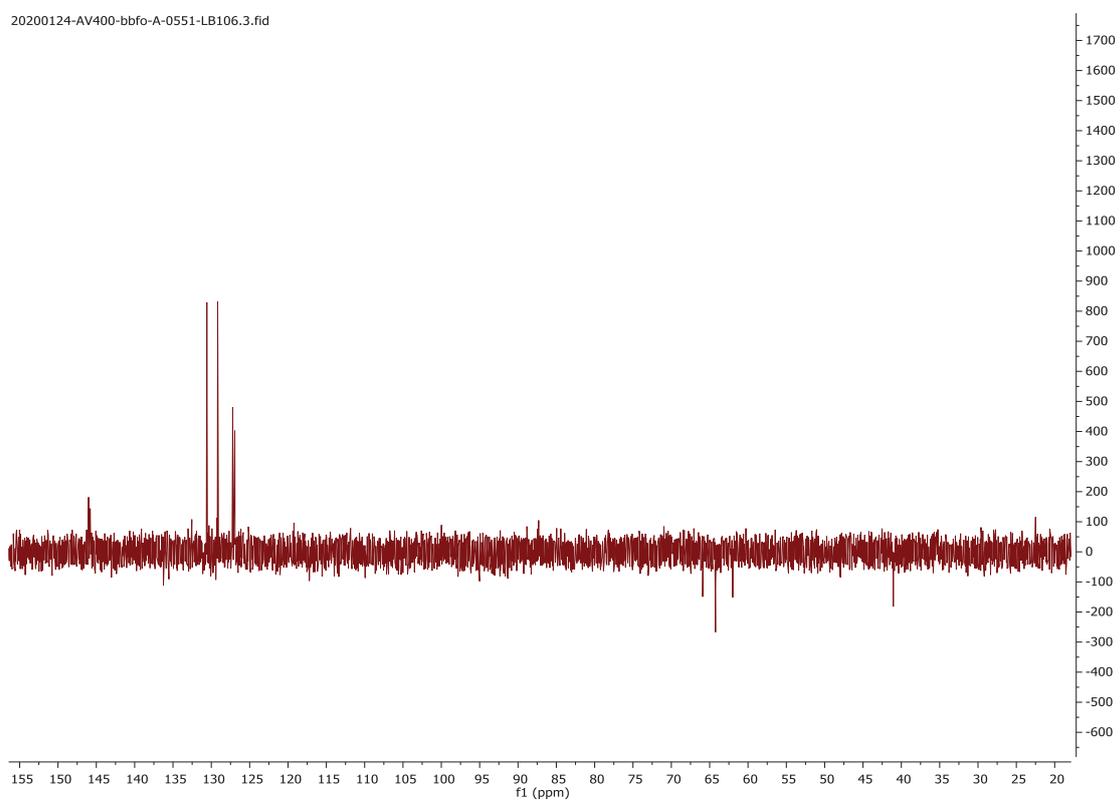


Figura 51. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del viológeno-aminoácido



**Figura 52.** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del viológeno-aminoácido



**Figura 53.** Espectro DEPT del viológeno-aminoácido

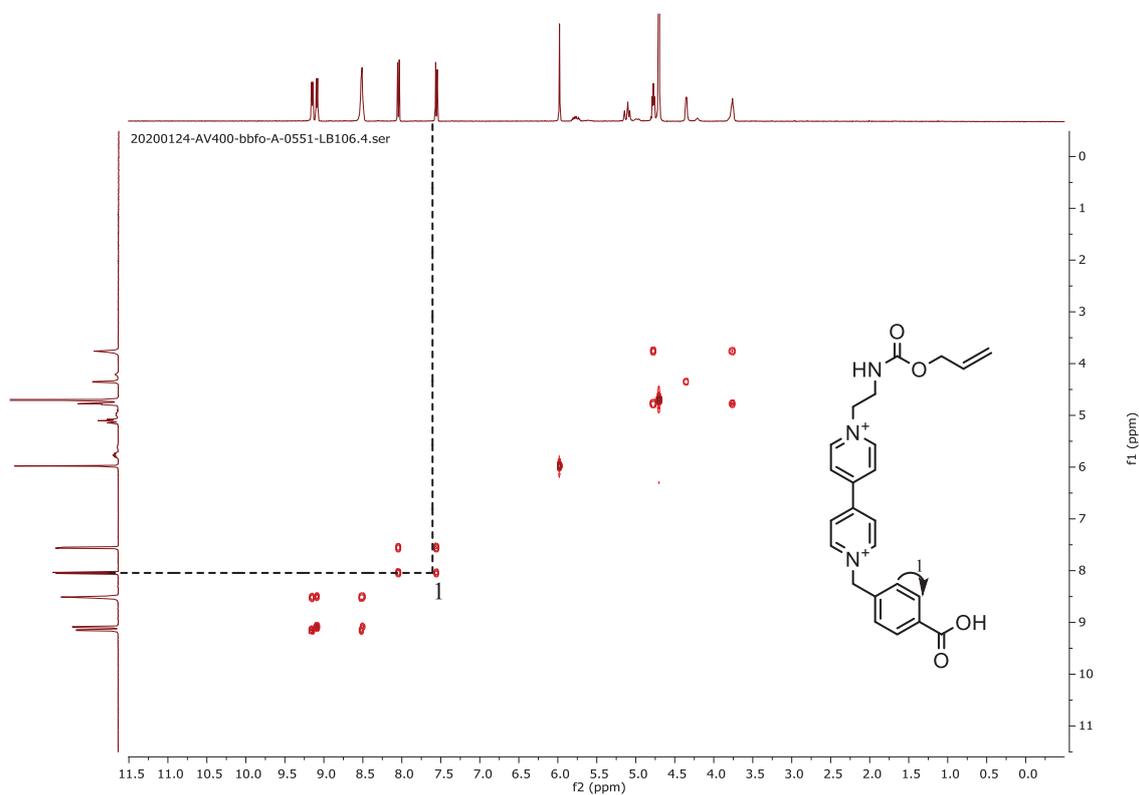


Figura 54. Espectro COSY del viológeno-aminoácido

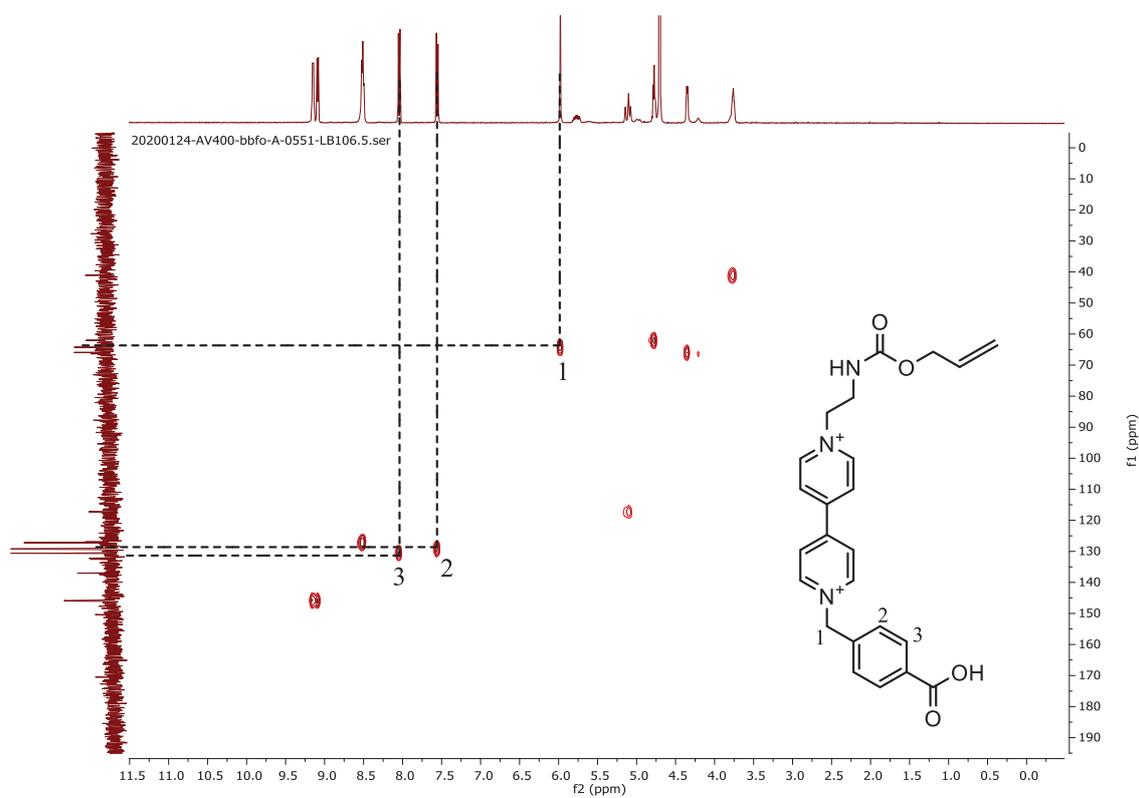


Figura 55. Espectro HSQC del viológeno-aminoácido

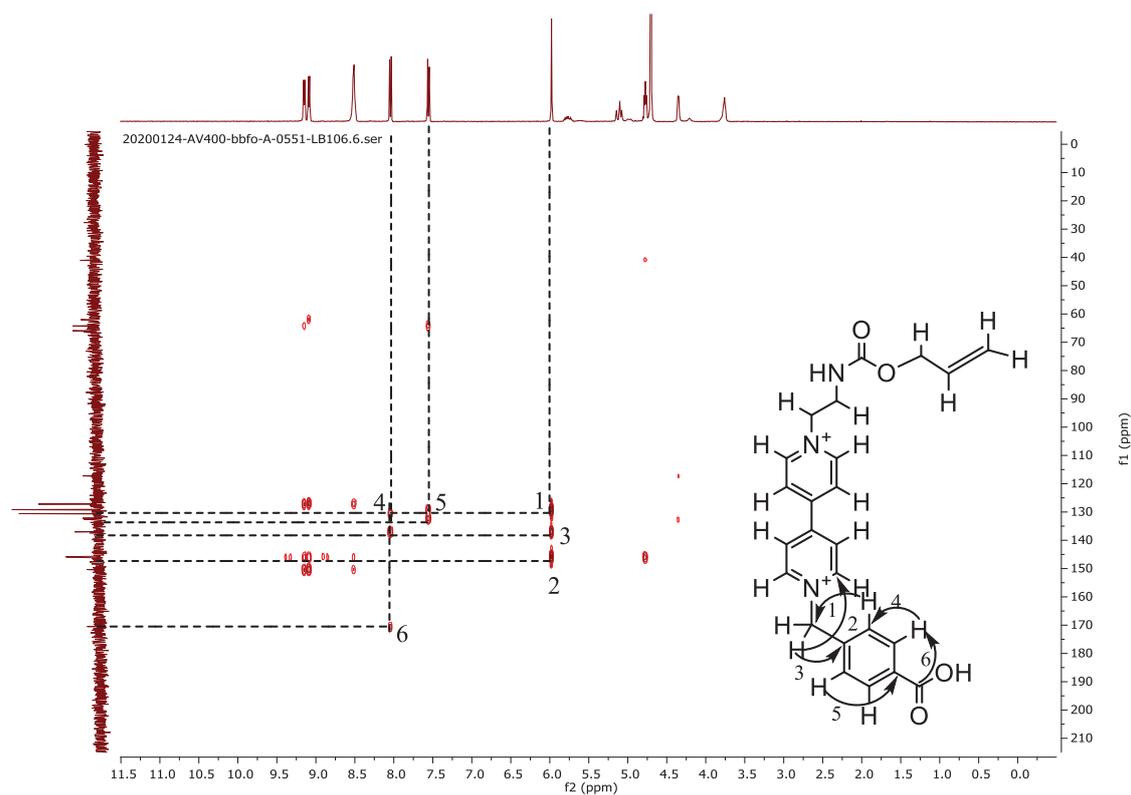


Figura 56. Espectro HMBC del viológeno-aminoácido

## Valoración del CB[7]

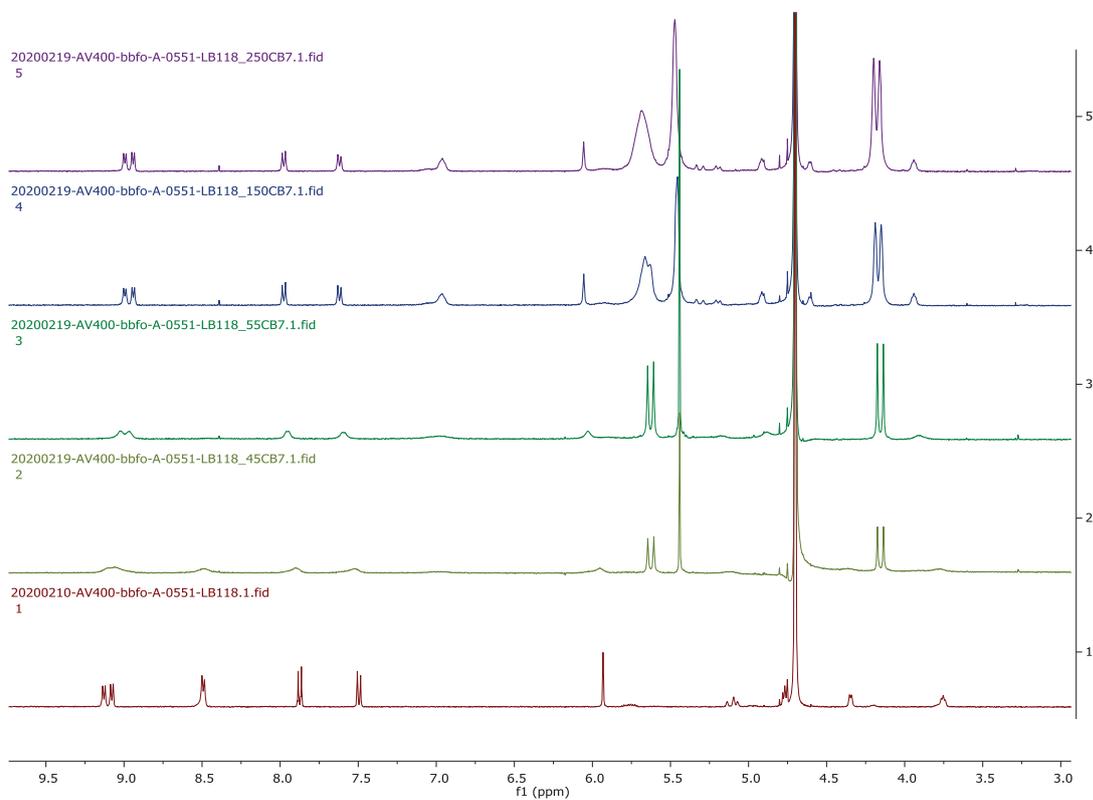


Figura 57. Valoración por <sup>1</sup>H-RMN de la interacción del viológeno-aminoácido y CB[7]

## Valoración UV-Visible del CB[7]

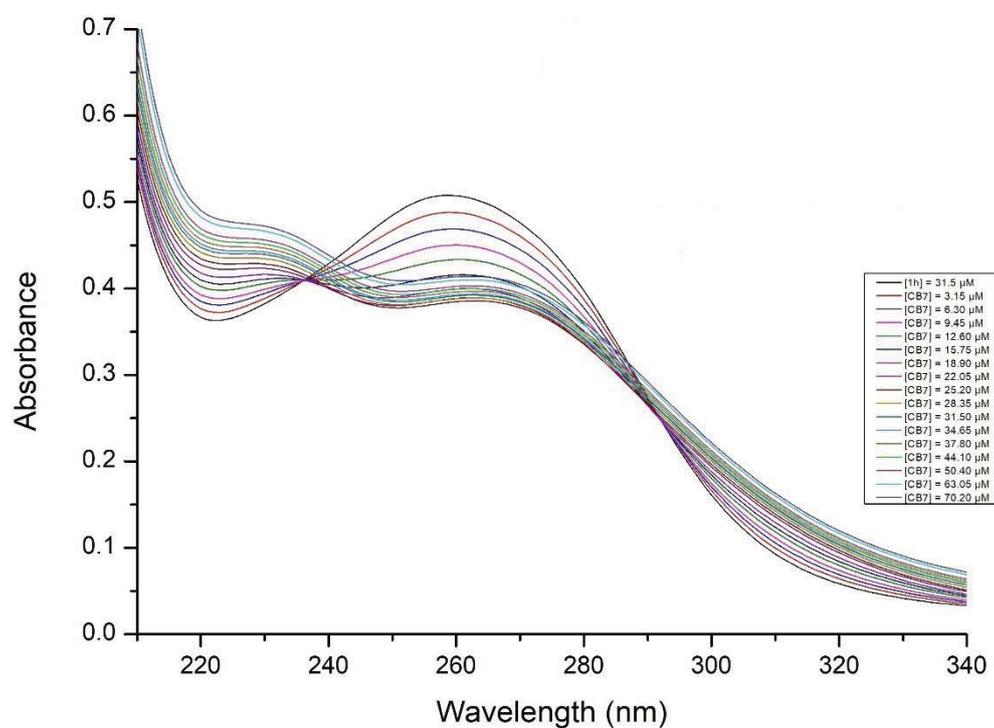


Figura 58. Valoración UV del viológeno-aminoácido con el CB[7]

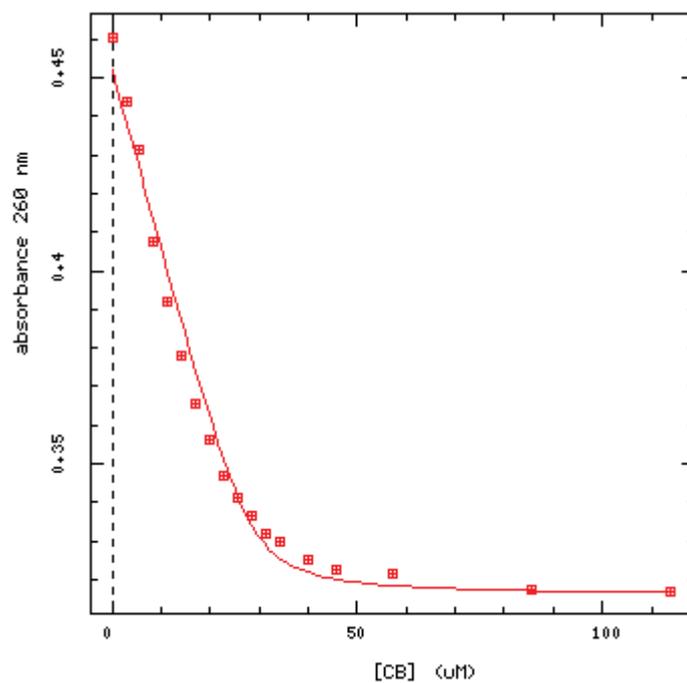


Figura 59. Gráfica del ajuste de la valoración UV entre el viológeno-aminoácido y el CB[7]

Host concentration / M	Guest concentration / M	260/nm
0,00002851	0	0,46061
0,00002851	0,000002851	0,44358
0,00002851	0,000005702	0,43141
0,00002851	0,000008553	0,40766
0,00002851	0,000011404	0,39217
0,00002851	0,000014255	0,37805
0,00002851	0,000017106	0,36542
0,00002851	0,000019957	0,35641
0,00002851	0,000022808	0,3468
0,00002851	0,000025659	0,34106
0,00002851	0,00002851	0,33645
0,00002851	0,000031361	0,33187
0,00002851	0,000034212	0,32987
0,00002851	0,000039914	0,32536
0,00002851	0,000045616	0,32268
0,00002851	0,00005702	0,3216
0,00002851	0,00008553	0,31743
0,00002851	0,00011404	0,31683

**Figura 60.** Datos obtenidos en la valoración UV del viológeno-aminoácido con el CB[7]

